



Étude du transport et du devenir des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de la rivière de l'Alzette : influence des caractéristiques virales et hydro-climatologiques

Blandine Fauvel

► To cite this version:

Blandine Fauvel. Étude du transport et du devenir des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de la rivière de l'Alzette : influence des caractéristiques virales et hydro-climatologiques. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0268 . tel-01537620

HAL Id: tel-01537620

<https://theses.hal.science/tel-01537620>

Submitted on 12 Jun 2017

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

par **Blandine FAUVEL**

Étude du transport et du devenir des bactériophages
ARN F-spécifiques dans les eaux de la rivière de l'Alzette :
influence des caractéristiques virales
et hydro-climatologiques

Le 12 décembre 2016

Membres du jury :

Rapporteurs	Pr Sarah DORNER	École Polytechnique de Montréal – Département des génies civil, géologique et des mines, Montréal
	Dr Stéphan JACQUET	Station d'Hydrobiologie Lacustre INRA - UMR CARRTEL, Thonon-les-Bains
Examineurs	Pr Michael DUBOW	LGBMB, Institut de Génétique et Microbiologie - UMR 8621 CNRS - Université Paris-Sud, Orsay
	Dr Leslie OGORZALY	LIST – Département Environmental Research & Innovation, Belvaux
	Pr Christophe GANTZER	LCPME – UMR 7564 CNRS - Université de Lorraine, Nancy Directeur de thèse
	Dr Henry-Michel CAUCHIE	LIST – Département Environmental Research & Innovation, Belvaux Co-Directeur de thèse

Luxembourg Institute of Science and Technology, Belvaux, Luxembourg
Département Environmental Research & Innovation

&

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement – UMR 7564 CNRS -
Université de Lorraine, Nancy, France
Equipe Microbiologie Environnementale

Remerciements

Et voilà quatre ans d'une sacrée expérience de ma vie qui s'achèvent. Je pense sincèrement que je suis passée par tous les stades d'émotion qui existent tout au long de cette thèse. En voici une petite liste non-exhaustive :

La colère, quand je me rendais compte, par exemple, que j'avais oublié une étape importante d'un protocole qui m'obligeait à tout recommencer !

Le désespoir quand j'attendais désespérément que la météo soit plus clémente pour me permettre d'accéder au fond du lit de la rivière !

Le stress, il y a eu tellement d'occasions que je ne saurais en citer une !

Le doute, avec cette éternelle question, est-ce que j'en suis réellement capable ?

La satisfaction, quand j'ai pu me rendre compte par moi-même que OUI j'en étais capable !

La fierté, quand ma première publication a été acceptée ou quand je découvrais avec succès de nouveaux résultats,

La fébrilité des derniers jours où tout se bousculait et que je sentais l'imminence de la fin !

Mais aussi et par-dessus tout, l'épanouissement et l'enrichissement que m'a procuré cette belle aventure humaine !

De nombreuses personnes se sont retrouvées de manière fortuite ou non au milieu de ce brouhaha d'émotions. C'est principalement à ces personnes que j'aimerais dédier ces quelques lignes.

Je tiens avant tout à remercier le Fonds National de la Recherche (FNR) du Grand-Duché de Luxembourg pour avoir financé ce présent travail de thèse.

J'adresse mes remerciements les plus sincères au Professeur Christophe Gantzer, directeur scientifique de la présente thèse et membre du jury. Je tenais tout particulièrement à vous remercier de m'avoir fait partager votre savoir et vos capacités d'analyse qui m'ont toujours impressionnée. L'ensemble de vos conseils ont été précieux et m'ont permis d'explorer et d'interpréter au mieux tous les résultats obtenus.

J'aimerais également remercier le Docteur Henry-Michel Cauchie, co-directeur scientifique de cette thèse et membre du jury. Il fut pour moi, tour à tour, un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses obligations, mais aussi un soutien et un réconfort dans mes moments de doute et d'angoisse. Henry-Michel, merci pour avoir si gentiment supporté mes découragements et trouvé les mots ou les attentions qui me redonnaient confiance en moi. Monsieur Pingouin en est un bel exemple et je le garderai précieusement en souvenir de tes conseils avisés !

Je souhaite également remercier le Professeur Michael Dubow pour sa présence lors de mes deux comités de thèse et pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury. Je remercie également vivement le Professeur Sarah Dorner et le Docteur Stéphan Jacquet d'avoir accepté les rôles de rapporteurs et membres du jury. Ces quelques lignes me permettent de vous remercier

sincèrement pour avoir accepté cette charge de travail supplémentaire et pour le regard critique que vous saurez apporter à cette étude.

J'adresse enfin mes remerciements à un membre du jury tout particulièrement important à mes yeux, le Docteur Leslie Ogorzaly. Leslie, tu as été mon mentor pendant toutes ces années de thèse. Je ne sais à quel point te remercier, ces quelques lignes ne me paraissent pas suffisantes pour te montrer toute ma gratitude. Ton soutien a été indéfectible et tu as su me donner le goût de la recherche et des raisonnements scientifiques. Je ne sais pas si l'envie te prendra à nouveau d'encadrer une thésarde, mais je sais déjà qu'elle aura beaucoup de chance, comme ce fut le cas pour moi ! Pardon encore de t'avoir momentanément détournée du plus beau rôle d'une femme dans la vie, celui de jeune maman... quand je te téléphonais ou même que je te rendais visite et te volais quelques instants précieux auprès de ton dernier petit bout de chou... jamais tu ne m'as repoussée, au contraire tu as pris le temps à chaque fois de m'écouter. Merci !

Dans cette longue liste des personnes qui ont compté pour moi, je ne peux oublier le Docteur Christian Penny, mon grand ami, mon confident, le premier à avoir vraiment travaillé avec moi au moment de mon stage de fin d'études. Mon Tonton, merci pour les bons moments passés à tes côtés et ton soutien sans faille dans le dur exercice de la rédaction du manuscrit de thèse ... tu aurais sans doute apprécié avoir une voisine de bureau un peu plus souriante dans ces moments-là !

Un grand merci aussi à Delphine qui, avec gentillesse et patience, m'a apporté une aide et une écoute précieuses. J'ai pu profiter de ton expérience en laboratoire et apprécier ton insatiable désir d'approfondir tes connaissances scientifiques. Tu m'as été d'un grand secours tout au long de mon parcours, tant professionnel que personnel !

Cette expérience m'a également permis de rencontrer une personne formidable, devenue l'une de mes plus proches amies. Ma Cécile, nous avons partagé tellement de choses ensemble, du jour où tu m'as annoncé l'arrivée prochaine de Nolan à celui où je t'ai accompagnée à ton premier vol en avion. Que de rigolades ! D'ailleurs, je me souviens des pleurs dans ton bureau suite à des fous rires incontrôlés ! Merci pour ta gentillesse, ton humour et ta joie de vivre qui m'ont permis à de nombreuses reprises de m'extraire de mes durs moments de travail.

J'ai une pensée toute spéciale à ma joyeuse troupe avec laquelle j'ai partagé de nombreux repas du midi et quelques verres après le travail. Aline, Anouk, Aude, Boris, Kahina et Joana, vous m'avez fait partager de bonnes occasions de détente avant de me replonger dans le travail.

Je remercie aussi toutes les personnes qui m'ont aidée à mieux comprendre des domaines plus obscurs qui n'étaient pas vraiment ma spécialité. Je pense notamment au Docteur Christophe Hissler, au Docteur Núria Martínez Carreras, au Docteur Emmanuelle Montarges-Pelletier et au Docteur Laurent Pfister qui m'ont fait découvrir les secrets de l'hydrologie et du sédiment. Je remercie également le Docteur Laurence Mansuy-Huault pour sa présence lors de mes deux comités de thèse.

Je remercie également Jean-François Iffly pour l'installation de l'ensemble des échantillonneurs automatiques placés le long de la rivière, Elisabeth Clot pour m'avoir guidée dans l'impression et l'envoi de mes manuscrits, Michèle Bartucci pour son aide et sa disponibilité, ainsi que toutes les autres personnes qui m'ont accompagnée dans mes démarches.

Enfin, j'adresse toute mon affection à ma famille.

À Anne-Solène, ma grande sœur chérie, pour tes conseils, ton enthousiasme et ton coaching à toute épreuve qui ont eu un fort retentissement sur mon travail.

À Thomas, mon précieux grand frère, pour ton sourire, ta bonne humeur et l'apaisement que tu as su m'apporter lors de chacune de tes visites.

À mes parents adorés, vous qui m'avez soutenue depuis le tout début de mes études, avec confiance et tendresse, vous avez rendu possible ce long travail de thèse grâce à vos encouragements et votre amour. Merci d'avoir eu foi en moi !

Est-ce le bon endroit pour dire ce genre de choses, je n'en connais en tout cas pas de mauvais. Je vous aime.

Je n'oublie pas ma belle-famille, et en particulier, Odile et Michel, mes beaux-parents, pour ces délicieux moments de détente partagés auprès de vous, notamment au cours des repas du dimanche midi.

Pour finir cette longue liste, je tenais bien évidemment à remercier mon ami, mon âme-sœur, mon mari, mon amour. Clément, tu as été dans l'ombre de ce long travail mais la finalisation de cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans ton aide. Tu as su être patient, m'encourager, me réconforter, me faire rire quand j'en avais le plus besoin, m'écouter me plaindre et surtout accepter tout le temps que j'ai pu consacrer à ce travail. Encore une épreuve que nous avons réussi à surmonter ensemble !

Liste des abéviations

ACP Analyse en Composantes Principales

ADN Acide désoxyribonucléique

ARN Acide ribonucléique

cg Copies de génome

Ct Cycle threshold (cycle seuil)

D₉₀ Distance nécessaire pour éliminer 90% d'une population

DBO₅ Demande Biochimique en Oxygène après 5 jours d'incubation

DRO Dérivés Réactifs de l'Oxygène

é-h Equivalent habitant

FRNAPH Bactériophage ARN F-spécifique

GG Génogroupe

ICC-PCR Integrated Cell Culture PCR

ISO International Standardization Organisation

NPP Nombre le Plus Probable

NPPUC Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes

NTU Unité de Turbidité Néphélométrique

PBS Phosphate Buffer Saline

PCR Polymerase Chain Reaction

qPCR quantitative Polymerase Chain Reaction

RT Reverse Transcription

STEP Station d'épuration

T₉₀ Temps nécessaire pour inactiver 90% d'une population

UFP Unité Formant Plage

UV Ultraviolet

WWTP Wastewater Treatment Plant

Table des matières

Introduction générale et objectifs de la thèse	- 1 -
Chapitre 1 : Etude bibliographique.....	- 7 -
1 Présence de particules virales dans le milieu hydrique	- 9 -
1.1 Présence dans l'eau de surface.....	- 10 -
1.2 Présence dans le sédiment	- 15 -
1.3 Persistance des particules virales	- 17 -
1.3.1 La température	- 18 -
1.3.2 Les rayonnements naturels.....	- 19 -
1.3.3 Le pH.....	- 20 -
1.3.4 L'association des particules virales	- 20 -
1.3.5 Les sels et métaux.....	- 21 -
1.3.6 Les facteurs biologiques.....	- 22 -
2 Evaluation et conséquences de la contamination virale du milieu hydrique	- 23 -
2.1 Identification des risques pour la santé humaine.....	- 24 -
2.2 Impact des facteurs hydro-climatologiques sur la présence virale dans les eaux de surface	- 25 -
2.3 Aménagement de stratégies pour diminuer les risques d'infection d'origine hydrique	- 27 -
3 Les interactions particules virales-environnement, points clés du transport et du devenir des virus dans l'environnement hydrique.....	- 30 -
3.1 Interactions mises en jeu	- 30 -
3.1.1 Les interactions électrostatiques ou Coulombiennes	- 30 -
3.1.2 Les interactions de Van der Waals.....	- 31 -
3.1.3 Les interactions hydrophobes.....	- 31 -
3.2 Variables affectant les interactions particules virales-environnement	- 31 -
3.2.1 Nature du virus	- 32 -
3.2.2 Nature de la surface de contact.....	- 33 -
3.2.3 Composition chimique du milieu	- 35 -
3.2.4 Température.....	- 36 -
3.2.5 Matière organique	- 37 -
3.3 Prédiction des interactions virus-surfaces solides dans l'environnement.....	- 38 -
4 Les bactériophages ARN F-spécifiques : modèles de la dynamique des virus dans l'environnement hydrique	- 40 -
4.1 Structure des bactériophages ARN F-spécifiques	- 40 -
4.1.1 La capside	- 42 -
4.1.2 Organisation du génome viral.....	- 43 -
4.1.3 Réplication	- 44 -
4.2 Les avantages à utiliser les bactériophages ARN F-spécifiques comme modèles pour l'étude de la dynamique virale dans un milieu hydrique.....	- 45 -
4.2.1 Ubiquité des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de surface et le sédiment.....	- 46 -
4.2.2 Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateur de pollution virale d'origine fécale	- 46 -
4.2.3 Similarité des bactériophages ARN F-spécifiques avec certains virus entériques pathogènes	- 48 -
4.2.4 Facilité de détection des bactériophages ARN F-spécifiques.....	- 48 -
4.2.5 Différences au sein des bactériophages ARN F-spécifiques.....	- 48 -
4.2.6 Les bactériophages ARN F-spécifiques comme outil pour déterminer l'origine de la pollution fécale ..	- 49 -
Chapitre 2 : Stratégies et méthodologies générales.....	51

1	Description du lieu d'étude	- 53 -
1.1	La rivière Alzette	- 53 -
1.2	La station d'épuration d'Hespérance	- 56 -
1.2.1	Efficacité de la station d'Hespérance sur 24 heures	- 56 -
1.2.2	Prélèvements ponctuels pour l'évaluation de l'apport des bactériophages ARN F-spécifiques.....	- 59 -
2	Détection des bactériophages ARN F-spécifiques	- 60 -
2.1	Détection des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux	- 60 -
2.2	Détection des bactériophages ARN F-spécifiques totaux.....	- 61 -
2.2.1	Choix du système de détection des génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques.....	- 61 -
2.2.2	Construction de gammes standards pour la quantification des génogroupes	- 61 -
2.3	Intérêt d'une quantification des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux	- 62 -
3	Analyse du sédiment.....	- 63 -
3.1	Méthode de prélèvement.....	- 63 -
3.2	Elution des particules virales	- 63 -
Chapitre 3 : Propagation des bactériophages ARN F spécifiques dans l'Alzette dans des conditions hydro-climatologiques stables		67
Chapitre 4 : Influence des événements hydro-climatologiques sur la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière Alzette		87
Chapitre 5 : Distribution des bactériophages ARN F-spécifiques de la colonne d'eau au sédiment dans la rivière Alzette.....		107
Chapitre 6 : Dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux en fonction des propriétés et caractéristiques du sédiment		121
1	Introduction	- 123 -
2	Matériels et méthodes	- 124 -
2.1	Echantillonnage du sédiment	- 124 -
2.2	Détermination du rapport sédiment humide/sédiment sec	- 125 -
2.3	Détermination du pourcentage de matière organique	- 125 -
2.4	Identification granulométrique.....	- 125 -
2.5	Quantification des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux	- 125 -
2.6	Détermination de la surface spécifique et microporosités.....	- 126 -
2.7	Détermination des principaux minéraux du sédiment par diffraction aux rayons X.....	- 126 -
3	Résultats	- 127 -
3.1	Analyse des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux.....	- 127 -
3.2	Analyse des caractéristiques du sédiment.....	- 128 -
3.2.1	Analyse de la matière organique	- 128 -
3.2.2	Analyse de l'identification granulométrique.....	- 129 -
3.3	Analyse des surfaces spécifiques et de la nature des sédiments	- 131 -
3.3.1	Analyse de la surface spécifique des échantillons du quadrillage #4.....	- 132 -
3.3.2	Analyse de la nature minéralogique des échantillons du quadrillage #4.....	- 134 -
4	Discussion.....	- 135 -
Discussion générale		139
Références bibliographiques.....		153

*Introduction générale et objectifs de la
thèse*

L'eau est indispensable à la vie de l'Homme. Au-delà de sa consommation primaire, l'eau lui sert aussi dans ses activités industrielles, pour son hygiène, pour l'irrigation de ses potagers ou encore pour ses activités récréatives (baignade, sports aquatiques). L'utilisation de l'eau par l'Homme conduit généralement à une altération de sa qualité. En particulier, la pollution par des microorganismes pathogènes provenant de l'Homme lui-même, ou parfois d'animaux, constitue une détérioration importante de la qualité de l'eau. C'est ainsi que la présence de virus entériques dans les eaux environnementales constitue un risque pour la santé humaine. Introduits dans les eaux de surface par l'intermédiaire de sources ponctuelles (effluents de stations d'épuration) ou diffuses (lessivage de surfaces agricoles, excréments animaux sauvages), les virus entériques peuvent ensuite emprunter différentes routes.

Premièrement, les particules virales peuvent se propager dans les eaux de surface par l'intermédiaire de procédés d'advection, c'est-à-dire le transport de la pollution par le mouvement et la vitesse des cours d'eau. En effet, l'écoulement de l'eau agit comme principal vecteur dans la dissémination des particules virales. En parallèle, de nombreux facteurs peuvent affecter la survie des virus dans l'environnement (Fong and Lipp, 2005) tels la température (Bertrand et al., 2012; Ogorzaly et al., 2010) ou les rayonnements UV du soleil (Bosshard et al., 2013; Fisher et al., 2011). Incapables de se multiplier en dehors de leur hôte, la plupart des virus entériques ne peuvent au mieux que survivre aux conditions extérieures jusqu'à être ingérés par un nouvel hôte approprié humain ou animal (Medema et al., 2003). Les risques encourus suite au contact avec une eau préalablement contaminée par des virus entériques suscitent donc de nombreuses questions. Par exemple, à partir de combien de mètres, kilomètres, peut-on se baigner ou pratiquer une activité récréative dans un cours d'eau ayant été contaminé en amont par le rejet d'une station d'épuration ? Ces questions ont toutes leur importance puisqu'à l'heure actuelle, peu d'études ont rapporté des données sur le transport et le devenir des virus infectieux le long d'un cours d'eau (Skraber et al., 2002).

Deuxièmement, l'association des virus avec des particules en suspension peut entraîner leur sédimentation. De nombreuses études ont déjà décrit la présence de virus entériques dans le sédiment (Botero et al., 1992; Leroy et al., 2008; Skrabber et al., 2009) et considèrent ce compartiment comme réservoir de particules virales (Bosch et al., 2003; Rao et al., 1986). De plus, le sédiment jouerait un rôle majeur dans la survie des particules infectieuses, agissant comme bouclier contre les rayonnements UV, les enzymes protéolytiques ou autres agents antiviraux présents dans les eaux (LaBelle and Gerba, 1982).

La capacité des virus à interagir avec des particules solides peut sensiblement influencer sur leur distribution dans le système hydrique. Libres dans l'eau de surface, les virus auront plutôt tendance à rester en suspension et à être disséminés par le courant tandis qu'associés à une particule solide, ils auront tendance à sédimenter. De nombreuses variables influencent l'association des virus avec les particules solides telles que, les propriétés intrinsèques des virus, les conditions physico-chimiques environnementales ou les propriétés de surface du support (Gerba, 1984). La prédiction de ces interactions est difficile. Quelques études ont examiné l'état de la particule virale (libre ou associée à un support) dans les eaux de surface afin de prédire le phénomène de sédimentation (Characklis et al., 2005; Hejkal et al., 1981; Payment et al., 1988). Au regard des matrices analysées

(eau de surface ou effluent de stations d'épuration), il est suggéré que la majorité des virus est libre ou associée à des particules inférieures à $0,3 \mu\text{m}$. Ces résultats suscitent l'interrogation du transfert des particules virales de la colonne d'eau au sédiment.

Enfin, la remise en suspension du sédiment, lors de perturbations naturelles ou anthropiques des cours d'eau, peut entraîner la libération des particules virales qui y étaient stockées (Rao et al., 1986). Même si cela a été souvent énoncé dans la littérature comme une évidence, cette source de contamination virale de la colonne d'eau a rarement été démontrée (Williamson et al., 2014).

Les événements hydro-climatologiques telles que les fortes pluies ont un impact direct sur la dynamique des virus dans les eaux (Jofre et al., 2010). De nombreuses études ont mis en évidence l'augmentation de la charge virale suite à de fortes intempéries dans la colonne d'eau (Cole et al., 2003; Corsi et al., 2014; Ngaosuwanikul et al., 2013). Outre la remise en suspension du sédiment, des apports conséquents en virus entériques peuvent notamment être issus des stations d'épuration, rejetant directement les eaux usées dans les cours d'eau sans passer par des étapes de traitement. De plus, les événements hydro-climatologiques modifient le milieu hydrique. Par exemple, suite à de fortes pluies, les particules solides en suspension sont augmentées (eau très turbide) et la composition chimique de l'eau varie (phénomène de dilution). Ces modifications peuvent impacter les interactions des virus avec leur environnement et donc perturber la pollution virale des eaux.

En réalité, la dynamique des particules virales dans le milieu aquatique suscite toujours de nombreuses questions en ce qui concerne les variables et facteurs contrôlant le comportement *in situ* des particules virales dans le milieu hydrique (Figure 1). Chaque élément de réponse est une avancée à la compréhension du transport et du devenir des virus dans l'environnement, point clé pour prévenir les épidémies liées à l'eau.

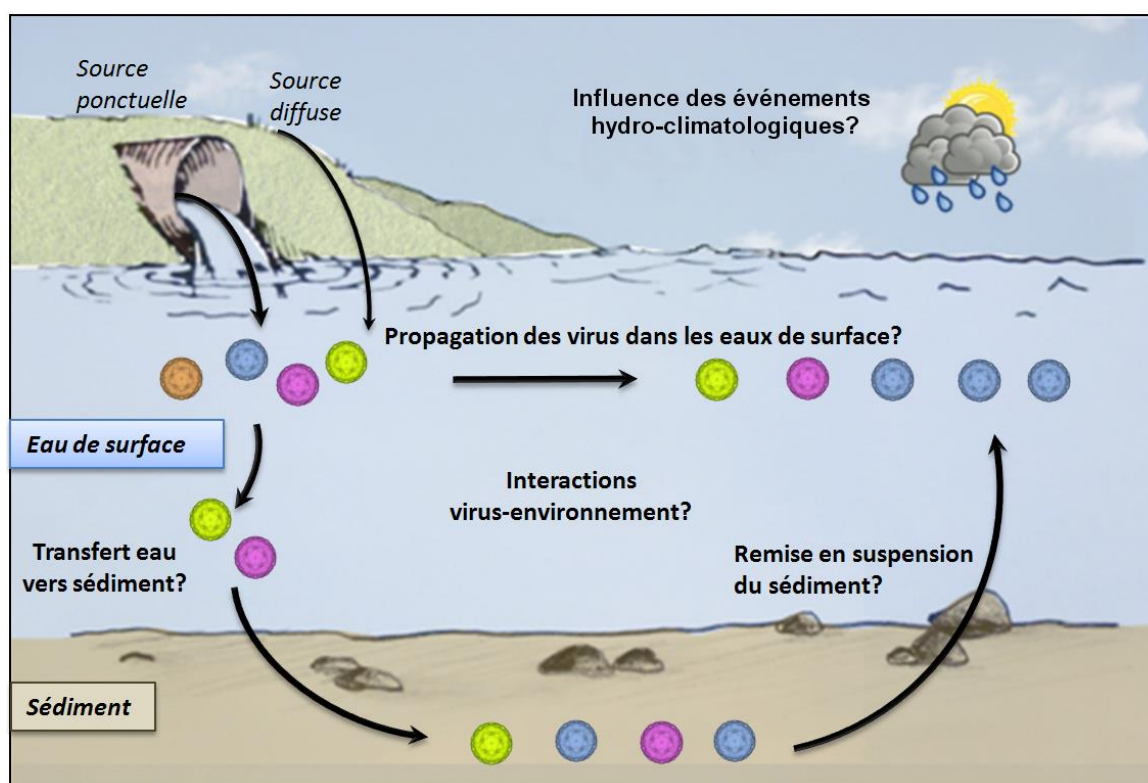


Figure 1 Dynamique des particules virales dans l'environnement hydrique.

A partir des données de la littérature, les hypothèses suivantes ont été énoncées :

- au-delà des facteurs environnementaux, le comportement des virus varie dans le milieu hydrique selon leurs caractéristiques propres ;
- les conditions hydro-climatologiques influencent la dynamique et la charge virale dans le milieu hydrique ;
- les virus sont associés à des particules solides dans la colonne d'eau leur permettant de sédimenter au fond du lit de la rivière ;
- le sédiment est un réservoir à particules virales.

Afin d'arbitrer ces idées, les bactériophages ARN F-spécifiques ont été sélectionnés dans ce travail de thèse comme modèles de virus. L'ubiquité de ces particules virales dans les milieux hydriques, leur facilité de détection ou leur similarité avec certains virus entériques pathogènes constituent des premiers arguments justifiant ce choix. La section 4.2 du chapitre 1 abordera plus en détails les avantages à utiliser les bactériophages ARN F-spécifiques pour l'étude de la dynamique virale dans le milieu hydrique. De plus, l'évaluation du comportement de ces bactériophages a été menée dans la rivière de l'Alzette, l'une des principales rivières du Luxembourg, selon plusieurs critères qui seront présentés section 1.1 du chapitre 2.

La présente étude a donc pour but de mieux comprendre le transport et le devenir des bactériophages ARN F-spécifiques en fonction de leurs caractéristiques propres et des conditions hydro-climatologiques. Le couplage d'approches microbiennes et hydrologiques pour répondre à la question de la propagation des phages dans une rivière constitue l'originalité de cette recherche et lui confère une véritable dimension pluridisciplinaire.

Les quatre objectifs de ce travail sont :

- l'analyse de l'influence *in situ* des facteurs environnementaux sur la dynamique et la survie des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de la rivière de l'Alzette ;
- l'analyse de l'impact des variations hydro-climatologiques sur le transport des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de surface lors de crues ;
- l'analyse de la distribution des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de la rivière de l'Alzette en fonction de leur capacité à interagir avec leur environnement dans l'optique d'apporter des éléments de réponse quant au transfert de ces particules virales de la colonne d'eau vers les sédiments ;
- la caractérisation des sédiments de l'Alzette, en complément des capacités d'attachement des bactériophages ARN F-spécifiques, pour déchiffrer la présence de ces particules virales dans ce compartiment.

La suite de la thèse est structurée comme suit :

Dans un premier chapitre, une étude bibliographique approfondie dédiée à la présence et à la dynamique des particules virales dans le milieu hydrique sera présentée. Le deuxième chapitre de cette étude décrira les stratégies envisagées et les méthodologies employées pour répondre aux objectifs. Une description du site d'étude et sa principale source de pollution virale y sera également présentée. Les chapitres suivants seront dédiés aux résultats et, pour la majorité, seront présentés sous formes d'articles scientifiques publiés dans des journaux internationaux. Ces articles seront précédés d'une introduction les situant dans la démarche globale de la présente thèse et d'une synthèse des principaux résultats obtenus et de leurs interprétations. Ainsi, le troisième chapitre sera dédié à l'étude de la propagation et du devenir des bactériophages ARN F-spécifiques le long de la rivière de l'Alzette en conditions de débit de base. L'influence des événements hydro-climatologiques sur la dynamique des particules virales dans l'eau de surface sera abordée dans le chapitre quatre avec l'analyse d'échantillons d'eau collectés durant deux crues. Le chapitre cinq présentera les interactions des bactériophages ARN F-spécifiques avec les matières en suspension et le sédiment. Le couplage d'observations *in situ* et d'expériences de laboratoire permettront d'émettre une hypothèse sur le transfert des particules virales de la colonne d'eau vers le sédiment. Enfin, le chapitre six sera consacré à la caractérisation du sédiment de l'Alzette dans le but de clarifier la présence et la distribution spatiale des bactériophages ARN F-spécifiques dans le sédiment.

Dans une dernière partie, l'ensemble de ces résultats sera discuté de manière à dégager et à préciser les apports scientifiques de ce travail à la compréhension du transport et du devenir des bactériophages ARN F-spécifiques dans une rivière.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1 Présence de particules virales dans le milieu hydrique

De nombreux virus sont susceptibles d'être véhiculés par le milieu hydrique. Parmi eux, les virus dits « entériques » y sont régulièrement retrouvés. Ce terme englobe l'ensemble des virus capables d'infecter et de se multiplier au niveau des cellules du tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud. Chez l'homme, les virus entériques pathogènes sont excrétés en très grande quantité dans les selles des personnes infectées (de 10^5 à 10^{11} particules virales par gramme de selle) (Bosch, 1998). Les bactériophages entériques, virus infectant exclusivement les entérobactéries du système digestif de l'homme et des animaux, sont également présents dans les eaux environnementales. L'ensemble de ces virus et bactériophages entériques peuvent se propager dans l'environnement à travers différentes routes.

Les effluents des stations d'épuration constituent une source ponctuelle importante de virus et bactériophages entériques dans les eaux de surface. Dans les systèmes conventionnels, des filières biologiques (boues activées) et/ou physico-chimiques (décantation/flottation et coagulation) sont utilisées pour la décontamination des eaux usées. L'ajout d'étapes de désinfections telles l'utilisation de chlore, d'ozone ou de rayonnements UV améliore l'épuration des eaux (Zhang et al., 2016) mais sont actuellement rarement utilisées. Néanmoins, l'efficacité des stations d'épuration classiques ne permet pas une élimination totale des virus et bactériophages entériques ce qui conduit à la décharge de particules virales dans les réseaux naturels aquatiques. Les virus entériques deviennent alors des polluants environnementaux.

D'autres sources diffuses, plus difficilement identifiables, sont également responsables de l'apport de particules virales entériques dans les eaux de surfaces. Par exemple, suite à de fortes pluies, le ruissellement des zones agricoles (pâturage, fumier, etc.) et urbaines (excréments d'animaux domestiques) constitue une source de contamination virale importante. De plus, le transport des particules virales *via* l'infiltration d'eaux contaminées dans le sol peut causer une contamination des eaux souterraines. Autre exemple, les excréments des animaux sauvages, notamment les oiseaux sauvages, sont aussi une source de polluants fécaux et viraux.

La figure 2 représente le cycle des virus et bactériophages entériques dans le milieu hydrique. L'homme et les animaux sont à la fois les contamineurs primaires et les récepteurs finaux des virus entériques véhiculés par l'eau.

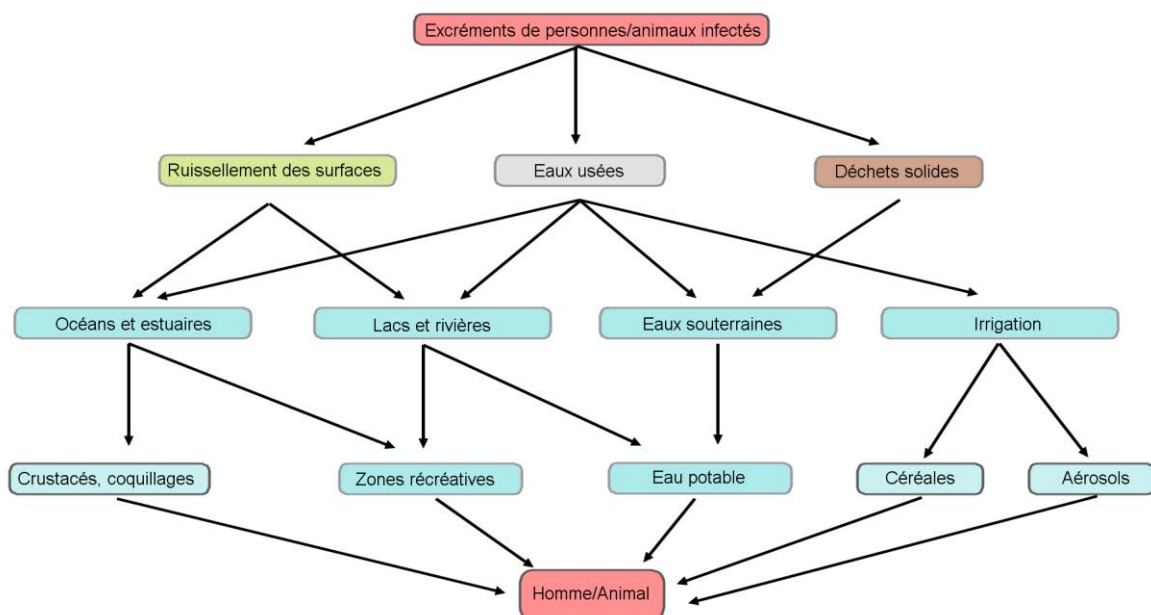


Figure 2 Différentes routes de transmission des virus et bactériophages entériques véhiculés par l'eau. Les eaux usées incluent les eaux issues des stations d'épuration, des fosses septiques et des égouts (exfiltration et raccordements inversés) (adapté de Bosch, 1998).

1.1 Présence dans l'eau de surface

De nombreux virus entériques pathogènes pour l'homme sont détectés dans les eaux de surface. Les adénovirus, les astrovirus, les virus de l'hépatite A et E, les rotavirus, les entérovirus et les norovirus sont les principaux virus pathogènes à transmission hydrique répertoriés dans la littérature (Tableau 1). Les concentrations virales observées dans les eaux de surface peuvent varier de 0 à 10^4 copies de génome par litre selon le type de virus détecté et le site géographique (Tableau 2). D'autres facteurs telles que la dilution, la proportion de personnes infectées dans la population, l'efficacité des traitements d'épuration mis en place ou tout simplement les techniques de concentration et de détection utilisées, peuvent également être à l'origine des variations de concentrations virales. Quoi qu'il en soit, la présence de ces virus pathogènes affecte la qualité de l'eau et pose potentiellement un risque pour la santé humaine.

Tableau 1 Principaux virus entériques humains responsables de pathologies liées à l’eau (Ashbolt, 2004; Bosch, 1998). Les représentations schématisques sont issues du site : <http://viralzone.expasy.org>.

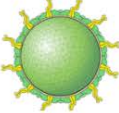
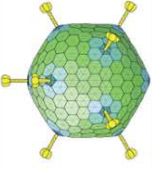
Nom commun des virus entériques	Morphologie des virus	Nature du génome	Maladie	Remarques
Entérovirus : - Poliovirus - Cocksackievirus A - Cocksackievirus B - Echovirus - Autres entérovirus		Capside icosaoédrique de 20 à 30 nm ARN simple brin	Poliomyélite Méningite Encéphalite Infection voies respiratoires	Infections le plus souvent asymptomatiques
Rotavirus		Capside icosaoédrique d'environ 75 nm ARN double brin	Gastroentérite	Principal agent étiologique de gastroentérites virales chez les enfants
Adénovirus		Capside icosaoédrique de 80 à 110 nm ADN double brin	Infection voie respiratoire Conjonctivite Gastroentérite	Très fréquemment retrouvés dans les eaux de surface
Astrovirus		Capside icosaoédrique d'environ 30 nm ARN simple brin	Gastroentérite	Personnes infectées : enfants en bas âge, personnes âgées ou immunodéprimées
Virus de l'hépatite A		Capside icosaoédrique d'environ 30 nm ARN simple brin	Hépatite	
Virus de l'hépatite E		Capside icosaoédrique d'environ 30 nm ARN simple brin	Hépatite	
Norovirus		Capside icosaoédrique de 27 à 30 nm ARN simple brin	Gastroentérite	Principale cause de gastroentérites non bactérienne à travers le monde

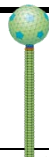
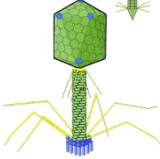
Tableau 2 Aperçu de la présence et de la concentration des virus entériques dans les eaux de surface (adapté de Gerba, 2007; avec ajout de nouvelles publications *).

Localisation	Concentration/ pourcentage de positif	Type d'eau	Références
Etats-Unis	Entérovirus: 0-0,75 UFP/L	Eau récréative	Rose et al., 1987
	Astrovirus: 27,57% (ICC-PCR)	Eau de surface	Chapron et al., 2000
	Entérovirus: 27,5% (ICC-PCR)		
Allemagne	0,5-56 NPPUC/L	Rivières	Walter et al., 1989
Canada	0,1-29 NPPUC/L	Fleuve Saint Laurent	Payment et al., 2000
Corée	Entérovirus (ICC-PCR): 33,3%	Rivière	Han Lee et al., 2005
Pays-Bas	Entérovirus: 0,3-2 UFP/L	Rivières Waal et	Lodder et de Roda Husman, 2005
	Rotavirus (PCR): 57 à 5,4.10 ³ cg/L	Maal	
Espagne	Norovirus (PCR) GI : 75%	Rivière Llobregat	Pérez-Sautu et al., 2012 *
	Norovirus (PCR) GII : 68,5%		
Norvège	Adénovirus humain (PCR) : 61,5% ; 3,3.10 ² cg/L	Rivière Glomma	Grøndahl-Rosado et al., 2014 *
	Norovirus GI (PCR): 61,5%; 6,7.10 ² cg/L		
	Norovirus GII (PCR): 46,2%; 5,9.10 ² cg/L		
France	Entérovirus (culture): 3%	Diverses rivières	Hot et al., 2003
	Entérovirus (PCR): 88%		
	Hépatite A virus (PCR): 1,5%		
	Norovirus GI (PCR): 1,5%		
	Norovirus GII (PCR): 0%		
Luxembourg	Astrovirus (PCR): 3%	Rivière Seine	Prevost et al., 2015b*
	Rotavirus (PCR): 0%		
	Adénovirus (PCR): 93%		
	Norovirus GI (PCR): 88%		
	Norovirus GII (PCR): 92%		
Afrique du sud	Astrovirus (PCR): 36%	Rivière Buffalo	Chigor et al., 2014 *
	Rotavirus (PCR): 57%		
	Adénovirus humain (PCR) : 87,5%, 2,9±0,5.10 ² cg/L		
	Hépatite A virus (PCR) : 35,3%		
	Hépatite A virus (PCR): 37,3%		
Thaïlande	Adénovirus humain : 31 à 2,7.10 ³ cg/L	Barrage	Van Zyl et al., 2006
	Hépatite A virus : 2,3.10 ³ à 9,8.10 ⁴ cg/L		
	Rotavirus : 7,9.10 ² à 2,8.10 ³ cg/L		
	Entérovirus : 0,28 à 1 cg/L		
	Rotavirus: 13%		
Japon	Hépatite A virus (PCR): 15%	Rivière	Inoue et al., 2016 *
	Norovirus GI (PCR): 1,9.10 ⁴ cg/L		
	Norovirus GII (PCR): 7,4.10 ⁴ cg/L		
Chine	Norovirus GI (PCR): 54%	Rivières et lacs	He et al., 2012 *
	Norovirus GII (PCR): 63%		
	Adénovirus humain (PCR) : 44%		
Singapour	Rotavirus (PCR): 48,1%	Zones récréatives	Vergara et al., 2016 *
	Astrovirus (PCR): 5,6%		
	Norovirus (PCR): 4,6%		
Singapour	Adénovirus humain (PCR) : 6,1.10 ² à 8,5.10 ² cg/L	Zones récréatives	Vergara et al., 2016 *
	Norovirus (PCR): 75%, 1,1.10 ³ cg/L (GGI) et 1,5.10 ³ cg/L (GII)		
	Adénovirus humain : 60% ; 1,2.10 ³ cg/L		

UFP : unités formant plages, NPPUC : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes, ICC-PCR : culture cellulaire suivie d'une PCR, cg : copies de génome

Les bactériophages entériques sont également disséminés dans les eaux de surface. Les coliphages somatiques, les bactériophages F-spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis* ont principalement été utilisés comme indicateurs de pollution fécale. Les caractéristiques essentielles de ces bactériophages sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 Caractéristiques générales des familles de bactériophages couramment détectés dans les eaux de surface. Les représentations schématiques sont issues du site : <http://viralzone.expasy.org>.

Nom	Famille	Caractéristiques structurales	Phage modèle (hôte)
Phages de <i>Bacteroides fragilis</i> Bactériophages somatiques	 <i>Siphoviridae</i>	ADN double brin Longue queue non rétractile Capside d'environ 60 nm Capside icosaédrique	B40-8 (<i>Bacteroides fragilis</i>) λ (<i>E.coli</i>)
	 <i>Myoviridae</i>	ADN double brin Longue queue rétractile Capside d'environ 100 nm Capside icosaédrique ou allongée	T2, T4 (<i>E.coli</i>)
	 <i>Podoviridae</i>	ADN double brin Courte queue Capside d'environ 65 nm Capside icosaédrique	T7, P22 (<i>E.coli</i>)
	 <i>Microviridae</i>	ADN simple brin Absence de queue Capside d'environ 25-30 nm Capside icosaédrique	Φ -X174 (<i>E.coli</i>)
Bactériophages F-spécifiques	 <i>Leviviridae</i>	ARN simple brin Absence de queue Capside d'environ 25-30 nm Capside icosaédrique	MS2, GA, QB, FI (bactérie porteuse du plasmide codant pour les pili sexuels)
	 <i>Inoviridae</i>	ADN double brin Capside d'environ 800 x 6 nm Tiges longues et flexibles	fd, M13 (bactérie porteuse du plasmide codant pour les pili sexuels)

Contrairement aux virus entériques pathogènes majoritairement détectés par des outils moléculaires, la présence des bactériophages est très souvent évaluée par l'intermédiaire d'un test d'infectiosité. Ce test consiste à mettre en contact des bactériophages avec une culture bactérienne réceptrice. Le titre ou concentration virale contenu dans l'échantillon est généralement exprimé en unités formant plages (UFP). Plus récemment des outils moléculaires ont été proposés. Ils permettent de quantifier le nombre total de particules phagiques (infectieuses et non infectieuses) en copie de génome (cg). Le tableau 4 donne quelques valeurs de concentrations en bactériophages infectieux (UFP/100 mL) retrouvés dans les eaux de rivière. En moyenne, les concentrations en phages infectieux se situent entre 10^3 et 10^4 UFP/100 mL pour les coliphages somatiques, entre 10^2 et 10^3 UFP/100 mL pour les bactériophages ARN F-spécifiques et entre quelques unités et 10^2 UFP/100 mL pour les phages de *Bacteroides fragilis*.

Tableau 4 Aperçu de la présence et de la concentration des bactériophages entériques dans les eaux de surface (rivière).

Localisation	Bactériophages (souche réceptrice)	Concentrations (UFP/100 mL)/ pourcentages de positifs	Références
Espagne	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> WG5)	2,0.10 ² à 1,4.10 ⁴ / 100%	Durán et al., 2002
	Bactériophages ARN F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49)	1,0.10 ¹ à 6,5.10 ² / 71 à 100%	
	Phages de <i>Bacteroides fragilis</i> (HSP40, RYC2056)	8,0 à 2,0.10 ² / 78 à 100%	
	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> WG5)	~ 5.10 ³	Muniesa et al., 2012
	Phages de <i>Bacteroides fragilis</i> (RYC2056)	~ 3,1.10 ¹	
	Phages de <i>Bacteroides fragilis</i> (GA17PH)	~ 1.10 ²	
Pays-Bas	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> WG5)	1,2.10 ² à 3,2.10 ⁴	Skraber et al., 2009
	Bactériophages F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49)	40 à 2,5.10 ³	
	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> WG5)	10,5 à 1,7.10 ³ / 100%	Lodder et al., 2010
	Bactériophages F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49)	<1 à 4,3.10 ² / 97%	
Suisse	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> O36)	7,9.10 ³ à 3,1.10 ⁴ / 83%	Baggi et al., 2001
	Bactériophages F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49 et <i>E.coli</i> Hfr)	4,0.10 ² à 2,5.10 ³ / 60%	
Etats-Unis	Bactériophages F-spécifiques (<i>E.coli</i> Famp)	<1 à 1.10 ³ 27% phages ARN F-spécifiques 65% phages ADN F-spécifiques	Stewart-Pullaro et al., 2006
	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> CN13)	3,1.10 ²	
Argentine	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> WG5)	6,3.10 ³	Lucena et al., 2003
Colombie	Bactériophages ARN F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49)	5,0.10 ²	
France	Phages de <i>Bacteroides fragilis</i> (RYC2056)	3,9.10 ¹	
France	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> WG5)	1,7.10 ² à 2,0.10 ³	Ogorzaly et al., 2009
	Bactériophages ARN F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49)	1,0.10 ¹	
	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> WG5)	3,2.10 ³	Skraber et al., 2002
	Bactériophages F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49)	2,0.10 ²	
	Phages de <i>Bacteroides fragilis</i> (RYC2056)	58%	
	Bactériophages F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49)	0 à 1,6.10 ³ (site urbain) 0 à 5,0.10 ² (site rural)	Mauffret et al., 2012
Japon	Bactériophages F-spécifiques (<i>S.typhimurium</i> WG49)	1,8.10 ² à 1,1.10 ⁴	Haramoto et al., 2009
		20 à 1,1.10 ³ / 100%	Haramoto et al., 2012
Grande-Bretagne	Coliphages somatique (<i>E.coli</i> WG5)	1,2.10 ³ à 2,2.10 ⁴	Ebdon et al., 2007
	Phages de <i>Bacteroides fragilis</i> (GB-124)	1,0.10 ² à 4,5.10 ³	

UFP : unités formant plaques

1.2 Présence dans le sédiment

De nombreux virus sont présents dans les sédiments des eaux douces (rivières, lacs) et dans les sédiments marins. Beaucoup d'auteurs considèrent le sédiment comme un réservoir de particules virales (Bosch et al., 2003; Rao et al., 1986). L'abondance des virus dans les sédiments a notamment été déterminée par l'intermédiaire de la cytométrie de flux (Brussaard, 2004; Duhamel and Jacquet, 2006; Marie et al., 1999). Une étude a pu dès lors analyser la quantité et la diversité des « virus like particles » (particules de petite taille contenant de l'ADN ou de l'ARN) dans du sédiment provenant d'un lac de cratère volcanique (Borrel et al., 2012). Ces auteurs ont quantifié plus de $30 \cdot 10^9$ VLP/gramme de sédiment sec à la surface et ont également démontré une diminution de la concentration en particules virales corrélée positivement à la profondeur de l'échantillon prélevé (environ $10 \cdot 10^9$ VLP/gramme de sédiment sec à 40 cm de profondeur). Les figures 3 et 4 mettent en évidence la diversité phénotypique des particules virales observées dans cette étude par microscopie électronique à transmission. Les bactériophages entériques représentent finalement une partie très faible par rapport à ces phages autochtones. Par exemple, lorsque la diversité des phages est étudiée, très peu de *Leviviridae* et de *Microviridae* sont observés.

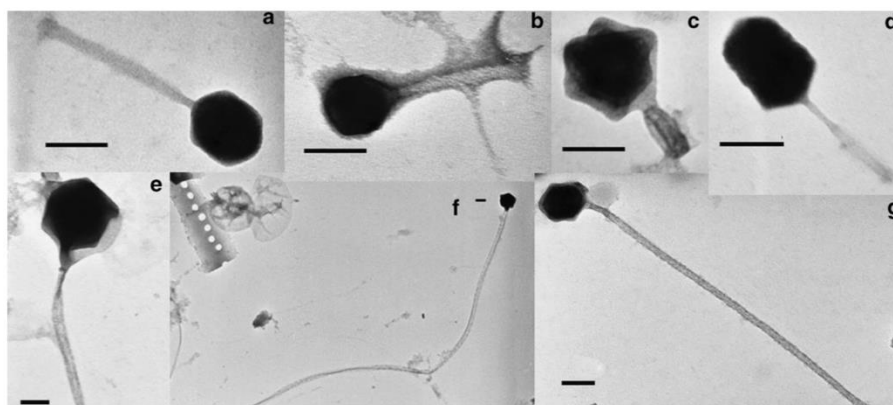


Figure 3 Micrographies électroniques à transmission de virus typiques d'eau douce (*Myoviridae* : a, b et c ; *Siphoviridae* : d, e, f et g) observés dans du sédiment à 40 cm de profondeur. Échelle : 100 nm (Borrel et al., 2012).

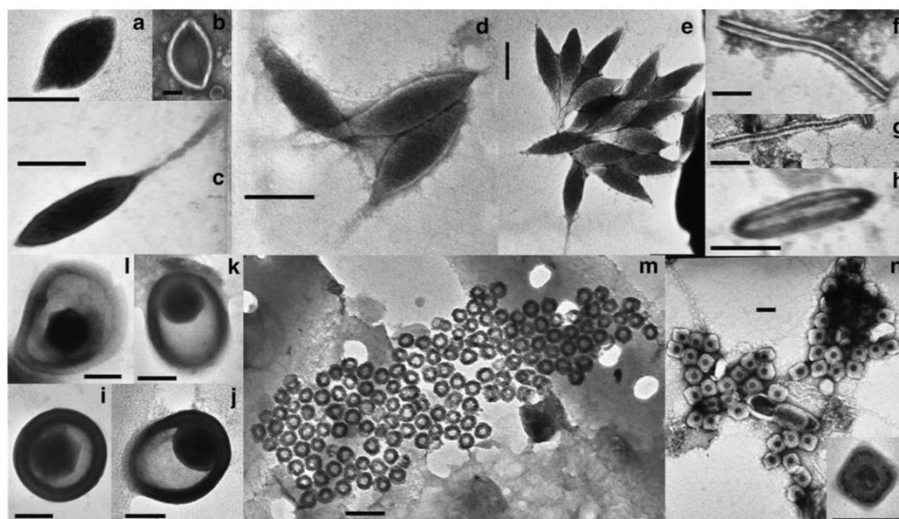


Figure 4 Micrographies électroniques à transmission de nouveaux virus hypothétiques observés dans du sédiment à 40 cm de profondeur. Leur morphologie est pour la plupart similaire aux virus infectant des archées hyper-thermophiles et halophiles. Échelle : 100 nm (Borrel et al., 2012).

Au cours de ces dernières années, beaucoup de méthodes ont été suggérées pour éluer les particules virales du sédiment. De nombreux éluants ont été testés, dont les plus répandus, sont des solutions à base de protéines (extrait de bœuf, sérum de veau fœtal, lait) (Gerba et al., 1977; LaBelle et al., 1980; Pepper et al., 2009; Tsai et al., 1983). Les substances organiques solubles contribuent à l'isolement des particules virales du sédiment en raison de leur compétition pour les mêmes sites d'attachement. Les petites protéines, comme celles contenues dans l'extrait de bœuf, peuvent également s'insérer entre le site d'attachement et la particule virale, réduisant ainsi les forces d'attractions. Ces solutions peuvent aussi être combinées avec des agents chaotropiques pour faciliter l'élution des particules dans le milieu (Wait and Sobsey, 1983). Enfin, des pH élevés (pH 9,0 à 11,5) sont généralement utilisés en parallèle pour améliorer l'élution des virus (Gerba et al., 1977; Guzmán et al., 2007; LaBelle et al., 1980; Skrabber et al., 2009). L'efficacité de ces méthodes d'élution dépend à la fois des caractéristiques de la particule virale, de leur sensibilité aux forts pH ou encore de la nature du sédiment. Déterminée dans plusieurs études, l'efficacité de récupération des particules virales dans le sédiment varie de quelques pourcents à plus de 40% (Bitton et al., 1982; Monpoeho et al., 2001).

A l'heure actuelle, aucune méthode n'a été définie comme méthode de référence pour l'élution des particules virales à partir de sédiment. C'est une des principales raisons expliquant la variation des concentrations en virus retrouvées dans l'environnement (Tableau 5). La présence des virus entériques dans le sédiment est donc largement démontrée, tandis que la quantification de ces particules virales, soit par des méthodes de culture (test d'infectiosité), soit par des techniques moléculaires, suscite encore des questionnements. La compréhension des mécanismes d'attachement des virus à un solide contribuerait à l'amélioration des méthodes d'isolement des particules virales à partir du sédiment.

Tableau 5 Aperçu de la présence et de la concentration des virus entériques dans le sédiment.

Localisation / type de sédiment	Virus entériques détectés	Concentrations / pourcentages de positifs	Méthode de détection	Références
Etats-Unis / sédiment marin	Virus entériques	7 à 10 UFP/1000 g de sédiment / 6%	Culture	Rao et al., 1984
	Virus entériques	0 à 480 UFP/20 L de sédiment	Culture	LaBelle et al., 1980
	Entérovirus	2 à 3,3.10 ² /400 mL de sédiment humide	Culture	Gerba et al., 1977
Espagne / sédiment marin	Coliphages, phages de <i>Bacteroides fragilis</i> , rotavirus, enterovirus		Culture	Jofre et al., 1989
	Coliphages somatiques	<6 à 1,2.10 ⁴ UFP/100 g de sédiment/ 78%	Culture	Lucena et al., 1996
	Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	<6 à 4,4.10 ³ UFP/100 g de sédiment/ 90%		
	Entérovirus	0 à 2,8.10 ² UFP/100 g de sédiment/ 66%		
France Sédiment rivière	<i>Myoviridae</i> , <i>Siphoviridae</i> , <i>Podoviridae</i>		Microscope électronique à transmission	Leroy et al., 2008
Sédiment marin	Entérovirus, virus de l'hépatite A		RT-qPCR	Le Guyader et al., 1994
Italie / sédiment marin	Entérovirus (poliovirus type 1, 2, 3 et echo virus type 6,20, reovirus)		Culture	De Flora et al., 1975
Pologne / sédiment marin	<i>Myoviridae</i> , <i>Siphoviridae</i> , <i>Podoviridae</i>		Microscope électronique à transmission	Jakubowska-Deredas et al., 2012
Pays-Bas / sédiment rivière	Coliphages somatique	10 à 80 UFP/g de sédiment sec	Culture	Skraber et al., 2009
	Bactériophages F- spécifiques	1,2 à 251 UFP/g de sédiment sec		
Venezuela / sédiment de lac	Entérovirus (poliovirus type 1, 2 et echo virus type 20, 27, 29)	79,2%	Culture	Botero et al., 1992
Grande-Bretagne / sédiment de lac	<i>Myoviridae</i> , <i>Siphoviridae</i> , <i>Podoviridae</i>		Microscope électronique à transmission	Hargreaves et al., 2013
Brésil / sédiment rivière	Adénovirus humain	4,3.10 ³ à 6,9.10 ⁴ cg/g de sédiment	qPCR	Staggemeier et al., 2015
Nouvelle- Zélande / sédiment marin	Entérovirus	13 à 33 UFP/100 g de sédiment	Culture	Green and Lewis, 1999
	Virus de l'hépatite A		RT-qPCR	
	rotavirus		RT-qPCR	

UFP : unités formant plages, cg : copies de génome

1.3 Persistance des particules virales

Parasites intracellulaires obligatoires, les virus et bactériophages entériques sont incapables de se multiplier en dehors de leur hôte et demeurent des particules inertes dans l'environnement. La présence de virus entériques dans les réseaux hydriques présente un risque pour la santé humaine que si ces derniers sont capables de subsister aux conditions extérieures. La survie des particules virales, caractérisé par le maintien du caractère infectieux, dans les conditions environnementales a

largement été étudiée au cours de ces dernières années. Deux manières de faire y sont rapportées : (i) des tests en laboratoire où les particules virales sont soumises de manière contrôlée aux conditions extérieures artificiellement recréées ou (ii) des tests *in situ* par l'intermédiaire de sacs à dialyse contenant les virus d'intérêt et permettant le contact avec le milieu extérieur en conditions réelles. Différents facteurs environnementaux affectant la survie des virus dans les eaux ont ainsi pu être mis en évidence.

1.3.1 La température

La température est considérée comme le facteur ayant le plus d'influence sur la survie des particules virales et ce, tous virus confondus (Bertrand et al., 2012; Kutz and Gerba, 1988; Lo et al., 1976; Yates et al., 1985). De manière générale, plus la température est basse et plus les virus persistent longtemps (Hurst et al., 1989; John and Rose, 2005; Ogorzaly et al., 2010; Ravva and Sarreal, 2016). Par exemple, Durán et al. (2002) ont mis en évidence l'inactivation des bactériophages ARN F-spécifiques dans de l'eau de rivière à différentes températures. En hiver, où la température est comprise entre 4 et 10°C, le temps nécessaire pour observer une réduction de 90% des bactériophages infectieux est estimé à 14 jours tandis qu'il avoisine les 2,6 jours en été. L'inactivation des virus par la température peut être causée soit *via* la dénaturation des acides nucléiques et la dégradation des protéines constituant la capside, soit, indirectement, *via* des réactions chimiques ou enzymatiques dégradant la particule virale (Gerba, 2007; Nigel J. Dimmiok, 1967; O'Brien and Newman, 1977). Récemment, Wigginton et al. (2012) ont mis en évidence l'inactivation du bactériophage MS2 à une température de 72°C. Ces auteurs suggèrent des changements protéiques structuraux de la capside sous l'effet de la chaleur empêchant notamment le phage d'infecter ses bactéries hôtes.

Des différences de survie entre les types de virus entériques ont été observées (Tableau 6). Par exemple, Ogorzaly et al. (2010) ont montré une persistance plus importante des adénovirus que des bactériophages ARN F-spécifiques dans de l'eau souterraine à une température de 20°C. D'autres études ont même montré des différences de survie au sein d'une même famille virale, les *Leviviridae*, où les bactériophages appartenant aux génogroupes I et II sont plus résistants que les bactériophages des génogroupes III et IV (Muniesa et al., 2009; Yang and Griffiths, 2013). Ces disparités peuvent être dues à différents facteurs tels que la structure du virus, son génome ou encore ses propriétés de surface contrôlant ses interactions avec l'environnement.

Tableau 6 Taux d'inactivation des virus entériques dans l'eau souterraine obtenus selon une cinétique de premier ordre (d'après Gerba, 2007).

Virus entériques	Température (°C)	Taux d'inactivation (log ₁₀ /jour)
Poliovirus	0-10	0,08
	11-15	0,09
	16-20	0,11
	21-25	0,23
	26-30	1,03
Virus de l'hépatite A	0-10	0,01
	20-25	0,05
	26-30	0,04
Echovirus	11-15	0,11
	16-20	0,12
	21-25	0,18
Coxsackievirus	3-15	0,19
Rotavirus	3-15	0,36

1.3.2 Les rayonnements naturels

Le rayonnement solaire est un facteur important pouvant diminuer la survie des particules virales dans l'environnement aquatique *via* les rayonnements UV. Ce phénomène est d'ailleurs exploité comme procédé naturel de désinfection pour l'épuration des eaux usées dans des zones humides artificielles tel le lagunage (Curtis et al., 1992; Davies-Colley et al., 1999). Fujioka et Yoneyama (2002) ont observé une inactivation des entérovirus plus rapide et importante en présence de lumière que dans l'obscurité. Deux mécanismes distincts peuvent causer l'inactivation des virus. Le premier implique des dommages directs des composants viraux suite à l'exposition aux rayonnements ultraviolets (UV). Le second est la photo-oxydation endogène ou exogène. En présence d'oxygène, l'excitation de composants absorbants la lumière (nommés « photo sensitizers ») induit le transfert d'énergie à d'autres particules formant des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) (Kohn and Nelson, 2007; Romero et al., 2011). Ces radicaux libres, ions oxygénés ou peroxydes sont des espèces chimiques à très forte réactivité capables d'oxyder les protéines et l'acide nucléique des particules virales. Les virus à ADN double brin (par exemple adénovirus) sont plus résistants aux rayonnements UV que les virus à ARN en raison de l'utilisation d'enzymes de réparation à ADN de leur cellule hôte (Carratalà et al., 2013; Gerba et al., 2002). Un exemple de « photo sensitizers » exogène est la matière organique présente dans les eaux de surface (Kohn et al., 2007). Sun et al. (2016) ont mis en évidence qu'une concentration modérée en matière organique affecte la survie des particules virales par la formation de DRO tandis qu'une faible et forte concentration prolonge la survie des virus. En effet, de fortes concentrations en matière organique atténuent et réduisent l'impact des rayonnements UV tandis qu'à de faibles concentrations, l'impact des DRO est compensé par les effets protecteurs (réduction de l'intensité lumineuse et association virus-particules solides).

1.3.3 Le pH

Aux pH naturels des eaux (pH 5-9), les virus et bactériophages entériques sont stables (Gerba, 2007). L'inactivation de la particule virale par l'action du pH a lieu préférentiellement à des pH extrêmes (<3 ou >9) et dépend du type de virus. Par exemple, les entérovirus peuvent survivre à des valeurs extrêmes de 11,0-11,5 pendant de courtes périodes tandis que les adénovirus et rotavirus sont sensiblement inactivés aux pH supérieurs à 10,0 (Gerba and Goyal, 1982). L'action du pH peut également causer des différences d'inactivation des particules virales au sein d'une même famille. Par exemple, Feng et al. (2003) ont mis en évidence des différences d'inactivation entre deux bactériophages ARN F-spécifiques appartenant à la famille des *Leviviridae* pour des valeurs de pH extrêmes inférieures à 6 ou supérieures à 8. Schaper et al. (2002a) ont montré une inactivation plus importante des génogroupes II, III et IV des bactériophages ARN F-spécifiques à pH 10,0 comparée aux bactériophages appartenant au génogroupe I. Les pH environnementaux ne semblent donc pas avoir un rôle direct dans l'inactivation des particules virales. Cependant, ils peuvent influencer l'association des virus avec des particules solides (particules en suspension, sédiment, etc.) et agir indirectement sur la survie des virus dans les eaux.

1.3.4 L'association des particules virales

L'attachement des virus entériques à des particules solides (particules en suspension, sédiment, etc.) joue un rôle majeur dans leur survie. En effet, de nombreuses études mettent en évidence la survie prolongée des particules virales lorsque celles-ci sont associées à du sédiment (Hurst et al., 1980; LaBelle et al., 1980; Nazir et al., 2011; Rao et al., 1984). Par exemple, l'inactivation du poliovirus de type 1 a été étudié en absence et présence de sédiment dans de l'eau marine incubée à 4°C, 24°C ou 37°C (Liew and Gerba, 1980). Le virus est relativement stable à 4°C quel que soit le milieu tandis qu'il s'inactive plus ou moins rapidement à 24°C et 37°C en fonction de la présence de sédiment. A 37°C, l'entérovirus survit 2 jours de plus en présence de sédiment que dans l'eau marine seule ; et d'une manière générale (à 24°C et 37°C), le titre infectieux est toujours d'au moins 1 log₁₀ supérieur à celui mesuré en absence de sédiment. L'effet protecteur des particules solides sur la survie des virus entériques peut être dû à la stabilisation de la capside virale suite à leur attachement, l'accessibilité limitée des rayonnements UV ou à l'interférence avec des enzymes et autres substances virucides présentes dans l'eau. Par exemple, Singer et Fraenkel-Conrat (1961) ont montré l'inactivation des particules virales à la ribonucléase, effet pouvant être diminué suite à l'attachement de cette enzyme à la bentonite. A l'inverse, Gerba et Schaiberger (1975) ont montré que sur l'ensemble des particules solides présentes dans les eaux de surface, certaines ne permettaient pas de prolonger la survie des virus. L'interaction avec des bactéries possédant une activité antivirale ou un attachement irréversible à certains solides pourrait aussi entraîner l'inactivation des virus (Gerba, 1984). La figure 5 illustre les différents états de la particule virale soumise aux différents stress environnementaux.

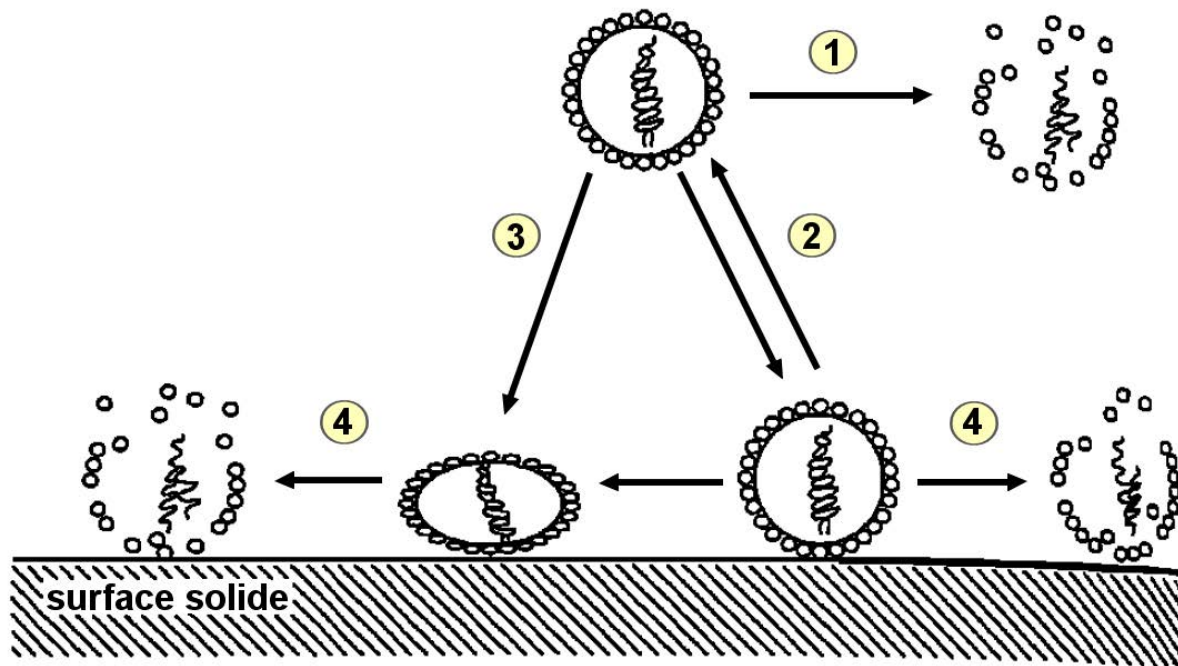


Figure 5 Attachement et/ou inactivation des particules virales à l'interface d'une surface solide. Le virus peut s'inactiver dans l'eau sous l'influence de facteurs environnementaux (1), s'attacher à une surface par l'intermédiaire de réactions réversibles (2) ou irréversibles (3) et s'inactiver après avoir été attaché (4) (adapté de Grant et al., 1993).

1.3.5 Les sels et métaux

La salinité de l'eau peut influencer la survie de la particule virale. De nombreuses études ont effectivement montré une survie prolongée des virus entériques dans l'eau douce en comparaison à l'eau de mer (Akin et al., 1976; John and Rose, 2005). Selon Kapuscinski et Mitchell (1980), ceci serait principalement dû aux propriétés antivirales des microorganismes antagonistes plutôt qu'à l'augmentation en sel. Tout comme le pH, la composition en sels peut également affecter l'association des particules virales avec des particules solides (Gerba, 1984), favorisant ou défavorisant indirectement la survie du virus. Par exemple, Lance et Gerba (1984) montrent que la composition en sels dans l'eau du robinet favorise l'attachement du poliovirus au sable, comparé à une eau déminéralisée.

Certains métaux lourds, tel le cuivre ou l'argent, ont des propriétés toxiques envers les particules virales mais leurs concentrations faibles dans les eaux empêchent leurs effets (Thurman and Gerba, 1988).

1.3.6 Les facteurs biologiques

La présence de certaines bactéries ayant une activité antivirale peut affecter la survie des virus dans les eaux (Gerba, 2005). De nombreuses études ont effectivement montré l'effet néfaste de la flore bactérienne en comparant la survie de virus entériques dans des échantillons naturels et dans des échantillons filtrés ou autoclavés (Fujioka et al., 1980; Melnick et al., 1980). La suppression majeure de la flore bactérienne dans les échantillons traités entraîne une meilleure survie des particules virales. Ce sont majoritairement les enzymes protéolytiques bactériennes qui sont responsables de cette inactivation. Ward et al. (1986) met en évidence l'inactivation des entérovirus (echovirus) dans l'eau douce par clivage des protéines virales *via* les enzymes bactériennes, exposant ainsi l'ARN viral aux nucléases. Encore une fois, cette persistance virale face aux stress biologiques dépend du type de virus. Par exemple, parmi les poliovirus et coxsackievirus, certains sérotypes sont plus résistants (poliovirus type 2, coxsackievirus type B1) que d'autres (coxsackievirus type A9) à une large gamme d'enzymes protéolytiques (Cliver and Herrmann, 1972).

En somme, de multiples facteurs environnementaux peuvent affecter la survie des virus entériques dans les eaux. Même si certains facteurs prédominent dans leur capacité à inactiver les particules virales, comme la température, c'est l'enchevêtrement de toutes les conditions environnementales qui est responsable de cette inactivation. En effet, Kutz et Gerba (1988) ont mis en évidence des différences de taux d'inactivation de virus entériques soumis à des variations de température en fonction de la composition de l'eau (pH, sels, matière organique, etc.). Par exemple, ils ont montré que les virus survivaient plus longtemps dans les eaux souterraines et au contraire s'inactivent plus facilement dans l'eau du robinet. Outre son effet inactivant, l'augmentation de la température peut aussi favoriser le développement de microorganismes endogènes dans les eaux, altérant ainsi, d'une autre manière, la survie des virus dans le milieu (Carratalà et al., 2013b).

2 Evaluation et conséquences de la contamination virale du milieu hydrique

La présence de virus pathogènes pour l'Homme dans les eaux environnementales constitue un risque important pour la santé humaine. Les besoins en eau de l'Homme sont diversifiés. Exploitée comme ressource en eau potable, l'eau environnementale est préalablement traitée par l'intermédiaire d'usines de potabilisation. Les eaux résiduaires ménagères et industrielles sont conduites à des stations d'épuration. L'eau épurée est ensuite directement rejetée dans l'environnement et peut à nouveau être exploitée par l'Homme, bouclant ainsi son cycle d'utilisation (Figure 6).



Figure 6 Cycle des traitements de l'eau pour la consommation et l'activité humaine (source : <http://www.sicoval.fr/fr/nous-connaître/nos-compétences/eau-potable.html>).

L'eau constitue un élément essentiel dans la vie et l'activité humaine. La contamination virale de cette ressource est donc un problème d'intérêt majeur pour la santé humaine. Afin d'aménager des stratégies permettant de limiter les risques suite à un contact direct ou indirect avec une eau contaminée, il est important d'identifier au préalable les dangers et évaluer les facteurs pouvant favoriser la présence de particules virales dans les eaux de surfaces.

2.1 Identification des risques pour la santé humaine

Beaucoup d'études épidémiologiques ont porté sur les risques encourus par l'Homme dus à la présence de microorganismes pathogènes (bactéries, virus et parasites) dans l'eau. Vingt-cinq pourcent de la population globale (1,8 milliards en 2012) consomme de l'eau contaminée par de la matière fécale, ce qui engendre de nombreuses épidémies hydriques (WHO/UNICEF, 2014). Les pays en voie de développement sont les plus touchés : 2,5 à 3,2 millions de morts chaque année en raison d'une infection moyenne à sévère, causant des déshydratations qui peuvent être fatales (principalement chez les enfants, les personnes âgées, ou les personnes immunodéprimées) (UNICEF, 2012). Dans les pays industrialisés, la mortalité est faible, mais les coûts associés aux visites cliniques et aux hospitalisations sont élevés. Par exemple, aux Etats-Unis, durant les années 2011-2012, 32 épidémies associées à la consommation d'eau contaminée ont été relevées localement, entraînant 102 hospitalisations et 14 morts (Beer et al., 2015). Des épidémies hydriques, liées plus spécifiquement à la présence de virus entériques pathogènes dans les eaux, ont aussi été recensées. Par exemple, en 2008, une large épidémie de gastroentérites à norovirus a été observée suite à la contamination d'une eau municipale en Suède (Larsson et al., 2014). Dix-huit pourcent des 13 000 habitants de la ville ont présenté des symptômes, dont les conséquences ont entraîné plus de 900 000 euros de frais généraux pour combattre le problème. La France n'échappe pas à ce phénomène avec 43 épidémies hydriques d'origine virale recensées entre 1995 et 2000 (Lopman et al., 2003). Aujourd'hui, ce problème est entré dans la conscience collective, au point que les vacanciers qui voyagent dans des pays émergents ont tous la crainte d'attraper ce que l'on appelle communément la turista.

Ces épidémies hydriques d'origine virale s'expliquent d'autant plus qu'une faible dose (< 10 à 10^3 virus) est nécessaire pour infecter un individu alors que par ailleurs une très grande quantité de virus est excrétée dans les selles des personnes contaminées présentant ou non des signes cliniques (par exemple, 10^{11} norovirus peuvent être présents par gramme de selles excrétées (Hall, 2012)).

Détectés dans les eaux environnementales, les adénovirus, les astrovirus, les virus de l'hépatite A et E, les rotavirus, les entérovirus (incluant coxsackievirus et poliovirus) et les norovirus sont ainsi responsables de ces épidémies (World Health Organization). La plupart sont communément associées à des maladies modérées à sévères (problèmes respiratoires, oculaires, cutanés, etc.) dont la plus commune reste la gastroentérite. Ces mêmes virus peuvent également entraîner des maladies plus sévères comme une méningite, un cancer (polyomavirus, virus principalement excrétés dans les urines), ou encore une hépatite (virus de l'hépatite A et E).

Il convient toutefois de préciser que malgré la mise en évidence des conséquences de la présence de virus dans l'eau, cela n'implique pas nécessairement que ces virus soient principalement ou majoritairement transmis *via* le milieu hydrique. La transmission directe de personne à personne est, de loin, la plus habituelle (Mathijs et al., 2012).

2.2 Impact des facteurs hydro-climatologiques sur la présence virale dans les eaux de surface

De nombreux facteurs climatologiques ont un impact direct sur la concentration en virus dans les eaux de surface. Par exemple, une température élevée de l'air ambiant induit une augmentation de la température des eaux de surface, ce qui peut influencer négativement la survie des particules virales (Fong and Lipp, 2005; Geldenhuys and Pretorius, 1989; O'Brien and Newman, 1977). A l'inverse, de longues périodes de sécheresse peuvent induire une augmentation de la concentration en virus dans les eaux de surface suite à une réduction du volume d'eau disponible (Senhorst and Zwolsman, 2005). Ces variations de concentrations, influencées par les variations climatiques, peuvent avoir une incidence directe sur la santé humaine (Hofstra, 2011; Hunter, 2003). Les orages et les fortes précipitations, qui peuvent conduire à d'importantes crues, sont les événements hydro-climatologiques ayant le plus d'impact sur la qualité de l'eau (Carlton et al., 2014).

En effet, de nombreuses études ont mis en évidence une corrélation significative entre des fortes intempéries (pluies intensives, orages, crues) et la présence d'épidémies d'origine hydrique (Curriero et al., 2001; Nichols et al., 2009). Par exemple, une étude australienne confirme, à l'aide de procédures statistiques, l'étroite relation entre 1 018 cas de gastroentérites causés par norovirus et des événements de crues (Bruggink and Marshall, 2010). Une étude épidémiologique a également déterminé le risque d'infection suite à l'exposition à des eaux de crues (ingestion directe d'eau contaminée ou contact main-bouche) (De Man et al., 2014). Chez les enfants, ce risque s'élèverait à 33% tandis qu'il resterait plus faible chez les adultes (3,9%).

La présence élevée de pathogènes (virus et autres microorganismes) suite à des événements pluvieux a été confirmée dans de nombreuses publications (Kistemann et al., 2002; Sidhu et al., 2012; Staley et al., 2012). Plusieurs raisons expliquent cette augmentation de la pollution microbienne. Premièrement, les stations d'épuration peuvent être saturées suite à l'apport conséquent des eaux de pluie (ruissellement urbain), et rejeter les eaux usées directement dans les eaux environnementales sans passer par une étape de traitement. Deuxièmement, dans le cas d'un système d'évacuation combiné (eaux usées domestiques et eaux de ruissellement regroupées au sein d'un même déversoir), l'excédent d'eau apporté par de fortes précipitations sature le réseau unitaire avant même son arrivée dans les stations d'épuration. Cet excédent est également directement rejeté dans les cours d'eau (Rodríguez et al., 2012). Pour exemple, Katayama et al. (2004) ont évalué la présence de norovirus et d'entérovirus à la sortie d'une station d'épuration en période de fortes pluies. Ils ont montré une augmentation de 26% de norovirus détectés et de 50% d'entérovirus infectieux lors du déversement des eaux excédentaires. Ces concentrations sont restées élevées pendant 4 jours suite à l'événement pluvieux. La figure 7 illustre ce phénomène et les risques encourus par la population. Dans les systèmes d'égouts séparatifs, des connexions croisées ou des fuites de réseaux d'évacuation peuvent également augmenter l'apport de pollution fécale dans les eaux de surface (Panasiuk et al., 2015).

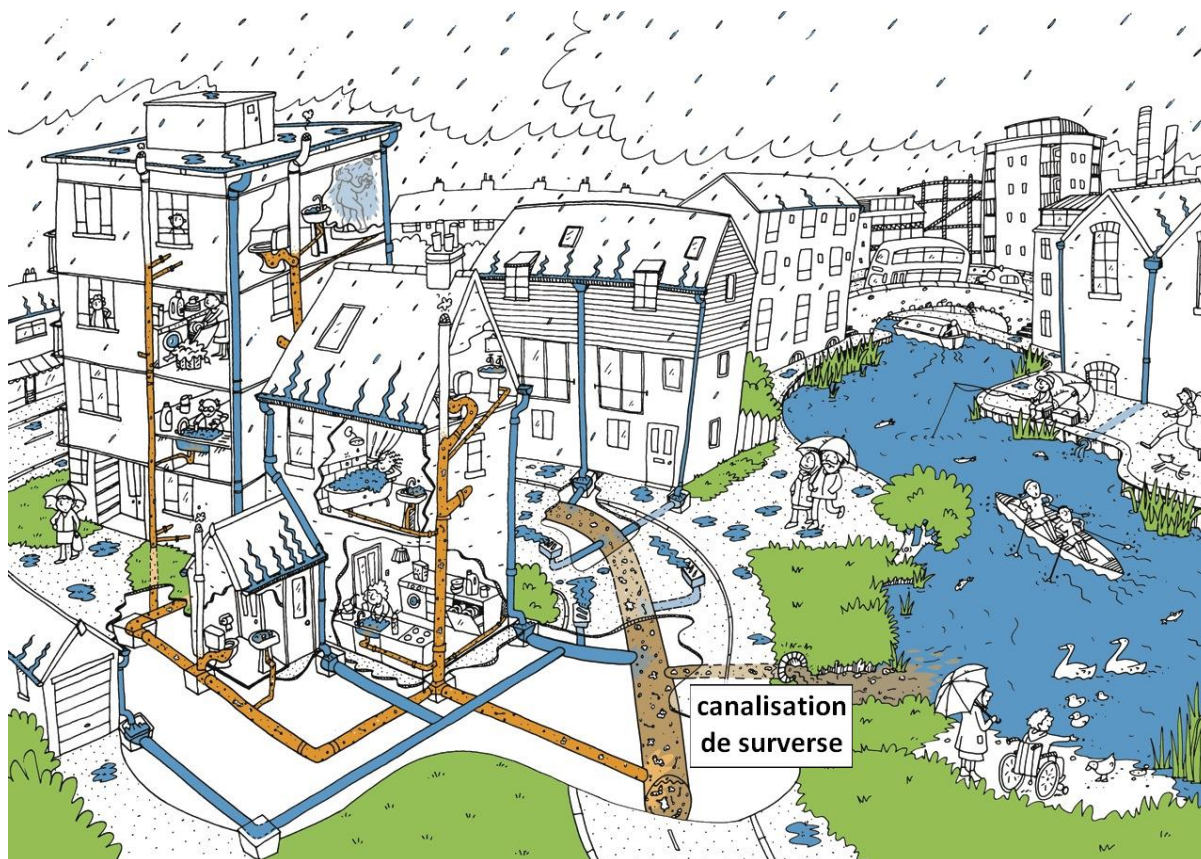


Figure 7 Conséquences de la saturation d'un égout unitaire lors de fortes pluies. Les eaux usées (canalisations orange sur la figure) et les eaux de ruissellement (canalisations bleues) sont rassemblées dans un système d'évacuation unique qui peut déborder lors de fortes intempéries (canalisation de surverse). (Source : <http://www.thames21.org.uk/combined-sewer-systems/>)

L'augmentation de la pollution microbienne est aussi due au lessivage des surfaces agricoles (pâturages, fumier, etc.), entraînant le transport de pathogènes, se trouvant sur et dans les sols, vers l'eau (Williamson et al., 2014). Enfin, la perturbation du système aquatique, suite à de fortes pluies, induit la remise en suspension du sédiment accumulé au fond du lit de la rivière et, par la même occasion des microorganismes qui y étaient stockés (Frey et al., 2015). Ces deux dernières origines de pollution microbienne sont aussi associées à une eau de surface plus turbide. Le schéma de la figure 8 répertorie les origines responsables de l'apport des microorganismes dans les eaux de surface lors de précipitations intenses.

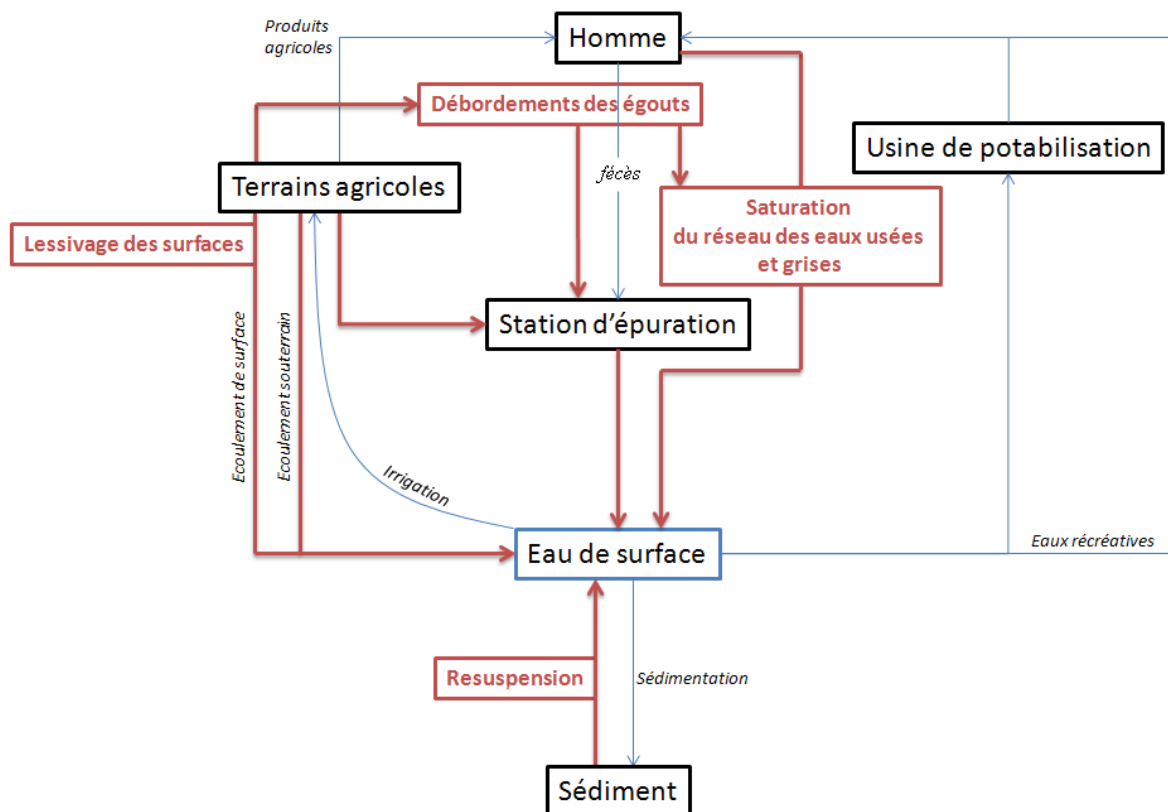


Figure 8 Impact des fortes précipitations sur l'apport de microorganismes dans les eaux de surface (flèches rouges) dans le cadre du cycle de l'eau (flèches bleues).

Néanmoins, l'augmentation de la pollution microbienne lors d'événements pluvieux a principalement été décrite via l'analyse de bactéries fécales. Actuellement, malgré des épidémies virales corrélées aux fortes intempéries, peu d'études ont investigué l'impact de tels événements sur la charge virale présente dans les eaux de surface (Corsi et al., 2014; Ngaosuwankul et al., 2013; Phanuwat et al., 2006). Qui plus est, parmi ces études, seul le génome de virus entériques pathogènes, tels que les adénovirus, les norovirus ou les entérovirus, a été recherché. A notre connaissance, peu d'informations sur l'infectiosité des virus entériques pathogènes lors de crues ne sont actuellement disponibles. Cette information demeure pourtant primordiale pour estimer un risque de contamination de la population.

2.3 Aménagement de stratégies pour diminuer les risques d'infection d'origine hydrique

Définir des stratégies pour diminuer les risques d'infection d'origine hydrique nécessite une bonne compréhension du comportement des particules virales au sein de l'environnement aquatique (Fergusson et al., 2003). En effet, caractériser l'impact des procédés et facteurs responsables du transport et du devenir des virus dans les eaux de surfaces est essentiel pour prédire et contrôler

leur dissémination et propagation du point de contamination aux zones utiles pour l'Homme (ressource d'eau potable, zones récréatives, etc.).

De nombreux modèles mathématiques ont été développés, à partir des données d'observation, pour prédire le transport des microorganismes dans les réseaux aquatiques (Dorner et al., 2006; Hofstra, 2011; Jamieson et al., 2004; Servais et al., 2007; Yakirevich et al., 2013). Ces modèles se basent notamment sur des modèles hydrologiques pour simuler la variation du débit d'un cours d'eau, le lessivage des surfaces ou encore la disponibilité en eau lors des variations hydro-climatologiques. Par exemple, le modèle SWAT (« Soil Water Assessment Tool ») a été conçu pour des bassins fluviaux de quelques centaines à plusieurs milliers de km² (Arnold et al., 1998). Ce modèle est utilisé pour prédire la qualité et la quantité des eaux de surface et des eaux souterraines, et pour prédire l'impact environnemental de l'occupation du sol, des pratiques de gestion des terres et du changement climatique (Arnold and Fohrer, 2005; Baffaut et al., 2010; Niazi et al., 2015). De plus, c'est actuellement un des rares modèles qui a tenté de décrire la répartition des microorganismes attachés ou non à des particules solides (Jamieson et al., 2004). Malheureusement, peu de données concernant les interactions des microorganismes avec leur environnement sont actuellement disponibles pour approfondir cette approche.

De la même manière, peu de modèles prennent en compte dans leur simulation le sédiment comme réservoir de microorganismes et comme source de pollution lors d'intempéries (Bai and Lung, 2005; Jamieson et al., 2005; Kim et al., 2010). Pourtant, il est concevable que la remise en suspension du sédiment constitue un apport important de microorganismes dans la colonne d'eau. Ces interactions entre le sédiment et la colonne d'eau ont récemment été incorporées dans un nouveau modèle prédisant les concentrations bactériennes dans une rivière (Ghimire and Deng, 2013).

Pour améliorer ces estimations, il est donc nécessaire de fournir d'importantes données de pathogènes observés *in situ* afin d'avoir des références et ainsi pouvoir les comparer avec les données modélisées. Il est néanmoins regrettable que ces modèles aient été développés uniquement pour des bassins-versants de pays industrialisés (Australie, Etats-Unis, Europe) et que la contamination virale soit rarement prise en compte. En effet, ces modèles sont principalement basés sur des données bactériennes comme *Escherichia coli* et quelques données parasitaires, tel que *Cryptosporidium*. Néanmoins, ces modèles permettent de fournir un aperçu de la propagation des microorganismes dans les eaux de surface en fonction des variations climatiques et aident à développer de nouvelles stratégies de monitoring et de gestion.

Ainsi, une des stratégies permettant de diminuer les risques d'infection d'origine hydrique est de réduire les quantités de pathogènes entériques rejetées dans les eaux de surface. Deux barrières peuvent être mises en place dans le cycle du traitement de l'eau pour la consommation et l'activité humaine (Figure 6).

En dehors de l'entretien des canalisations et des égouts, l'apport de microorganismes dans les eaux peut être, dans un premier temps, réduit par l'intermédiaire des stations d'épuration. Le traitement des eaux usées est réalisé suite à des procédés biologiques et/ou physico-chimiques. La filière biologique, communément employée, permet l'élimination des composés carbonés présents sous formes solubles. La suppression de cette pollution organique se fait au moyen de microorganismes telles les bactéries (boues activées). La filière physico-chimique utilise des procédés physiques comme la décantation/flottation et/ou chimiques comme la coagulation pour éliminer les particules

solides. Classiquement, ces deux filières sont rencontrées dans les stations d'épuration urbaines. Néanmoins, malgré les progrès en matière de qualité de l'eau, les stations d'épuration n'éliminent pas correctement les virus entériques (Nordgren et al., 2009; Payment et al., 2001; Prado et al., 2011; Prevost et al., 2015a). De plus, l'efficacité d'épuration des stations peut varier selon le type de particules virales. Par exemple, La Rosa et al. (2010) ont mis en évidence une différence d'efficacité d'élimination des entérovirus (35%) par rapport aux norovirus génogroupe II (78%). Cette étude souligne également l'utilisation inadéquate des indicateurs bactériens pour évaluer l'élimination des virus entériques suite à une épuration de plus de 99% pour ces bactéries. D'autres études ont également démontré l'efficacité élevée d'élimination des indicateurs bactériens comparés aux virus entériques (Carducci et al., 2008; Petrinca et al., 2009). Des étapes supplémentaires, comme une désinfection par le chlore ou l'ozone, existent mais sont plus rarement utilisées. Qui plus est, Prado et al. (2011) ont montré que la chloration n'avait pas l'effet tant escompté selon les virus entériques. La présence de matière organique pourrait faciliter l'agrégation de ces virus et donc les protéger de l'inactivation (Petrinca et al., 2009). Ainsi, cette première barrière à la contamination virale ne présente pas une efficacité d'élimination suffisante pour empêcher la circulation de ces pathogènes dans les eaux environnementales.

Afin d'assurer une eau consommable, une deuxième barrière est établie : les traitements de potabilisation. Ceux-ci possèdent de nombreux procédés physico-chimiques supplémentaires à la station d'épuration pour améliorer notamment la qualité microbiologique des eaux de distribution. Parmi ces procédés, les membranes de filtration représentent une barrière physique à la pollution virale tandis que les rayonnements ultraviolets et des oxydants tels que le chlore, la chloramine, l'ozone ou le dioxyde de chlore sont appliqués pour inactiver les virus (Gall et al., 2015; Gibson, 2014). La chloration est actuellement le procédé de désinfection le plus utilisé de par son faible coût et sa simplicité de mise en œuvre (Crittenden et al., 2005). Cependant, ce puissant traitement chloré peut produire de nouveaux composants toxiques et est moins efficace contre certains protozoaires tels que *Cryptosporidium* (Gall et al., 2015). C'est pourquoi l'utilisation de la monochloramine (mélange entre du chlore et de l'ammonium), des ultraviolets ou des membranes de filtration constituent d'autres approches pour éliminer les pathogènes. Cependant, ces pratiques de désinfection ont un prix et ne demeurent pas pour autant parfaites. Par exemple, alors que les adénovirus sont susceptibles d'être inactivé par un traitement au chlore, ces derniers sont hautement résistants à l'utilisation de la monochloramine ou des rayonnements UV (Eischeid et al., 2011). Les recherches continuent dans ce domaine et de nouvelles technologies de désinfection apparaissent telle que l'utilisation de nanoparticules (Kim and Van Der Bruggen, 2010; Qu et al., 2013; Zhou and Smith, 2002). Une autre méthode prometteuse implique l'utilisation combinée de photons et de nanomatériaux pour le traitement microbien des eaux. Les rayonnements UV activent des nanomatériaux photocatalytiques, tels que le titane (TiO_2), qui sont ensuite capables d'inactiver les virus (Shannon et al., 2008). De nouveaux photocatalyseurs, tels que le titane dopé avec de l'azote (TiON) ou avec de l'argent (Ag/TiO_2), présentent des avantages supplémentaires : être activés par l'intermédiaire de la lumière visible (plus faible coût en énergie) et augmenter l'inactivation des virus (Liga et al., 2011). Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune méthode de désinfection n'est efficace contre tous les types de virus étant donné des profils de résistance différents. Il faut donc envisager des approches multi-barrières combinant les traitements qui peuvent garantir la sécurité par rapport aux virus.

3 Les interactions particules virales-environnement, points clés du transport et du devenir des virus dans l'environnement hydrique

La particule virale peut être présente dans l'environnement sous plusieurs états : seule, agrégée avec d'autres particules virales ou attachée à une surface particulière. L'attachement d'un virus à une surface peut considérablement contrôler sa diffusion dans le milieu aquatique. En effet, la sédimentation d'une particule virale seule est difficile à envisager au vu de sa faible densité, tandis qu'elle est plus propice lorsque celle-ci est attachée à une particule solide de masse plus élevée. Ainsi, la connaissance de l'état du virus (seul, agrégé ou attaché à une surface) est essentielle dans l'étude du devenir et du transport des particules virales dans le milieu aquatique. La capacité de la particule virale à interagir avec son milieu va dépendre de nombreuses variables telles que les propriétés de surface du virus, les propriétés du solide ou encore les conditions environnementales.

3.1 Interactions mises en jeu

Trois types d'interactions, d'intensité très différente, sont responsables de l'association entre une particule virale et une surface solide. Selon les propriétés de surface du virus, du support et des conditions physico-chimiques du milieu, certaines de ces interactions prédomineront par rapport aux autres.

3.1.1 *Les interactions électrostatiques ou Coulombiennes*

Certaines particules présentent une charge électrique à leur surface due à la protonation-déprotonation de groupements ionisables. Par exemple, une particule virale, composée d'acides aminés (capside protéiques) et d'acides nucléiques (ADN/ARN) peut exprimer une charge globale, positive ou négative selon les conditions physico-chimiques du milieu. Les interactions électrostatiques interviennent entre deux particules chargées : une force attractive a lieu entre deux particules de charges opposées tandis qu'une force répulsive s'établit entre deux particules présentant une charge de même signe (Figure 9). L'intensité de ces forces électrostatiques est inversement proportionnelle à la distance : plus les particules sont éloignées plus l'intensité de ces forces sont réduites.

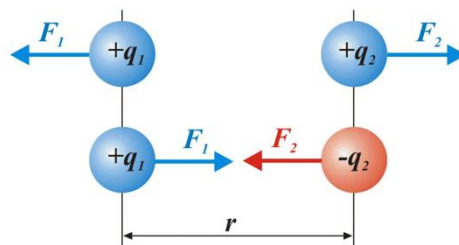


Figure 9 Forces électrostatiques (vecteur F) entre deux particules chargées positivement $+q$ (bleu) ou négativement $-q$ (rouge) éloignées d'une distance r (d'après Robert, 2010).

L'implication des interactions électrostatiques dans l'attachement du virus à un support a largement été démontrée (Lukasik et al., 2000; Schaldach et al., 2006; Shields and Farrah, 1983).

3.1.2 *Les interactions de Van der Waals*

Tout comme les interactions électrostatiques, les forces de Van der Waals sont d'origine électrique mais d'intensité plus faible. Celles-ci proviennent de l'interaction entre les électrons d'une molécule et les charges de l'autre (interaction dipôle/dipôle). Le plus souvent, ces forces sont attractives à courtes distances (0,3 - 0,8 nm) et deviennent répulsives à très courtes distances (<0,3 nm) par l'interpénétration des nuages électriques. Bien qu'aucune description ou quantification de ces forces ne soit à ce jour connue pour les particules virales, les interactions de Van der Waals n'en demeurent pas moins importantes. Elles sont à la base d'un grand nombre de phénomènes plus ou moins complexes, présents aussi bien en chimie, en biologie et en physique du solide. Par exemple, les forces de Van der Waals auraient un rôle central dans les processus "hôte-récepteur" lors de réactions impliquant des protéines (Brutschy and Hobza, 2000).

3.1.3 *Les interactions hydrophobes*

Le terme d'interaction est, dans ce cas, à utiliser avec précaution. En effet, ce terme est utilisé suite au rassemblement de molécules hydrophobes dans un milieu hydrophile (par exemple, l'eau). Or, il suffit de changer le solvant pour que les molécules hydrophobes se séparent. Le rassemblement des molécules hydrophobes n'est donc pas dû à des « interactions hydrophobes », mais à la maximisation de l'entropie du solvant. Pour comprendre cela, prenons pour exemple des molécules hydrophobes dans de l'eau. Celles-ci vont se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'eau. En parallèle, les molécules d'eau sont contraintes à s'orienter. Ces positionnements maximisent l'entropie du système, qui toutefois, est diminuée par rapport à l'eau pure (les molécules d'eau, sans aucune contrainte, peuvent s'orienter de façon désordonnée : agitation moléculaire).

L'effet hydrophobe ne peut pas être négligé puisqu'il peut être jusqu'à 100 fois supérieur aux interactions de Van der Waals et aux interactions électrostatiques. Qui plus est, ses conséquences dans l'attachement des particules virales à des surfaces ont été largement décrites (Bales et al., 1993; Lytle and Routson, 1995; Shields and Farrah, 2002).

3.2 Variables affectant les interactions particules virales-environnement

L'association des virus avec des particules solides dépend de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques développés ci-dessous.

3.2.1 Nature du virus

La capacité d'attachement d'un virus dépend grandement du virus étudié. Les propriétés de surface (charge et hydrophobicité) propres à chaque virion jouent effectivement un rôle important dans l'attachement du virus à une particule solide.

La charge globale du virus résulte de l'ionisation de ses acides aminés et de son acide nucléique (Figure 10).

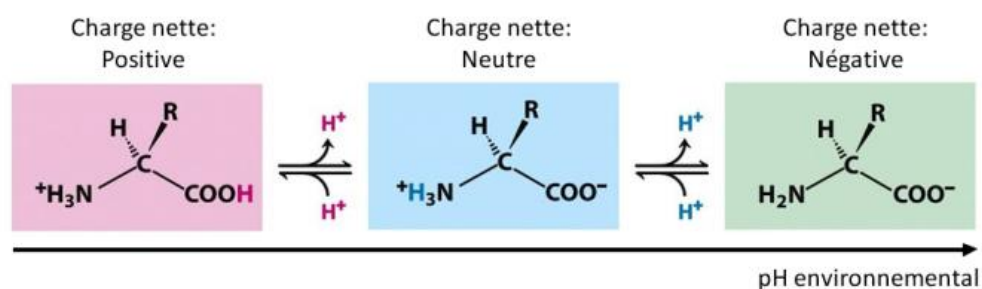


Figure 10 Schématisation de l'état de protonation de la chaîne latérale des acides aminés en fonction du pH.

Le point isoélectrique (pI) correspond à la valeur de pH pour laquelle la charge globale du virus est nulle. La connaissance du pI d'un virus permet de déterminer sa charge globale en fonction du pH du milieu (Figure 11).

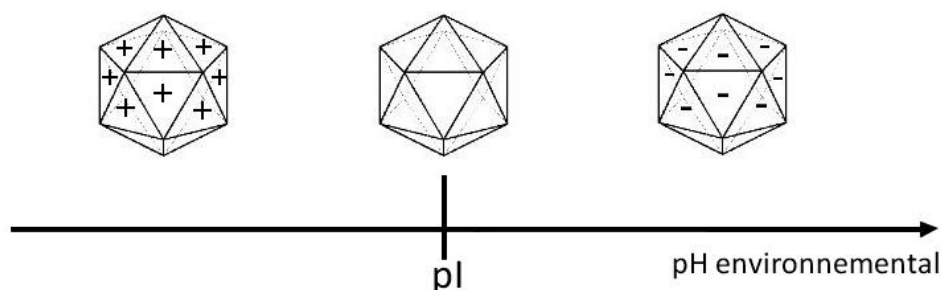


Figure 11 Schématisation de la charge globale d'une particule virale et du point isoélectrique (pI), soumis à une variation du pH.

Les pI de 150 virus ont été recensés et présentent une valeur moyenne de $5 \pm 1,3$ (Michen and Graule, 2010). Etant donné que dans les conditions naturelles, le pH avoisine des valeurs de 7, on peut donc en déduire que la plupart des virus répertoriés dans les eaux de surface sont chargés négativement. Gerba et al. (1980) ont montré des différences d'attachement entre différents types et souches d'entérovirus à des sols, boues et sédiments. La variation du pI, non seulement entre types de virus mais aussi entre souches, peut être à l'origine de cette différence d'attachement.

L'hydrophobicité du virus est due aux polypeptides de la capside contenant des domaines hydrophiles et hydrophobes. Le caractère hydrophile-hydrophobe varie d'un virus à l'autre. Par exemple, Dika et al. (2013) montrent que l'attachement des bactériophages MS2, GA et Q β suit systématiquement la séquence d'hydrophobicité suivante : GA > Q β > MS2, quel que soit le support

étudié (verre, acier inoxydable et polypropylène lorsque les interactions électrostatiques sont minimisées par l'augmentation de la force ionique).

La nature de la particule virale, facteur prédominant dans les interactions virus-environnement, n'est néanmoins pas l'unique facteur contrôlant ces associations. LaBelle et Gerba (1979) ont mis en évidence différents degrés d'affinité de deux virus entériques (entérovirus et rotavirus) pour du sédiment marin. La sensibilité d'attachement de ces virus dépendrait aussi des conditions environnementales tels que le pH, la salinité du milieu ou encore la présence de matière organique.

3.2.2 Nature de la surface de contact

De la même manière que les particules virales, les propriétés physico-chimiques de la surface de contact jouent un rôle important pour l'attachement du virus.

La charge du support est un facteur clé pour l'attachement de la particule virale. Sobsey et Jones (1979) sont parmi les premiers à utiliser des filtres chargés positivement pour retenir les virus entériques chargés négativement. L'attachement du virus à une surface, par l'intermédiaire des interactions électrostatiques, est largement mis à profit dans des méthodes de concentration des virus présents dans les eaux (Cashdollar and Wymer, 2013; Ikner et al., 2012).

L'hydrophobicité du support joue également un rôle dans l'attachement du virus. Par exemple, Lukasik et al. (2000) ont mis en évidence l'importance de l'effet hydrophobe dans l'attachement d'entérovirus (poliovirus 1) aux filtres de nitrocellulose.

La charge et la balance hydrophile/hydrophobe du support sont donc essentielles à l'attachement des virus. Cependant, leurs caractérisations, et par conséquent la compréhension des interactions responsables dans l'attachement des virus, restent nettement plus compliquées lorsqu'il s'agit d'une matrice environnementale complexe tel que le sédiment.

Plusieurs publications ont malgré tout mis en évidence l'attachement des particules virales au sédiment (LaBelle et al., 1980; Liew and Gerba, 1980) ou au sol (Moore et al., 1982; Taylor et al., 1981). Mais, c'est par l'intermédiaire de minéraux de surface, telles les argiles, que les mécanismes d'attachement ont été les plus décrits (Tableau 7).

Tableau 7 Exemples de publications mettant en évidence l'association de particules virales avec différents groupes de minéraux argileux.

Minéraux argileux	Virus étudiés	Références
montmorillonite	Virus encéphalomyocardite	Schaub and Sagik, 1975
bentonite	Bactériophage MS2	Stagg et al., 1977
kaolinite, montmorillonite	Reovirus type 3 et coliphage T1	Lipson and Stotzky, 1985
montmorillonite	Poliovirus 1	Gantzer et al., 1994
hectorite, saponite, kaolinite	Bactériophage T2, MS2 et ϕ X-174	Chattopadhyay and Puls, 1999
kaolinite, bentonite	Bactériophages MS2 et ϕ X-174	Syngouna and Chrysikopoulos, 2010
kaolinite, bentonite	Adénovirus humains et bactériophages MS2 et ϕ X-174	Bellou et al., 2015

Les minéraux argileux sont abondants dans les sols et sédiments et sont également présents dans les eaux de surface en tant que particules en suspension. Ils présentent un important pouvoir adsorbant en raison de leur capacité d'échange ionique et d'une grande surface d'échange. Néanmoins, tout comme les particules virales, les minéraux argileux présentent une charge globale négative dans les conditions environnementales. Théoriquement, des forces de répulsion devraient donc avoir lieu entre les particules virales et argileuses empêchant leur attachement. Expérimentalement, les résultats en sont pourtant tout autres et plusieurs explications y sont développées.

Dowd et al. (1998) justifient l'attachement du bactériophage MS2 par la présence d'une double couche de cations associée à la surface négative de la particule argileuse (Figure 12). Ce phénomène est expliqué par la théorie de la double couche (modèle de Stern). Les colloïdes, chargés négativement, attirent des particules chargées positivement *via* des interactions électrostatiques. Il est à noter que plus on s'éloigne du colloïde, plus ces interactions deviennent faibles, amenant à la formation d'une double couche : l'une dense, accolée au colloïde et l'autre, diffuse, plus éloignée où les forces électrostatiques s'amoinissent jusqu'à devenir nulles

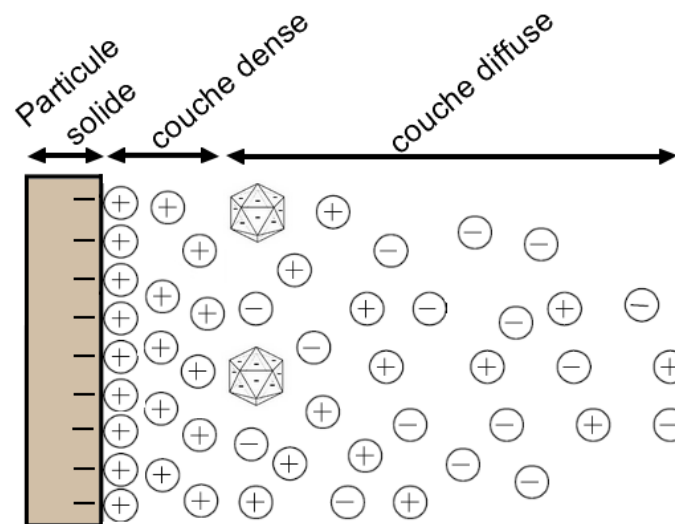


Figure 12 Modèle de la double couche, possible explication selon Dowd et al. (1998) de l'attachement du bactériophage MS2 aux particules solides. L'excès de cations attire des particules chargées négativement (comme les particules virales).

D'autres auteurs, à l'inverse, utilisent la théorie de la double couche pour expliquer la suspension des particules dans les eaux (Schaub and Sagik, 1975). La double couche chargée positivement compenserait la charge électrique portée par le colloïde. L'ensemble (particule + double couche) n'aurait donc plus d'influence électrostatique sur son environnement et ne permettrait pas l'attachement de particules virales. C'est l'apport supplémentaire de cations qui permettrait de réduire l'épaisseur de la double couche et ainsi permettre aux virus et aux solides d'interagir *via* les forces de Van der Waals (Lipson and Stotzky, 1983).

Dans tous les cas, la composition en électrolytes semble être la première explication de l'attachement d'un virus sur une surface argileuse *via* des interactions électrostatiques.

L'hydrophobicité et la taille des minéraux argileux constituent les autres explications possibles. Par exemple, Chattopadhyay and Puls (1999) mettent en évidence un meilleur attachement du

bactériophage MS2 sur de l'hectorite que sur de la kaolinite, ce dernier étant moins hydrophobe et possédant une surface d'échange moins importante. Les différences physico-chimiques entre les minéraux argileux expliquent ainsi les différences d'attachement observées pour un même virus entre plusieurs minéraux (Lipson and Stotzky, 1985, 1984; Syngouna and Chrysikopoulos, 2010).

3.2.3 Composition chimique du milieu

La composition chimique du milieu intervient aussi bien dans les processus d'attachement que dans les processus d'agrégation. Lance et Gerba (1984) ont mis en évidence l'importance de la composition chimique du milieu pour l'attachement d'un virus à une surface. Dans leur étude, ils ont montré que l'attachement du poliovirus 1 aux particules du sol était nettement plus important dans de l'eau du robinet que dans de l'eau déionisée.

Un ion est caractérisé par sa nature (cation ou anion), par sa valence (ion monovalent ou plurivalent) et par sa concentration. Les ions impactent l'attachement des virus de deux manières.

- La modification des propriétés électrostatiques de surface

Comme expliqué précédemment, la double-couche électrostatique (modèle de Stern, Figure 11), formée par l'intermédiaire de la composition ionique du solvant, peut entraîner une modification de la charge de surface de l'adsorbant. Mix (1974) propose que l'effet des électrolytes peut être plus qu'une simple modification de charge. La présence d'ions multivalents permettrait la liaison d'un virus et d'un adsorbant de même charge par la formation de ponts salins. En effet, de nombreuses publications ont mis en évidence un meilleur attachement de virus à une surface suite à l'ajout d'ions calciques (Ca^{2+}) (Knappett et al., 2008; Pham et al., 2009; Schaub and Sagik, 1975; Zhuang and Jin, 2003a). Des variations peuvent avoir lieu en fonction de l'ion bivalent présent en solution. De nombreux résultats suggèrent par exemple un meilleur attachement de la particule virale au support en présence de cations Ca^{2+} que Mg^{2+} (Gutierrez et al., 2010; Pham et al., 2009; Zhuang and Jin, 2003a). Une modification de la charge globale de la particule virale peut aussi avoir lieu selon la concentration et la valence des ions présents en solution (force ionique). A faible force ionique, la capsid du bactériophage MS2 présente une perméabilité plus élevée qu'à forte force ionique, permettant la contribution de la charge négative de l'ARN à la charge globale (Langlet et al., 2008b).

- La compétition pour les sites de fixation

Zhuang et Jin (2008) mettent en évidence une compétition des sites de fixation pour l'attachement des bactériophages MS2 et $\phi\text{X-174}$ à de la goethite. Ils constatent que l'apport d'anions phosphates (PO_4^{3-}) réduit l'attachement des virus suite à la compétition entre les bactériophages et ions phosphates pour les sites chargés positivement.

De plus, la composition et la concentration en ions d'un milieu influencent les interactions électrostatiques et hydrophobes (Gerba, 1984; LaBelle and Gerba, 1979; Taylor et al., 1981).

D'une part, l'intensité des interactions électrostatiques peut être influencée par la force ionique du milieu (Bales et al., 1993; Chu et al., 2000; Sadeghi et al., 2011; Zhuang and Jin, 2003a). La force ionique tient compte de la concentration molaire et de la valence des ions en solution. Shields et Farrah (2002) mettent en évidence une diminution de l'attachement du bactériophage MS2 (chargé négativement) à une membrane hydrophile chargée positivement suite à l'augmentation de la force

ionique. Malgré des différences de charges, l'effet hydrophobe domine sur les interactions électrostatiques.

D'autre part, l'effet hydrophobe peut être renforcé suite à la présence de sels anti-chaotropiques dans le milieu (Farrah et al., 1981). Des ions, tels que le fluorure (F^-) ou le nitrate (NO_3^-), facilitent les interactions intramoléculaires comme l'effet hydrophobe. A l'inverse, des sels chaotropiques facilitent l'élution des virus attachés sur des membranes (Figure 13).

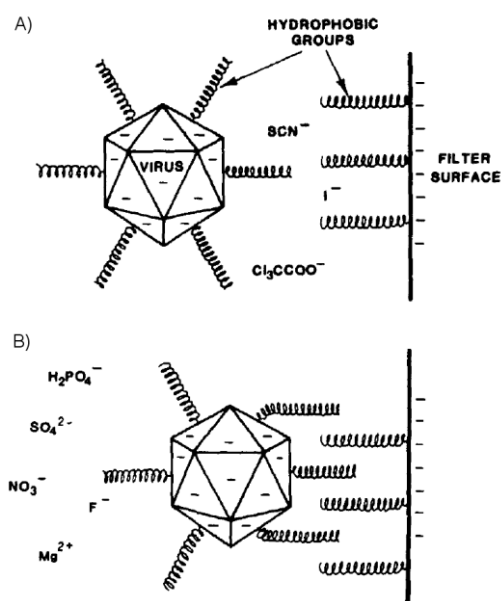


Figure 13 Influence des agents chaotropiques (A) et anti-chaotropiques (B) sur l'interaction (effet hydrophobe) d'un virus à une surface (d'après Gerba, 1984).

Enfin, le pH contrôle la charge globale de l'adsorbant et de la particule virale en entraînant la protonisation ou déprotonisation de leurs groupements ionisables. Selon les points isoélectriques des virus et des particules solides, la charge des différents éléments va varier en fonction du pH de la solution. Par exemple, Zhuang and Jin (2008) ont montré un meilleur attachement à pH 7,5 qu'à pH 9,3 entre la goethite ($pI=7,1$) et le bactériophage MS2 ($pI=3,9$). En effet, à pH 7,5 davantage de charges positives sont présentes sur le minéral permettant l'attachement des particules virales négativement chargée.

En somme, la composition chimique du milieu (composition et concentration en ions, pH) influence, par de multiples procédés souvent entrecroisés, l'attachement de la particule virale à une surface les rendant d'autant plus complexes.

3.2.4 Température

La température peut également intervenir dans les processus d'attachement. En effet, l'augmentation de la température augmente l'agitation thermique (mouvements stochastiques des particules) favorisant ainsi l'attachement. Syngouna et Chrysikopoulos (2010) mettent en évidence

un meilleur attachement des bactériophages MS2 et ϕ X-174 à des particules d'argile lorsque la température est plus élevée. L'agitation thermique permettrait une meilleure accessibilité aux sites d'attachement. Cependant, une augmentation trop importante de la température déstabilise les protéines de la capsid virale et réduit donc la capacité d'attachement du virus (Feng et al., 2003). Plus récemment, Brié et al. (2016) démontrent qu'un traitement à la chaleur peut augmenter, au moins transitoirement, l'hydrophobie du bactériophage MS2. Il faudrait alors envisager que toutes les particules virales n'aient pas les mêmes propriétés de surface selon les traitements qu'elles ont subi.

3.2.5 Matière organique

La matière organique est présente dans tous les écosystèmes aquatiques à des concentrations variées. De la même manière que les particules virales, la matière organique, majoritairement chargée négativement en conditions naturelles, interagit avec les colloïdes de l'environnement *via* les interactions électrostatiques et hydrophobes (Philippe and Schaumann, 2014). Celle-ci peut donc entrer en compétition avec les virus pour l'attachement à un même support. C'est ce que démontrent de nombreuses publications visualisant une diminution de l'attachement d'un virus à une surface suite à l'addition de matière organique (Cao et al., 2010; LaBelle and Gerba, 1979; Lipson and Stotzky, 1984; Moore et al., 1982; Pham et al., 2009). Ce sont principalement les interactions électrostatiques qui sont impactées suite à l'apport de matière organique dans un système (Zhuang and Jin, 2003a). La figure 14 présente les différents procédés responsables de la réduction des particules virales attachées à un support suite à l'apport de matière organique.

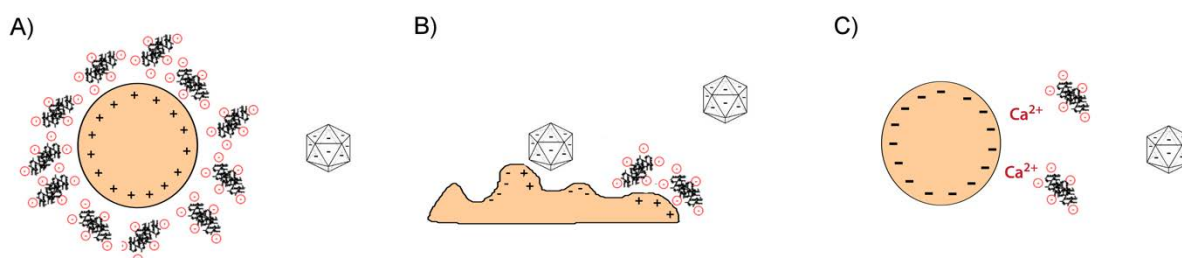


Figure 14 Impact de la matière organique sur l'attachement d'une particule virale à une surface. La matière organique peut (A) augmenter la répulsion électrostatique entre le virus et la surface en modifiant la charge nette de cette dernière, (B) induire le blocage des sites d'attachement des virus, ou (C) s'accaparer les cations bivalents nécessaires à l'attachement des particules virales (ponts salins).

La matière organique et les particules virales peuvent également se retrouver au sein d'une même entité dans le milieu hydrique, appelés floccs naturels. Ces micro-écosystèmes individuels sont composés de particules inorganiques et organiques (viables et non viables) (Droppo, 2003). De par leur taille et densité, plus élevées qu'un grain individuel, ces entités peuvent sédimenter plus vite que des particules seules. Ces floccs naturels peuvent donc favoriser l'apport de microorganismes telles les particules virales au fond du lit de la rivière (Droppo et al., 2010).

3.3 Prédiction des interactions virus-surfaces solides dans l'environnement

Différents modèles décrivent l'attachement des virus à une surface : les plus connus étant les isothermes de Langmuir et Freundlich (Gerba, 1984; Grant et al., 1993; Schijven and Hassanizadeh, 2000). Le modèle de Langmuir est basé sur trois hypothèses : (i) la capacité maximale d'attachement du virus correspond au recouvrement par une monocouche de la surface de l'adsorbant (saturation des sites), (ii) l'énergie d'attachement est uniforme (homogénéité des sites actifs pour l'attachement du virus) et (iii) il n'y a pas d'interactions entre les molécules attachées à la surface. L'isotherme de Freundlich améliore en quelques points le modèle de Langmuir. Dans celui-ci, aucune hypothèse n'est axée sur l'homogénéité des sites de fixation. Ces modèles sont largement appliqués dans des expériences en mode « Batch » où un équilibre est atteint entre la quantité de virus attachés (saturation des sites de fixation du support) et la quantité de virus demeurant libres en suspension (Schijven et al., 2000). Néanmoins, peu d'études appliquent ces modèles dans des conditions environnementales.

La théorie DLVO (acronyme pour les initiales des auteurs : Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) a été élaborée pour décrire les forces d'interaction liées à l'agrégation et à l'attachement d'une particule dans un système. Seules les interactions électrostatiques et de Van der Waals sont prises en compte dans cette théorie. Cependant, certaines données de la littérature montrent des limites à ce modèle (Dika et al., 2013). En effet, la théorie DLVO omet l'effet hydrophobe, qui est très important dans les interactions virus-environnement. De plus, ce modèle est adapté uniquement pour les sphères dures imperméables, ce qui n'est pas le cas pour une particule virale. En effet, le virus est une nanoparticule souple, composée de multicouches (Langlet et al., 2008a, 2008b). Ces auteurs ont démontré les différentes couches molles qui constituent les bactériophages ARN F-spécifiques : la capside protéique (la couche la plus externe) et les deux couches formées par la disposition du génome (Figure 15). Par exemple, Dika et al. (2011) ont comparé les propriétés du phage MS2 et ceux de « Virus-Like-Particles » (VLP) de MS2. Dans ce contexte, « Virus-Like-Particles » signifie une capside virale synthétique dépourvue de génome viral, à différencier des VLPs utilisées précédemment pour décrire des particules dites virales dans les sédiments. Ces auteurs ont mis en évidence des profils d'agrégation significativement différents sous un pH donné pour les deux particules (phage MS2 et VLP).

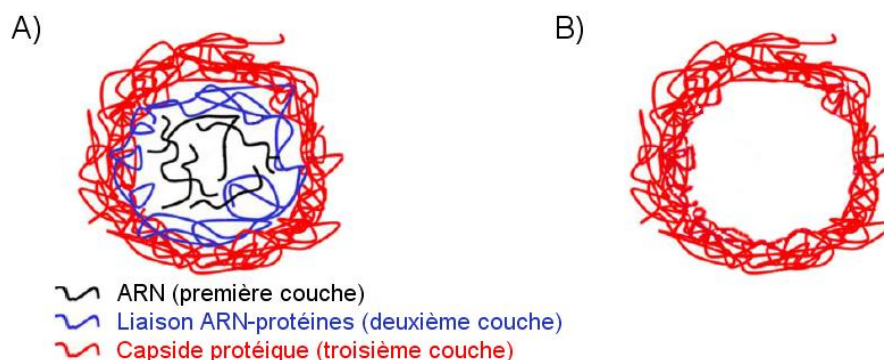


Figure 15 (A) Représentation simplifiée des multicouches du bactériophage MS2 (adapté de Langlet et al. (2008b) et (B) d'une VLP de MS2.

En d'autres termes, le comportement d'une particule virale n'est pas simplement dû aux interactions en surface. Le génome interne est également à prendre en compte pour la prédiction de l'interaction virale dans l'environnement. L'amélioration du modèle DLVO ou le développement d'une nouvelle théorie compatible avec les observations expérimentales est donc difficile.

4 Les bactériophages ARN F-spécifiques : modèles de la dynamique des virus dans l'environnement hydrique

A l'heure actuelle, l'estimation de la qualité microbiologique de l'eau repose essentiellement sur la recherche d'indicateurs bactériens tels qu'*Escherichia coli*, les coliformes totaux ou les entérocoques intestinaux. La détection de ces indicateurs bactériens atteste de la présence d'une contamination fécale dans les eaux mais ne permet pas de confirmer le risque pour la santé humaine. L'étude de ces bactéries est donc considérée uniquement comme un système d'alerte dans la prédiction d'infections hydriques. De plus, la communauté scientifique a émis des doutes quant à la capacité de ces indicateurs à prédire le comportement des virus dans l'environnement et au cours du traitement des eaux. En effet, des études ont montré un manque de corrélation entre indicateurs bactériens et virus pathogènes. La présence de virus en l'absence d'indicateurs bactériens est souvent souligné et une plus grande résistance des virus face aux stress environnementaux et aux processus de désinfection est largement décrite (Jofre et al., 2016; Moce-Llivina et al., 2003; Ogorzaly et al., 2010). Cependant, la recherche systématique de l'ensemble des virus entériques pathogènes pour l'Homme n'est possible ni techniquement, ni économiquement. De nouveaux indicateurs sont donc préconisés pour évaluer la présence de virus pathogènes dans les eaux afin de mieux prévenir le risque de contaminations virales d'origine hydrique. Les bactériophages tels que les coliphages somatiques, les bactériophages ARN F-spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis* ont été particulièrement étudiés (Havelaar et al., 1991; Jofre, 2007). Parmi ces trois groupes, les coliphages somatiques sont les plus abondants dans les eaux de surface mais ils constituent un ensemble très hétérogène de virus aux caractéristiques structurales diverses. Les phages de *Bacteroides fragilis* sont plus résistants aux conditions environnementales (Durán et al., 2002) mais sont faiblement représentés dans les eaux et nécessitent des méthodes de détection plus complexes. Les bactériophages ARN F-spécifiques constituent un groupe de virus très homogène, présent dans l'environnement et facilement détectable. Selon ces premiers arguments et d'autres qui suivront par la suite, ils ont donc été sélectionnés dans ce travail de thèse, comme modèles pour comprendre le transport et le devenir des virus dans l'environnement.

4.1 Structure des bactériophages ARN F-spécifiques

Les bactériophages ARN F-spécifiques appartiennent à la famille des *Leviviridae*, qui se compose en deux genres : les *Levivirus* et les *Allolevivirus*. Issus d'un ancêtre commun hypothétique, ces deux genres se différencient par la taille de leur génome et l'arrangement de leurs gènes (Bollback and Huelsenbeck, 2001). Chaque genre est également divisé en deux génogroupes : les génogroupes I (*Enterobacteria phage MS2*) et II (*Enterobacteria phage BZ13*) pour les *Levivirus* et les génogroupes III (*Enterobacteria phage Qbeta*) et IV (*Enterobacteria phage FI*) pour les *Allolevivirus* (selon le 9^e rapport du comité international de taxonomie des virus (King et al., 2012)). Une délétion de 60 nucléotides aux environs de la région 3' non traduite (3'-UTR) des phages appartenant aux génogroupe II constitue la principale différence avec les phages du génogroupe I, tandis qu'une délétion de 90 nucléotides dans le gène de la protéine de maturation différencie le génogroupe III du

génogroupe IV (Bollback and Huelsenbeck, 2001; Vinjé et al., 2004). Actuellement, environ une soixantaine de bactériophages ARN F-spécifiques sont répertoriés, dont 17 appartiennent au genre *Levivirus*, 11 au genre *Allolevivirus* et plus d'une trentaine en attente de classification (Tableau 8). Parmi ces phages non classés, des études ont mis en évidence un potentiel nouveau génogroupe dans le genre *Levivirus* (génogroupe JS) (Love et al., 2008; Vinjé et al., 2004). Une récente publication (Friedman et al., 2012) a à nouveau détecté et séquencé deux souches, DL52 et DL54, pouvant toutes deux être incluses dans un sous-groupe JS-like du génogroupe I. Cet article met également en avant les recombinaisons ARN-ARN ayant lieu au sein de la famille *Leviviridae*.

Tableau 8 Classification des *Leviviridae* (selon la section taxonomie du « National Center for Biotechnology Information » et le 9^e rapport du comité international de taxonomie des virus (King et al., 2012)).

Famille	Genre	Génogroupe	Espèce type	Souche
Leviviridae	Levivirus	Génogroupe I	Enterobacteria phage MS2	Enterobacteria phage f2
				Enterobacteria phage fr
				Enterobacteria phage JP501
				Enterobacteria phage M12
				Enterobacteria phage R17
				Enterobacteria phage ZR
				Enterobacteria phage MS2
				Enterobacteria phage JS-like
		Génogroupe II	Enterobacteria phage BZ13	Enterobacteria phage BO1
				Enterobacteria phage GA
				Enterobacteria phage BZ13
				Enterobacteria phage JP34
				Enterobacteria phage JP500
				Enterobacteria phage KU1
				Enterobacteria phage SD
				Enterobacteria phage TH1
				Enterobacteria phage TL2
		Non classés		Acinetobacter phage AP205
				Enterobacteria phage C-1 INW-2012
				Enterobacteria phage Hgal1
				Pseudomonas phage PP7
	Allolevivirus	Génogroupe III	Enterobacteria phage Qβ	Enterobacteria phage M11
				Enterobacteria phage MX1
				Enterobacteria phage ST
				Enterobacteria phage VK
				Enterobacteria phage Qβ
		Génogroupe IV	Enterobacteria phage FI	Enterobacteria phage ID2
				Enterobacteria phage NL95
				Enterobacteria phage SP
				Enterobacteria phage TW19
				Enterobacteria phage TW28
				Enterobacteria phage FI
33 phages non classés infectant Caulobacter, Enterobacteria et Pseudomonas				

4.1.1 La capside

Les bactériophages ARN F-spécifiques sont des virus nus (ne possédant pas d'enveloppe lipidique) d'environ 20 à 30 nm de diamètre. L'information génétique est entourée et protégée par une capsidie entièrement constituée de protéines. Cette coque protéique est composée de 180 copies de la protéine de capsidie CP et d'une seule copie de la protéine de maturation MP (aussi appelée protéine A). L'ensemble a une forme quasi-sphérique, dite icosaédrique (Figure 16).

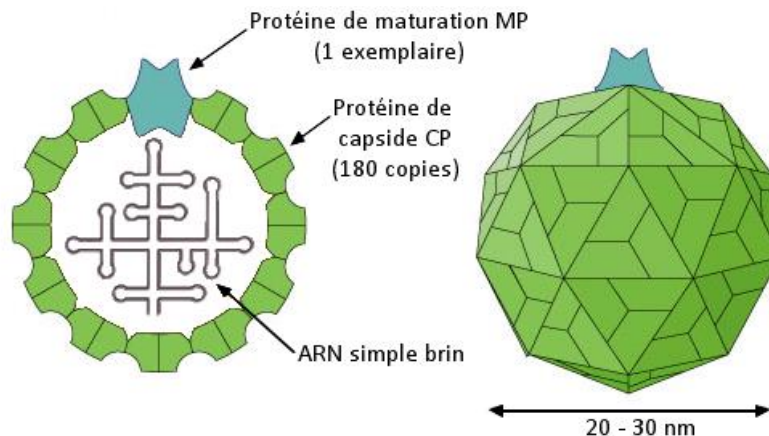


Figure 16 Représentation schématique de la structure des bactériophages ARN F-spécifiques (adaptée de <http://viralzone.expasy.org>).

La structure de la coque protéique de différents phages à ARN simple brin a été résolue par cristallographie à rayons X (Toropova et al., 2008; Valegård et al., 1990). De manière générale, ces études ont montré que la protéine de capsidie CP se présentait selon trois conformations différentes A, B et C. L'agencement de 60 dimères A/B quasi symétriques et de 30 dimères C/C symétriques forment la coque protéique (Figure 17).

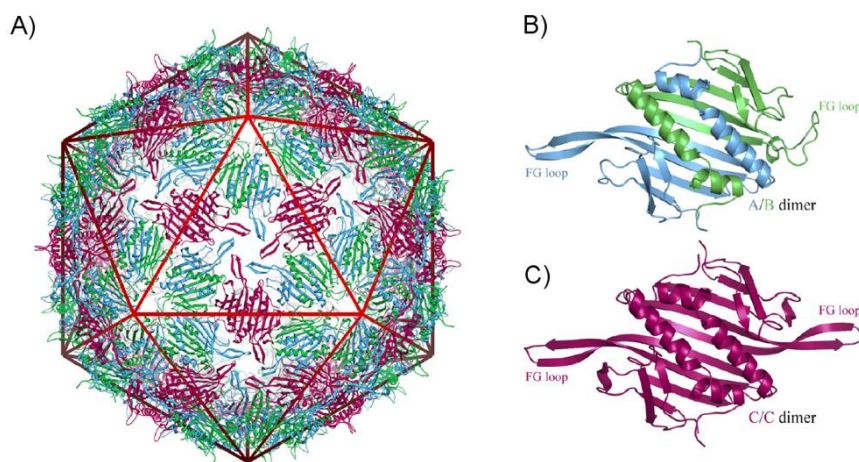


Figure 17 (A) Capsidie du bactériophage MS2 assemblée à l'aide de 60 copies du dimère A/B (colorées en bleu et vert, respectivement) et 30 copies du dimère C/C (colorées en rouge). Représentation des structures des dimères de la protéine de capsidie sous les deux conformations (B) A/B et (C) C/C (Toropova et al., 2008).

La protéine de maturation serait partiellement exposée à la surface au niveau d'un des sommets de la capside icosaédrique et serait aussi en étroite association avec l'ARN (Dent et al., 2013; Shiba and Miyake, 1975). Des interactions entre le génome et les dimères de protéines de capside ont également été mis en évidence (Koning et al., 2003; Valegård et al., 1994). La liaison de l'ARN à la surface interne de la capside a plusieurs fonctions : elle est responsable de la spécificité de l'encapsidation de l'ARN, elle sert de site d'initiation pour l'assemblage *in vivo* et permet une organisation globale de la capside (Dent et al., 2013; Heisenberg, 1966; Kozak and Nathans, 1971). Il existe également des pores au niveau de cette capside protéique de diamètre variant de 7 à 16 Å. Ceux-ci sont plus larges chez Q β que chez MS2 et GA (Golmohammadi et al., 1996) (Figure 18).

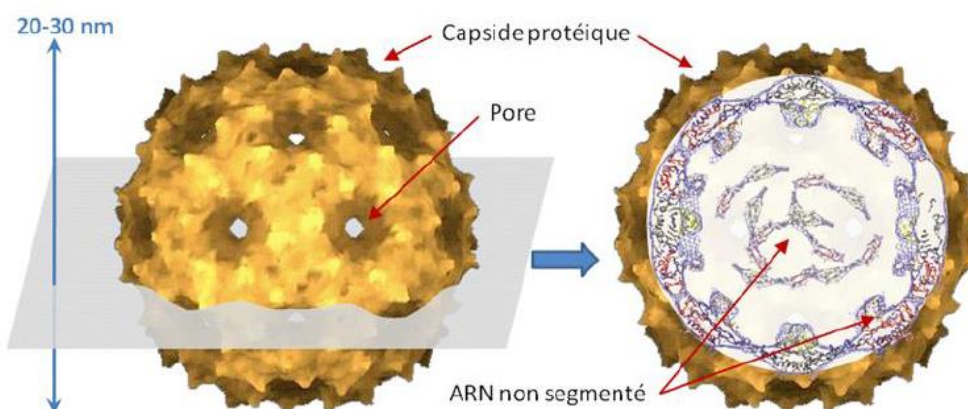


Figure 18 Structures interne et externe du bactériophage MS2. (Référence PDB using VIPERdB, the Virus Particles Explorer 2ms2).

Parmi les structures connues de capsides des phages MS2, fr (génogroupe I), GA (génogroupe II) et Q β (génogroupe III), différents degrés de similitude de séquence ont été observés. Les phages d'un même génogroupe (MS2 et fr) sont identiques à 87%, les phages d'un même genre (*Levivirus*) mais génogroupe différent (MS2 et GA) sont identiques à 62%, alors que les phages de deux genres différents (MS2 et Q β) sont seulement identiques à hauteur de 20% (Tars et al., 1997).

4.1.2 Organisation du génome viral

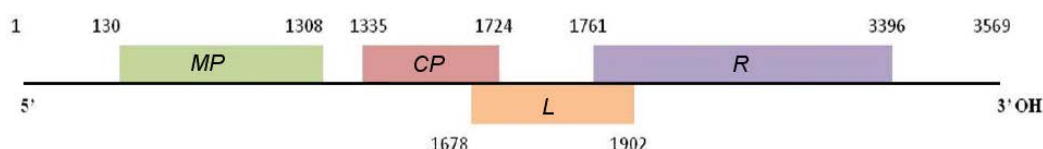
Le génome des bactériophages ARN F-spécifiques est constitué d'un ARN simple brin non segmenté de polarité positive de 3 466 à 4 276 nucléotides. La taille du génome varie selon le genre, les *Levivirus* possédant un génome plus court que les *Allolevivirus* (Figure 19). Ces deux genres se distinguent également par l'arrangement de leur information génétique avec trois gènes communs :

- le gène de la protéine de capside représentée en 180 copies pour former la capside icosaédrique ;
- le gène de la protéine de maturation, nécessaire à la reconnaissance des F-pili des bactéries hôtes ;
- le gène de la réplicase, ARN polymérase ARN dépendante, nécessaire à la réplication du génome viral au sein de la cellule hôte ;

et un gène dépendant du genre :

- le gène de la protéine de lyse pour les *Levivirus*, nécessaire à la lyse bactérienne et le gène codant une protéine « readthrough » pour les *Allolevivirus*, jouant un rôle dans l'infectiosité du virus (Klovins et al., 2002). Dans ce dernier cas, la lyse est assurée par la protéine de maturation.

Levivirus, exemple du phage MS2



Allolevivirus, exemple du phage Q β

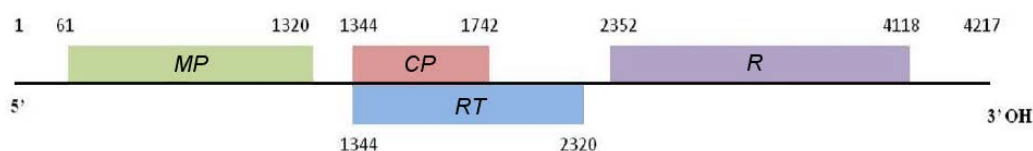


Figure 19 Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2 et Q β (Bollback and Huelsenbeck, 2001). MP : gène de la protéine de maturation, CP : gène de la protéine de capsid, R : gène de la réplicase, L : gène de la protéine de lyse, RT : gène de la protéine « readthrough ». Les gènes communs sont représentés au-dessus du génome et le gène différent en-dessous. Les séquences sont issues de la base de données Genbank avec les numéros d'accès suivants : MS2 (NC_001417); Q β (AY099114).

Le génome présente également de nombreuses structures secondaires qui ont notamment un rôle important dans la régulation de la traduction du génome viral (Fiers et al., 1976).

4.1.3 Réplication

Les membres de la famille *Leviviridae* infectent les bactéries présentes dans le tractus gastro-intestinal des mammifères (*E. coli*) par adsorption au F-pilus (pilus sexuel ou de fertilité). La reconnaissance entre la capsid virale et le récepteur bactérien, situé au niveau des pili sexuels, se fait par l'intermédiaire de la protéine de maturation (Figure 20) (Dent et al., 2013; Roberts and Steitz, 1967).

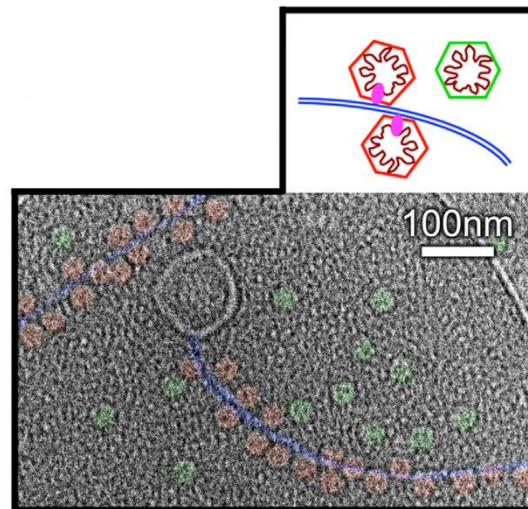


Figure 20 Image de cryo-microscopie électronique mettant en évidence l'importance de la protéine de maturation MP des bactériophages ARN F-spécifiques pour la reconnaissance du F-pilus (coloré en bleu). Les bactériophages MS2 sont colorés en rouge tandis que les bactériophages MS2 mutants, ne possédant pas la protéine MP, sont colorés en vert (Dent et al., 2013).

Après pénétration de l'ARN au sein du cytoplasme bactérien, la réplicase est alors traduite à l'aide de ribosomes bactériens. Trois protéines de l'hôte (la protéine ribosomale S1 et les facteurs d'élongation de la traduction EF-Tu et EF-Ts) s'associent à la réplicase virale pour former une ARN polymérase ARN dépendante active. Une quatrième protéine, non associée au complexe, agit directement sur l'ARN et permet la synthèse du brin négatif. A partir de ce brin négatif sont produits les brins d'ARN positifs qui seront encapsidés dans les futurs virions. Une régulation de la traduction du génome viral a lieu par la suite *via* la liaison des dimères de protéines de capsid sur une structure secondaire spécifique (de type « tige-boucle ») de l'ARN viral. Ce complexe ARN-protéines est considéré également comme étant le site d'initiation de l'assemblage *in vivo* des capsides. Une fois les virions assemblés autour de leur ARN viral, la protéine de lyse (ou protéine de maturation selon le genre) permet d'activer la lyse bactérienne entraînant une dégradation du réseau de peptidoglycanes et la libération de plusieurs milliers de virions.

4.2 Les avantages à utiliser les bactériophages ARN F-spécifiques comme modèles pour l'étude de la dynamique virale dans un milieu hydrique

Les bactériophages ARN F-spécifiques sont souvent utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes pour étudier le comportement, le devenir et le transport des particules virales dans le milieu aquatique. De nombreux arguments justifient ce choix :

4.2.1 *Ubiquité des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de surface et le sédiment*

Les bactériophages ARN F-spécifiques sont détectés dans les eaux de surface et les sédiments. Les concentrations rapportées dans la littérature couvrent une gamme assez étendue pouvant aller de l'absence de phages à une concentration de 10^5 UFP/100 mL (Tableau 9).

4.2.2 *Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateur de pollution virale d'origine fécale*

Les bactériophages ARN F-spécifiques résident dans le tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud. Ils sont excrétés en haute concentration dans les fèces et sont présents dans les eaux usées des stations d'épuration (Hartard et al., 2015; Yahya et al., 2015). Pour ces raisons, ils peuvent être utilisés comme indicateur de pollution fécale.

Havelaar et al. (1993) sont parmi les premiers à avoir mis en évidence que les bactériophages ARN F-spécifiques pouvaient potentiellement être des indicateurs adéquats pour prédire la présence de virus entériques pathogènes. En effet, ces bactériophages répondent à plusieurs critères d'un indicateur de contamination virale, à savoir :

- ils sont inoffensifs pour l'homme et les animaux ;
- ils sont présents en même temps que les virus pathogènes, voire plus abondants ;
- ils sont détectables grâce à des tests de laboratoire simples, spécifiques, rapides et d'un faible coût ;
- ils ne se multiplient pas dans l'environnement (les pili sexuels des bactéries hôtes, indispensables à l'infection des bactériophages ARN F-spécifiques, ne sont synthétisés qu'au-dessus d'une température de 25°C avec un optimal à 30°C (Jofre, 2009; Woody and Cliver, 1995).

Seul le critère concernant la résistance du virus est soumis à discussion dans la communauté scientifique. En effet, comparés aux virus entériques, les bactériophages ARN F-spécifiques sont plus résistants à la chloration ou aux UV mais survivent moins longtemps aux traitements thermiques (Jofre et al., 2016). Néanmoins, même si les recherches menées jusqu'alors n'ont pas permis de certifier les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution fécale et virale, ils présentent malgré tout de nombreux atouts pour estimer la pollution fécale et prédire la présence de virus entériques pathogènes.

Tableau 9 Concentration et distribution des génogroupes (GG) des bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH) infectieux dans les eaux et les sédiments de rivière pollués par des matières fécales.

Compartiment	FRNAPH Infectieux	Nombre d'échantillons	Pourcentage de positifs	Concentration amplitude détectée et/ou moyenne (m)	Références	
Eaux de surface (UFP/100 mL)	FRNAPH	43	71 à 100%	1.10 ¹ à 6,5.10 ² , m=4.10 ²	Durán et al., 2002	
	FRNAPH	347		<10 à 3,2.10 ⁵ , m=501,2	Lucena et al., 2003	
	GG I	252	83%		Cole et al., 2003	
	GG II		7%			
	GG III		1%			
	GG IV		1,2%			
	GG I	533	94%		Stewart-Pullaro et al., 2006	
	GG II		5%			
	GG III		1%			
	GG IV		0%			
	FRNAPH	8	100%	m=1.10 ³	Ogorzaly et al., 2009	
	GG I	84	29,8%			
	GG II		69,0%			
	GG III		1,2%			
	GG IV		0%			
	FRNAPH	9	100%	1,8.10 ² à 1,1.10 ⁴ , m=2,1.10 ³	Haramoto et al., 2009	
	GG I	31	29%			
	GG II		55%			
	GG III		16%			
	GG IV		0%			
	FRNAPH	75		0 à 339,6, m=59,2	Lodder et al., 2010	
	FRNAPH	10	100%	20 à 1,1.10 ³ , m=3,1.10 ²	Haramoto et al., 2012	
	GG I	65	28%			
	GG II		58%			
	GG III		9%			
	GG IV		0%			
	FRNAPH	168		0 à 1,6.10 ³	Mauffret et al., 2012	
Sédiment (UFP/g de sédiment sec)	FRNAPH	6	67%	4,8 à 4,6.10 ³ , m=816,3	Haramoto et al., 2009	
	GG I	18	39%			
	GG II		50%			
	GG III		6%			
	GG IV		5%			
	FRNAPH	20		19,9 à 251,2, m=105,9	Skraber et al., 2009	

4.2.3 *Similarité des bactériophages ARN F-spécifiques avec certains virus entériques pathogènes*

D'un point de vue morphologique, les bactériophages ARN F-spécifiques possèdent une structure similaire à celle des principaux virus entériques pathogènes (norovirus, entérovirus, hépatite A virus), à savoir une capsidie icosaédrique de 20 à 30 nm de diamètre et un ARN simple brin. Pour exemple, il est très difficile de différencier les bactériophages des entérovirus au microscope électronique (Grabow, 2001). De plus, une corrélation entre la présence des bactériophages ARN F-spécifiques et certains virus entériques dans des échantillons d'eau de surface a été documentée (Baggi et al., 2001; Ballester et al., 2005; Havelaar et al., 1993; Jiang et al., 2001; Ogorzaly et al., 2009). Enfin, plusieurs études démontrent que la survie des bactériophages face aux stress environnementaux ou aux procédés de désinfection est similaire à celle de la plupart des virus entériques humains (Allwood et al., 2005; Bae and Schwab, 2008; Nasser and Oman, 1999). Baggi et al. (2001) ont comparé la survie de plusieurs virus entériques (rotavirus, hépatite A virus et entérovirus) aux bactériophages ARN F-spécifiques dans une rivière en aval d'une station d'épuration. Les auteurs ont conclu à une survie similaire des phages et des virus entériques durant le processus de traitement. Néanmoins, les avis sont partagés puisque d'autres auteurs trouvent des résultats différents (Chung and Sobsey, 1993; Mocé-Llivina et al., 2005). Ces études soulignent une survie inférieure des bactériophages ARN F-spécifiques aux virus entériques lorsque les températures des eaux de surface dépassent 25°C. Dans ces conditions, leur utilisation comme indicateur viral est limité (Jofre et al., 2016). C'est pourquoi malgré les similarités, les bactériophages ARN F-spécifiques ne reflètent pas entièrement le comportement des virus pathogènes. Néanmoins, leur étude permet d'éclaircir le comportement d'un virus/phage entérique dans un milieu hydrique et d'apporter un aperçu de la dynamique des virus pathogènes.

4.2.4 *Facilité de détection des bactériophages ARN F-spécifiques*

Comme énoncé précédemment, les bactériophages ARN F-spécifiques sont facilement et rapidement quantifiables à faible coût. Contrairement aux virus pathogènes principalement détectés par des techniques moléculaires, les bactériophages ARN F-spécifiques peuvent être quantifiés à la fois *via* un test rapide d'infectiosité (norme ISO 10705-1) ou *via* des méthodes moléculaires. Chacun de ces procédés apporte une information différente avec pour l'un la concentration en bactériophages infectieux et pour l'autre, le génotypage et la quantification des bactériophages totaux (infectieux et non infectieux).

4.2.5 *Différences au sein des bactériophages ARN F-spécifiques*

Des différences de survies, de propriétés de surface et donc de comportements ont été observés au sein de la famille des *Leviviridae*.

De nombreuses études ont mis en évidence une différence de survie des 4 génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques dans le milieu aquatique (Brion et al., 2002; Durán et al., 2002; Long and Sobsey, 2004; Schaper et al., 2002a; Yang and Griffiths, 2013). Muniesa et al. (2009) ont comparé, *in situ*, la survie des 4 génogroupes en utilisant des sacs à dialyse pour un contact direct avec le milieu et les conditions extérieures. Ces auteurs en viennent à la même conclusion, les phages infectieux des génogroupes I et II sont plus résistants aux stress environnementaux que les souches appartenant aux génogroupes III et IV.

Les propriétés de surface d'une particule virale se définissent principalement par sa charge électrostatique et sa balance hydrophile/hydrophobe. Les génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques présentent des similitudes et des différences en termes de propriétés de surface. En effet, les points isoélectriques sont similaires (entre 2,6 et 3,9) ainsi que leur charge (Dika et al., 2011; Langlet et al., 2008b). Le degré d'hydrophobicité au contraire varie selon la séquence suivante : MS2 (génogroupe I) < Q β (génogroupe III) < GA (génogroupe II); où MS2 est le moins hydrophobe des trois phages (Dika et al., 2013; Langlet et al., 2008a). Ces propriétés de surface définissent le comportement et le devenir du virus dans l'environnement. Par exemple, le phage le plus hydrophobe (GA, génogroupe II) affiche un haut attachement sur certains aliments (salade, surface) comparé aux autres génogroupes (Deboosere et al., 2012). Autre exemple, le phage MS2 (génogroupe I), en raison de sa faible hydrophobicité et de sa haute résistance, est difficilement éliminé lors du traitement des eaux (Haramoto et al., 2015). Il s'attache peu aux membranes de filtration souvent chargées négativement (Langlet et al., 2009). Considéré comme pire scénario lors des procédés de traitements des eaux car fortement chargé négativement et peu hydrophobe, il est souvent proposé comme indicateur approprié pour étudier la réduction des virus entériques (Haramoto et al., 2015). Cependant cette règle de faible attachement du bactériophage MS2 par rapport aux autres génogroupes peut être mise en défaut. Boudaud et al. (2012) démontrent que le phage GA, le plus hydrophobe est capable de franchir très facilement un traitement de potabilisation basé uniquement sur des principes physiques (coagulation-floculation, filtration sur sable et ultrafiltration) contrairement aux autres génogroupes. Cette capacité à franchir ce type de traitement traduit dans ce cas une faible capacité d'attachement. Aucune explication n'a pu être avancée si ce n'est peut-être le caractère hydrophile de la membrane d'ultrafiltration utilisée qui pourrait favoriser le passage des virus plus hydrophobes.

Les différences de survie et de propriétés de surface des phages de la famille des *Leviviridae* présentent un avantage pour l'étude du comportement des particules virales dans l'environnement aquatique. Ces caractéristiques virales permettent effectivement de détecter les variabilités pouvant exister d'un phage à un autre suite à leurs interactions avec le milieu extérieur.

4.2.6 Les bactériophages ARN F-spécifiques comme outil pour déterminer l'origine de la pollution fécale

La distribution des 4 génogroupes dans les eaux de surface (Haramoto et al., 2012; Ogorzaly et al., 2009) et les sédiments (Haramoto et al., 2009) pourrait être utilisée pour différencier une contamination fécale d'origine humaine ou animale. En effet, les génogroupes I et IV sont

généralement associés à une pollution animale tandis que les génogroupes II et III sont majoritairement détectés dans les eaux usées d'origine humaine (Schaper et al., 2002b). L'origine de la contamination fécale observée dans les eaux de surface peut dès lors être déterminée. Néanmoins, cette distribution n'est pas absolue. Des phages du génogroupe III, généralement associés à une contamination humaine, ont été isolés en haute proportion dans des eaux usées porcines (Sundram et al., 2007) tandis que des phages du génogroupe I, généralement associé à une pollution animale, sont régulièrement détectés dans des eaux usées urbaines (Lee et al., 2009). Hartard et al. (2015) soulignent que le géotypage des bactériophages ARN F-spécifiques n'est pas suffisant pour déterminer l'origine de la pollution fécale. Ils ont alors séquencé le gène de la protéine de maturation (haut degré de variabilité) pour différencier les origines. A partir des résultats obtenus, il apparaît que la méthode de RT-PCR proposée par Ogorzaly et Gantzer (2006) est plus spécifique pour discriminer l'origine urbaine et animale de la pollution par rapport à la méthode de RT-PCR proposée par Wolf et al. (2010), cette dernière étant plus sensible.

De plus, comme déjà énoncé, la survie des 4 génogroupes est différente dans les conditions environnementales, ce qui peut entraîner un biais dans leur répartition (Muniesa et al., 2009). Néanmoins le fait d'utiliser la détection du génome permet de limiter ce biais étant donné qu'il a largement été démontré que le génome viral persiste beaucoup plus longtemps que le caractère infectieux du virus correspondant (Gassilloud et al., 2003).

Ainsi, ces bactériophages constituent un bon outil pour formuler des hypothèses à propos des sources de pollution dans le milieu aquatique.

En somme, même si certains arguments sont discutés dans la littérature, les bactériophages ARN F-spécifiques présentent bon nombre d'atouts à être utilisés comme modèles pour l'étude de la propagation, du transport et du devenir des particules virales dans l'environnement aquatique.

Chapitre 2 : Stratégies et méthodologies générales

Cette partie est dédiée à l'explication des stratégies employées pour répondre aux objectifs de la thèse, ainsi qu'aux méthodologies utilisées. Dans un premier temps, la description du lieu d'étude permettra de comprendre pourquoi cette zone a été spécifiquement choisie pour étudier le devenir des bactériophages ARN F-spécifiques dans un cours d'eau. Une description détaillée de la station d'épuration d'Hespérange, principale source de pollution virale du système d'étude, permettra également d'évaluer l'apport en bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière. Dans un second temps, l'intérêt de l'étude des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux, détectés selon trois méthodes différentes, sera expliqué et certains protocoles non détaillés dans les publications y seront ajoutés. Enfin, une dernière partie sera consacrée à la méthode de prélèvement du sédiment et à son traitement en laboratoire pour l'élution des bactériophages ARN F-spécifiques.

1 Description du lieu d'étude

1.1 La rivière Alzette

L'étude a été menée sur l'Alzette, l'une des principales rivières du Luxembourg. D'une longueur de 73 km, l'Alzette prend sa source sur le territoire de la commune de Thill (France) et se jette dans la Sûre à sa sortie d'Ettelbrück (Luxembourg). Avec une alternance annuelle entre les hautes eaux pendant l'automne-hiver et l'étiage en été, l'Alzette est associée à un régime pluvio-évaporal (Figure 21).

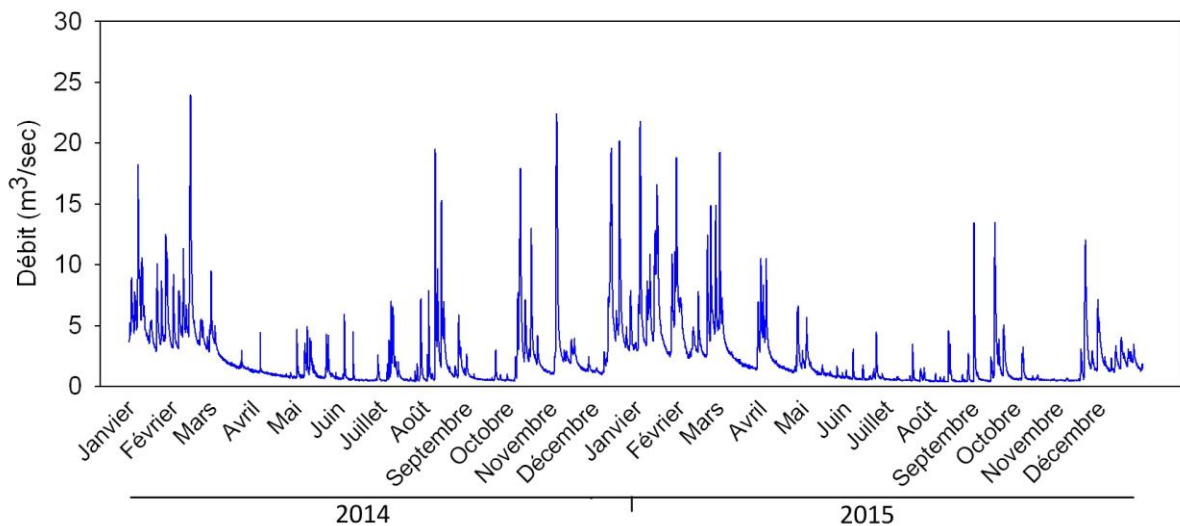


Figure 21 Hydrogramme de la rivière de l'Alzette au cours des années 2014-2015 (pas de temps d'enregistrement : 15 minutes). Un débit de base moyen d'environ 1,0 m³/sec est observé entre avril et octobre tandis qu'environ 3,2 m³/sec est enregistré entre octobre et avril. Plusieurs crues sont répertoriées engendrant une variation importante du débit ne dépassant pas un maximum de 24 m³/sec.

Le bassin versant de l'Alzette couvre 1 174 km² dont 286 km² drainent la zone d'étude (Figure 22A). L'échantillonnage de l'eau de surface et du sédiment a été réalisé le long d'une section de la rivière, de 3 km de longueur localisée en amont de la capitale du Luxembourg (à proximité de la ville d'Hespérange) (Figure 22B). Trois stations d'épuration sont localisées 10 km en amont de la section d'étude avec des capacités respectives de 24 500, 90 000 et 95 000 équivalents habitants (é-h). Une quatrième station, la station d'épuration d'Hespérange, localisée directement au début de la section d'étude permet un apport continu de pollution virale dans la rivière avec une capacité de 26 000 é-h.

Une évaluation du niveau de pollution fécale en amont de la zone d'étude a mis en évidence une concentration en *Escherichia coli* de $1,0 \pm 0,7 \times 10^4$ nombre le plus probable (NPP)/100 mL (n=9) (moyenne $\pm$ écart type) et en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux de $8,5 \pm 6,5 \times 10^2$ UFP/100 mL (n=9). Les bactériophages ARN F-spécifiques totaux (infectieux + non infectieux + ARN libres) ont également été déterminés par détection du nombre de copie de génome (cg) (n=9). Le niveau est de $7,6 \pm 2,3 \times 10^2$ copies de génome (cg)/100 mL de génogroupe I, $2,7 \pm 2,2 \times 10^4$ cg/100 mL de génogroupe II et $7,9 \pm 3,8 \times 10^2$ cg/100 mL de génogroupe III. Le génogroupe IV n'a été détecté qu'une seule fois sur neuf échantillonnages à une concentration de $3,6 \times 10^2$ cg/100 mL. La présence majoritaire de génogroupe II confirme que la zone d'étude est sous forte influence anthropique.

Le tronçon a été sélectionné selon plusieurs critères, déterminants pour l'étude du devenir des bactériophages ARN F-spécifiques dans un cours d'eau. Premièrement, l'effluent de la station d'épuration d'Hespérange constitue l'unique source ponctuelle et continue de pollution virale et fécale dans la section étudiée. D'autres sources diffuses sont inhérentes à la contamination de la rivière mais plus difficiles à caractériser tels le lessivage des surfaces ou les excréments d'animaux sauvages. Néanmoins, ces sources s'avèrent très faibles en raison d'un ruissellement majoritairement forestier en bordure de la portion de rivière étudiée (peu d'apport agricole). Deuxièmement, la section étudiée, facile d'accès, présente un réseau hydrographique relativement simple, sans méandre ni bras morts. Enfin, celle-ci est équipée d'un limnimètre permettant le suivi de la hauteur d'eau et par conséquent du débit de la rivière en fonction des conditions hydro-climatologiques.

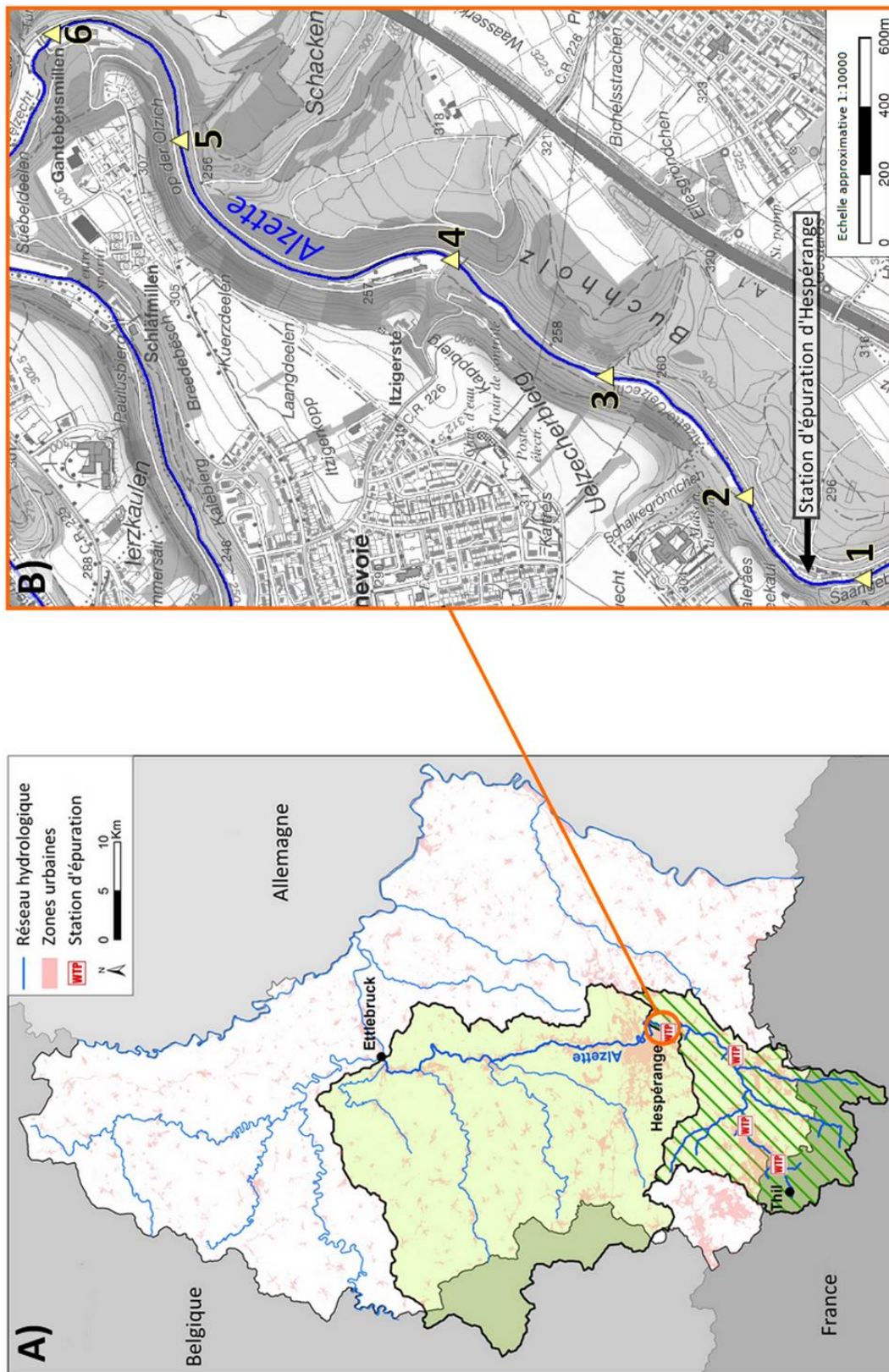


Figure 22 (A) Principaux réseaux hydrographiques du Luxembourg. Le bassin versant de la rivière de l'Alzette (en vert) inclut le sous bassin en amont de la zone d'étude (aire barrée). (B) Carte topographique de la zone d'étude où la rivière de l'Alzette est mise en évidence (en bleue) ainsi que les différents sites numérotés de prélèvement (triangles jaunes) analysés dans cette étude.

1.2 La station d'épuration d'Hespérange

Suite au prétraitement des eaux usées (dégrillage), la station d'épuration d'Hespérange utilise les voies biologiques comme traitement secondaire pour épurer les eaux. En 2006, la station d'épuration d'Hespérange a été rénovée avec la mise en place d'une technologie de bioréacteurs à lits fluidisés. Au lieu que les bactéries soient libres en suspension dans les différents bassins de la station, comme dans une boue activée, celles-ci sont fixées à des supports (Figure 23A). La capacité naturelle des microorganismes à se fixer sur ces supports permet la formation de biofilms, biomasse naturellement épuratrice. Des bassins anaérobies et aérobies permettent respectivement la dénitrification et la nitrification de l'eau usée. Une dernière étape de clarification (décantation des dernières impuretés) est réalisée, aucun traitement spécifique pour l'élimination du phosphore et de microorganismes n'est ensuite effectué avant la décharge dans l'Alzette (Figure 23B).

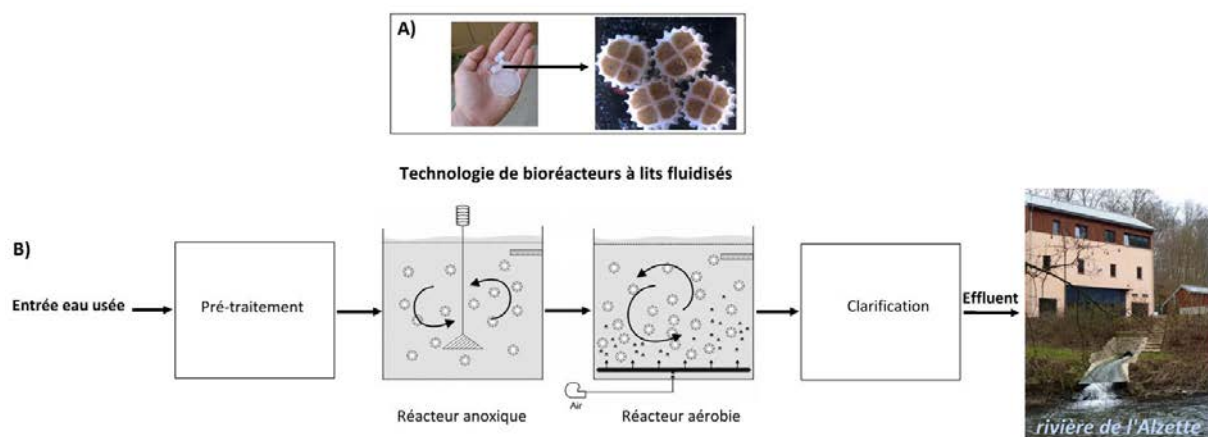


Figure 23 (A) Supports utilisés dans les réacteurs pour la formation de biofilms. Récolté dans le compartiment anoxique de la station d'épuration d'Hespérange, le biofilm est parfaitement visible sur la seconde image (Plattes et al., 2006). (B) Schématisation du fonctionnement de la station d'épuration d'Hespérange de l'entrée de l'eau usée jusqu'à la sortie de l'eau épurée dans l'Alzette (les schémas des réacteurs anoxique et aérobie sont issus de Barwal and Chaudhary (2014)).

Dans la présente étude, l'efficacité de la station d'épuration d'Hespérange a été évaluée sur 24 heures. De plus, des prélèvements ponctuels en sortie de la station ont permis d'évaluer l'apport en bactériophages ARN F-spécifiques dans la zone d'étude sur un plus large espace-temps.

1.2.1 Efficacité de la station d'Hespérange sur 24 heures

Deux échantillonneurs automatiques, prélevant de l'eau toutes les heures pendant 24 heures, ont été mis en place à l'entrée et à la sortie de la station. Les paramètres analysés sont les suivants :

- la demande biochimique en oxygène (DBO₅) correspond à la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes aérobies pour oxyder les matières organiques dissoutes ou en suspension dans l'eau après 5 jours d'incubation,
- la turbidité,
- la concentration en *Escherichia coli*,
- la concentration en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux.

Tableau 10 Mesure de la turbidité et de la DBO₅ en entrée et sortie de la station d'épuration d'Hespérage sur 24 heures et détermination des abattements respectifs.

		Turbidité (NTU)	DBO ₅ (mg d'O ₂ consommé/L)
Entrée	Moyenne	132,2	159,4
	Minimum	78,2	126,5
	Maximum	179,0	208
Sortie	Moyenne	7,1	6,5
	Minimum	4,3	4,35
	Maximum	12,9	10,4
Abattement (%)	Moyenne ^a	94,6	95,9
	Minimum ^b	83,5	91,7
	Maximum ^c	97,6	97,9

^a estimé par comparaison des valeurs moyennes sur 24 h

^b estimé à partir des concentrations minimales en entrée et maximales en sortie

^c estimé à partir des concentrations maximales en entrée et minimales en sortie.

La DBO₅, paramètre permettant de déterminer la concentration de polluants organiques biodégradables dans l'eau, est utilisée dans la réglementation pour évaluer l'efficacité des stations d'épuration. La directive européenne 91/271/CEE du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines fixe une concentration maximale de DBO₅ de 25 mg d'O₂/L en sortie et un rendement minimum de 70% pour une station de capacité supérieure à 10 000 é-h. Avec une concentration maximale de 10,4 mg d'O₂/L en sortie et un abattement moyen de 95,9%, la station d'épuration d'Hespérage est entièrement dans les normes relatives à l'épuration des eaux usées (Tableau 10). De plus, la station élimine efficacement les matières insolubles (particules solides, bactéries, micro-algues, etc.) pouvant troubler l'eau avec un abattement moyen de la turbidité de 94,6%.

En ce qui concerne le traitement microbien, en entrée de la station, des concentrations moyennes de $9,6 \times 10^5$ NPP/100 mL et $9,7 \times 10^4$ UFP/100 mL sont détectées respectivement pour *Escherichia coli* et les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux. En sortie, les amplitudes de variation des concentrations sont plus faibles qu'en entrée sur les 24 heures analysées et des réductions moyennes de 2,5 log₁₀ et 1,6 log₁₀ sont déterminées (Figure 24).

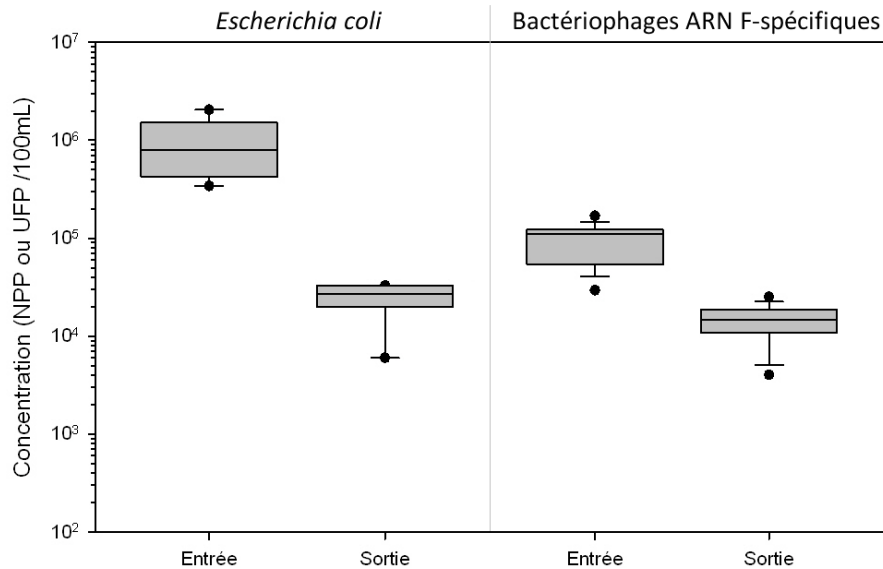


Figure 24 Dispersion sur 24 heures des concentrations en *Escherichia coli* et en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux en entrée et en sortie de la station d'épuration d'Hespérage.

Trois génogroupes sur quatre des bactériophages ARN F-spécifiques ont été détectés à l'entrée et à la sortie de la station d'épuration (Figure 25). La présence majoritaire en entrée du génogroupe II puis du génogroupe III est conforme à une pollution fécale d'origine humaine (Schaper et al., 2002b). La présence de bactériophages appartenant au génogroupe I, généralement associée à une contamination d'origine animale, a déjà été observée dans d'autres stations d'épuration (Hartard et al., 2015; Lee et al., 2009). Contrairement aux bactériophages infectieux, la concentration en bactériophages totaux varie en sortie de station d'épuration. La variation des génogroupes I et II semble être une conséquence du traitement des eaux de la station puisque l'apport de ces génogroupes est stable en entrée, tandis que la variation des concentrations du génogroupe III peut s'expliquer par une variation dès le départ en entrée.

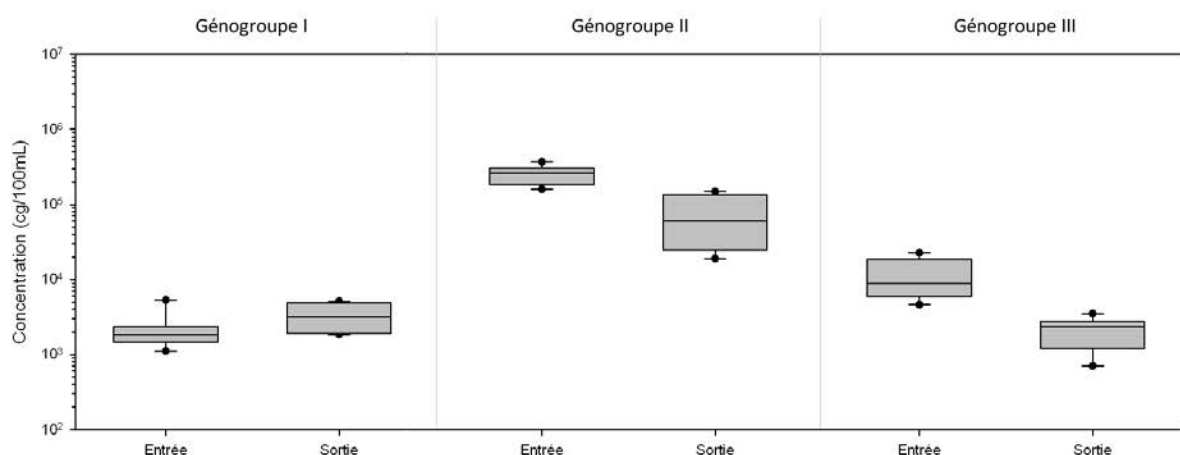


Figure 25 Dispersion sur 24 heures de la concentration en bactériophages totaux pour les génogroupes I, II et III en entrée et sortie de la station d'épuration d'Hespérage.

De plus, l'abattement des concentrations en bactériophages totaux varient selon le génogroupe (Tableau 11). Cette observation met en évidence une différence de comportement entre les génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques face au traitement d'épuration. Les propriétés de surface et particulièrement la variation de la balance hydrophile/hydrophobe peuvent être à l'origine de ces variations (Boudaud et al., 2012).

Tableau 11 Abattements des concentrations en *E.coli* et en bactériophages ARN F-spécifiques (infectieux et totaux) à la station d'épuration d'Hespérage sur 24 heures.

	Abattement (%)					
	<i>E.coli</i>	FRNAPH	GG I	GG II	GG III	GG IV
Moyenne ^a	97,4	85,1	0	71,0	81,0	x
Minimum ^b	90,4	10,1	0	7,8	23,8	x
Maximum ^c	99,7	97,7	65,2	94,9	96,9	x

^a estimé par comparaison des valeurs moyennes sur 24 h

^b estimé à partir des concentrations minimales en entrée et maximales en sortie

^c estimé à partir des concentrations maximales en entrée et minimales en sortie.

Enfin, le tableau 11 met également en évidence une élimination plus efficace mais aussi plus stable d'*Escherichia coli* comparée à celle des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux. Cette observation argumente le besoin d'un indicateur de contamination virale autre que les indicateurs bactériens comme *Escherichia coli*, aux comportements différents et moins résistants dans le milieu.

1.2.2 Prélèvements ponctuels pour l'évaluation de l'apport des bactériophages ARN F-spécifiques

Des abattements de 99,3% et 83,3% (n=5) ont pu être respectivement déterminés pour *Escherichia coli* et les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux suite à l'analyse des prélèvements ponctuels effectués à l'entrée et à la sortie de la station d'épuration d'Hespérage. Ces prélèvements ont été réalisés à différents mois de l'année et les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux obtenues demeurent semblables à celles déterminés lors de l'évaluation de la station sur 24 heures.

Davantage de prélèvements ponctuels ont été effectués à la sortie de la station d'épuration d'Hespérage de manière à évaluer l'apport en bactériophages ARN F-spécifique dans la zone étudiée de l'Alzette. Une moyenne de $8,1 \pm 7,2 \times 10^3$ UFP/100 mL (n=11) de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a été détectée. Parmi les génogroupes recherchés, seulement trois ont été quantifiés sur l'ensemble des prélèvements (n=9) : $2,4 \pm 3,6 \times 10^4$ cg/100 mL pour le génogroupe I, $2,2 \pm 1,3 \times 10^5$ cg/100 mL pour le génogroupe II et $2,5 \pm 4,4 \times 10^4$ cg/100 mL pour le génogroupe III. La station d'épuration déverse donc majoritairement du génogroupe II dans l'Alzette.

Enfin, les concentrations des génogroupes totaux détectés varient d'un prélèvement à l'autre et ce, particulièrement pour les phages appartenant au génogroupe I (Figure 26). La mauvaise efficacité d'épuration de la station d'Hespérange (abattements du génogroupe I calculés sur 24 heures faibles et variables) peut être l'une des explications de ces fluctuations à la sortie.

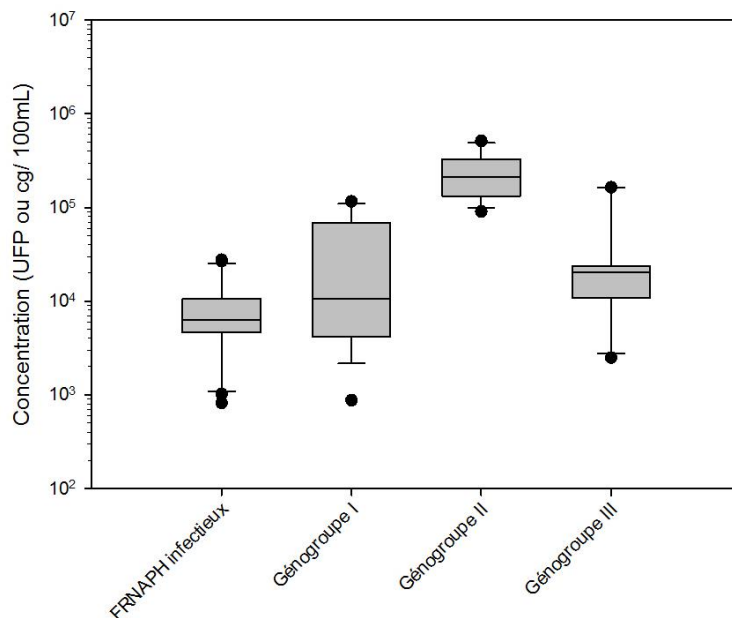


Figure 26 Dispersion des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux (n=11) et totaux (génogroupes I, II et III) (n=9) détectés en sortie de la station d'épuration d'Hespérange.

Ainsi, la station d'épuration d'Hespérange présente une action efficace dans le traitement des déchets organiques et bactériens avec une réduction appréciable du principal indicateur bactérien de pollution fécale (*Escherichia coli*). Néanmoins, l'élimination des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux n'est pas optimale causant un apport de ces particules virales dans le tronçon de rivière étudié. Une majorité de bactériophages appartenant au génogroupe II est donc rejetée en continu dans l'Alzette perdurant ainsi une rivière sous forte influence anthropique.

2 Détection des bactériophages ARN F-spécifiques

2.1 Détection des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux

Les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux ont été détectés *via* un test rapide d'infectiosité (norme ISO 10705-1 :2001). Ce test consiste à mettre en contact l'échantillon d'eau environnemental à analyser avec une suspension de bactéries réceptrices (souche WG49 de *Salmonella enteric typhimurium*) en phase exponentielle de croissance (Havelaar and Hogeboom, 1984). Chaque bactériophage infectieux présent dans l'échantillon détruit la bactérie hôte et libère de nouveaux virions. L'infection des bactéries hôtes voisines se poursuit et induit la formation d'une

zone de lyse (ou destruction locale du tapis bactérien). Le dénombrement de ces plages de lyse (appelées unité formant plages = UFP) permet de déterminer le titre phagique dans l'échantillon.

2.2 Détection des bactériophages ARN F-spécifiques totaux

2.2.1 *Choix du système de détection des génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques*

Une détection directe des génogroupes présents dans l'échantillon environnemental, ou après culture, à partir des plages de lyses issues du dénombrement des bactériophages infectieux, ont été réalisées dans la présente étude. Pour ce faire, un protocole de reverse transcription et de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel (RT-qPCR) a été utilisé pour identifier et/ou quantifier séparément les 4 génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques totaux.

Dans les deux cas, les amorces et sondes sélectionnées par Ogorzaly et Gantzer (2006) ont été utilisées. D'autres systèmes RT-qPCR existent pour détecter spécifiquement les génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques (Kirs and Smith, 2007; Wolf et al., 2008). Néanmoins, la zone d'étude étant fortement sous influence anthropique, le système RT-qPCR développé par Ogorzaly et Gantzer (2006) semble être le plus adapté pour suivre une pollution urbaine (Hartard et al., 2015). En effet, les sondes sélectionnées pour les génogroupes II et III ciblent préférentiellement les souches d'origine urbaine tandis que le système RT-qPCR développé par Wolf et al. (2010) aurait un spectre plus large en détectant des souches de génogroupe III d'origine urbaine et animale.

2.2.2 *Construction de gammes standards pour la quantification des génogroupes*

Afin de déterminer la concentration en ARN dans les échantillons environnementaux, quatre gammes standards ont respectivement été développées pour les 4 génogroupes.

Une partie des séquences génomiques des bactériophages MS2 (NC001417), GA (NC001426), MXI (AF059242) et SP (X07489), appartenant respectivement aux génogroupes I, II, III et IV, ont été insérées dans 4 plasmides distincts (pEX-A, Eurofins Genomics). Ces plasmides ont ensuite été transcrits en ARN (RiboProbe® *in vitro* transcription Systems, Promega) afin de prendre en compte l'étape de transcription inverse en plus de la PCR en temps réel pour l'élaboration de ces gammes. Une limite de détection de 10 copies de génome par réaction RT-qPCR a été déterminée pour chaque génogroupe (Figure 27).

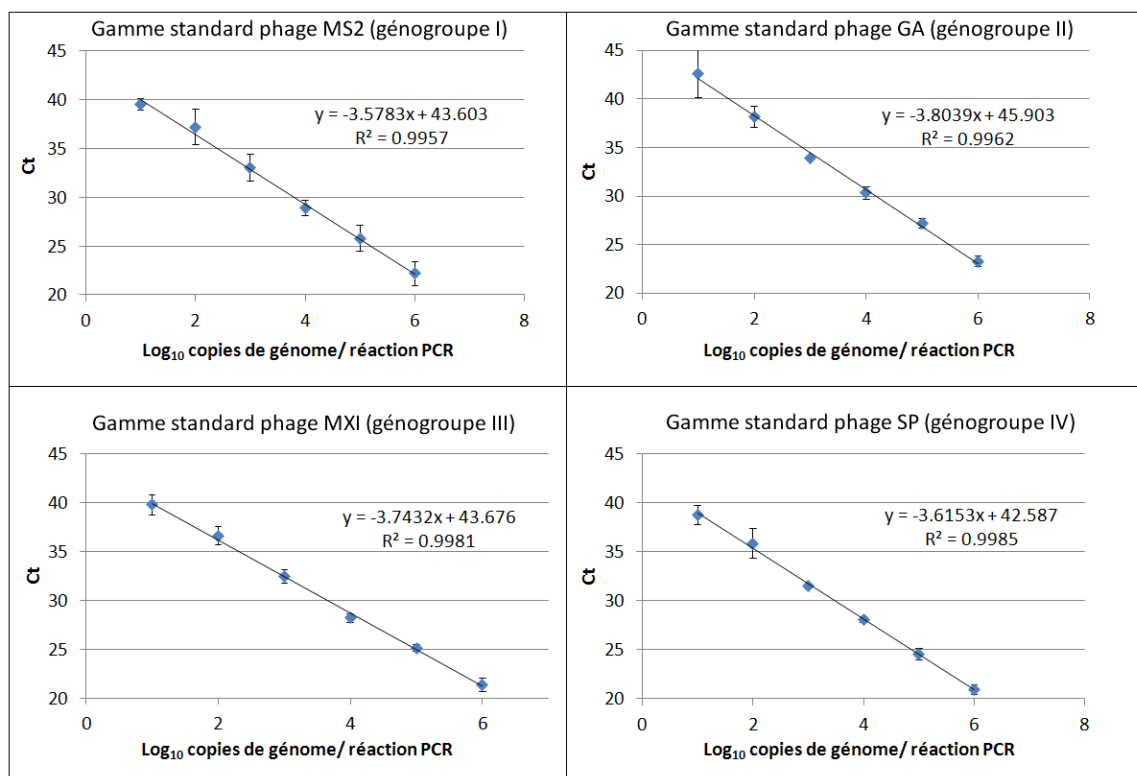


Figure 27 Gammes standards établies pour la quantification des génogroupes I, II, III et IV.

2.3 Intérêt d'une quantification des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux

Dans la présente thèse, les bactériophages ARN F-spécifiques ont été détectés dans les échantillons environnementaux par l'intermédiaire de trois méthodes :

- le dénombrement des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux par la méthode en double-couche (Norme ISO 10705-1 :2001) ;
- l'identification des génogroupes infectieux suite à l'analyse par RT-qPCR des plages de lyses ;
- la quantification des bactériophages totaux (infectieux + non infectieux + ARN libre) suite à la quantification directe du génome extrait des échantillons par RT-qPCR.

Ces trois méthodes apportent donc des informations différentes sur les bactériophages ARN F-spécifiques détectés dans l'échantillon analysé. De plus, ces données sont complémentaires et leur combinaison aide à une interprétation des résultats. Par exemple, l'attachement des bactériophages ARN F-spécifiques au sédiment a pu être évalué suite aux résultats combinés des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux. En effet, la quantification des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux ne permet pas à elle seule de conclure sur l'attachement des phages au sédiment. C'est l'effet combiné d'une réduction des particules totales et infectieuses en présence de sédiment qui le permet (cf chapitre 5).

Ainsi, ces trois méthodes de détection distinctes offrent à la fois une analyse complète de l'échantillon mais également un outil pour l'interprétation des résultats.

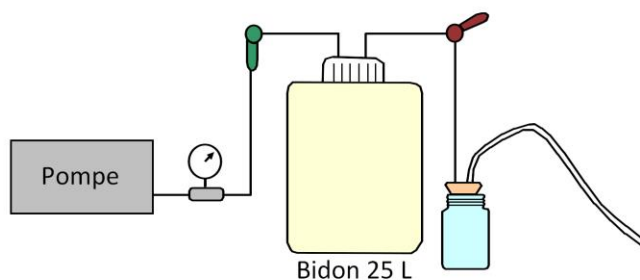
3 Analyse du sédiment

3.1 Méthode de prélèvement

Afin de comprendre les transferts des particules virales entre la colonne d'eau et le sédiment, la couche supérieure du lit de la rivière a été préférentiellement prélevée. Ces premiers centimètres de sédiment constituent un dépôt récent et peuvent potentiellement être remis en suspension lors de perturbations hydro-climatologiques.

Pour collecter uniquement cette couche fine supérieure de sédiment, un système de pompe à vide a été développé (Figure 28). Une bouteille en verre stérile de 1 litre est raccordée de part et d'autre à un gros bidon de 25 litres (préalablement vidé de son air pour avoir la fonction de « pompe à vide ») et à un tuyau en plastique rigide (diamètre de 25 mm) pour aspirer le sédiment. Deux vannes placées de part et d'autre du bidon permettent de contrôler le système pour, faire le vide dans le bidon mais aussi pour aspirer le sédiment.

A) 1) Extraction de l'air contenu dans le bidon



2) Aspiration du sédiment grâce au vide établi dans le bidon

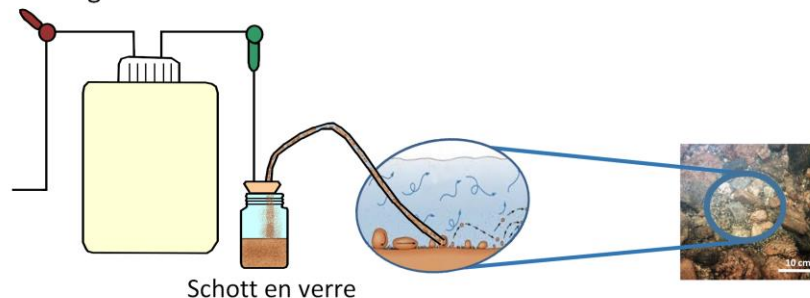


Figure 28 (A) Schématisation du système développé pour aspirer la couche supérieure de sédiment au fond de la rivière. (B) Prélèvement de sédiment dans l'Alzette par l'intermédiaire du système d'aspiration.

3.2 Elution des particules virales

A l'heure actuelle, aucune méthode n'a été définie comme méthode de référence pour l'élution des particules virales à partir de sédiment. Néanmoins, certaines étapes sont communes à l'ensemble des protocoles observés tels que le contact du sédiment avec un tampon d'élution, une forte

agitation pour décrocher les particules virales puis une étape de centrifugation pour récupérer l'éluat contenant les virus. Des tests ont donc été réalisés sur certaines étapes de ce protocole pour récupérer et détecter au mieux les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux du sédiment (Figure 29).

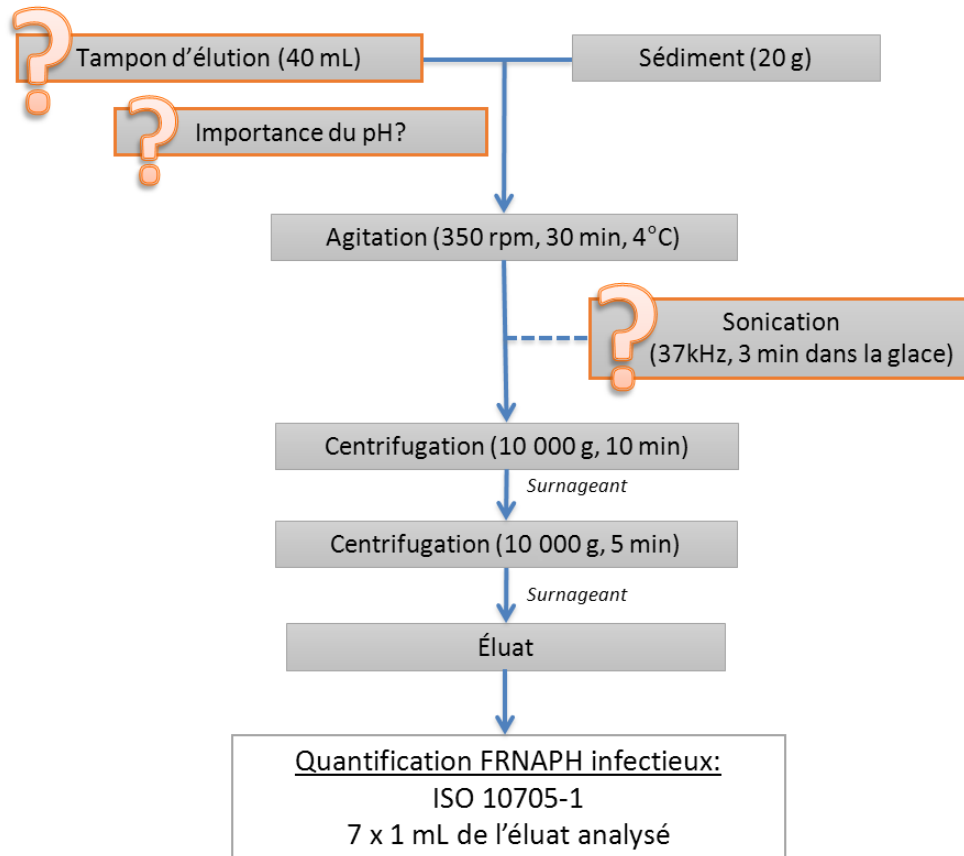


Figure 29 Étapes étudiées pour l'élution des bactériophages ARN F-spécifiques à partir de sédiment.

Dans un premier temps, trois tampons d'élution, souvent utilisés dans la littérature, ont été testés :

- l'extrait de bœuf 3% + glycine 0,05 M, pH 9,5 (Rao et al., 1984)
- le tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0 (Haramoto et al., 2009)
- le tampon pyrophosphate 0,01 M, pH 9,5 (Danovaro et al., 2001)

Trois échantillons de sédiment, collectés à des dates différentes, ont été respectivement traités avec les trois tampons d'élution (Figure 29). Les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux obtenues pour ces trois échantillons ne sont significativement pas différentes (test ANOVA, $p=0,476$). Le tampon pyrophosphate à 0,01 M, pH 9,5, a donc été choisi comme tampon d'élution en raison de sa simplicité de préparation et de sa faible composition en protéines qui pourrait interférer avec les réactions de RT-qPCR.

La nécessité de détecter les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a suscité le questionnement de l'utilité d'un pH élevé pour leur élution du sédiment. En effet, l'inactivation de la particule virale a lieu préférentiellement à des pH extrêmes (Schaper et al., 2002a). C'est pourquoi, l'élution des bactériophages ARN F-spécifiques à partir de trois échantillons de sédiment a été testée avec du tampon pyrophosphate 0,01 M à pH 7,0 et pH 9,5. Aucune différence significative n'est

observée entre les concentrations de bactériophages ARN F-spécifiques obtenues à pH 7,0 ou à pH 9,0 (test t, $p=0,841$). Cependant, afin de prendre le maximum de précautions possibles pour éviter l'inactivation des phages, le tampon pyrophosphate 0,01 M à pH 7,0 a donc été préféré.

De nombreuses études ont montré que la sonication est essentielle à la récupération des particules virales du sédiment (Danovaro et al., 2001; Maranger and Bird, 1996; Skraber et al., 2009). Afin de tester l'effet combiné du tampon pyrophosphate et d'un traitement aux ultrasons, trois échantillons de sédiment ont été élués avec et sans sonication. Le traitement a été réalisé durant 3 minutes, dans un bain de glace pour limiter l'inactivation des particules phagiques (Danovaro et al., 2001). Les concentrations obtenues en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux avec et sans sonication ne sont pas significativement différentes. Néanmoins, le niveau de signification est proche du seuil de probabilité (test t, $p=0,053$) (Figure 30). C'est pourquoi, à la vue de ces résultats, la sonication a été ajoutée aux étapes du protocole d'éluion des particules phagiques.

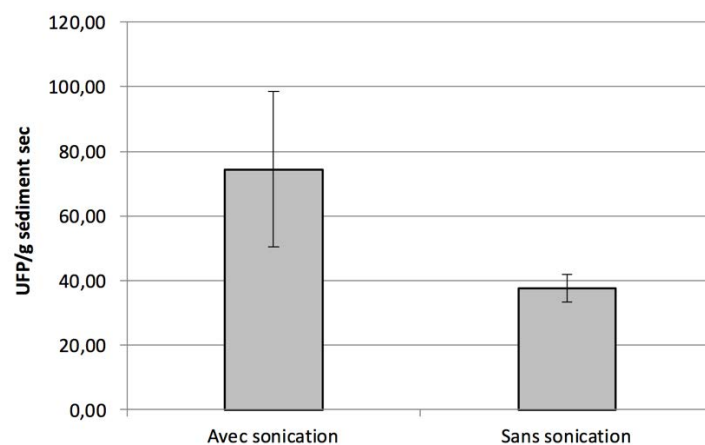


Figure 30 Effet de la sonication sur l'éluion des bactériophages ARN F-spécifiques du sédiment.

Ce protocole définitif a donc été appliqué pour l'éluion des bactériophages ARN F-spécifiques du sédiment au cours de cette étude (Figure 31).

Afin de déterminer le rendement du protocole d'éluion sélectionné, différents échantillons de sédiment ($n=6$) ont été dopés avec une souche environnementale majoritairement détectée dans le sédiment, c'est-à-dire la souche BZ13 DL20 (FJ483839) appartenant au génogroupe II (prédominance de 29,0% de la souche DL20 sur l'ensemble des souches détectées dans le sédiment, $n=107$).

Après 180 minutes de contact entre la souche DL20 et le sédiment (agitation à 250 rpm à 4°C), une étape de centrifugation (10 minutes à 10 000 g) a permis de séparer le sédiment de la solution stock en bactériophages. L'hypothèse est que la majorité des bactériophages DL20 ajoutés se sont attachés au sédiment.

Le sédiment dopé a ensuite été élué selon le protocole d'éluion défini (Figure 31). Une comparaison entre la concentration obtenue en bactériophages ARN F-spécifiques suite à l'éluion du sédiment dopé et la concentration initiale de la solution stock de la souche DL20 a permis d'évaluer le rendement du protocole d'éluion. La concentration naturelle en bactériophages ARN F-spécifiques dans le sédiment a également été évaluée et est négligeable par rapport à la concentration dopée.

Plus de 10% des bactériophages infectieux initialement ajoutés ont été détectés suite à l'application du protocole d'élution. Une variabilité de ce rendement a été observée, celle-ci pouvant être due à la matrice de sédiment, différente entre les 6 essais ($29,3 \pm 16,0\%$). De plus, ces rendements sont peut-être sous-estimés puisqu'ils partent de l'hypothèse que 100% des bactériophages DL20 se sont attachés au sédiment.

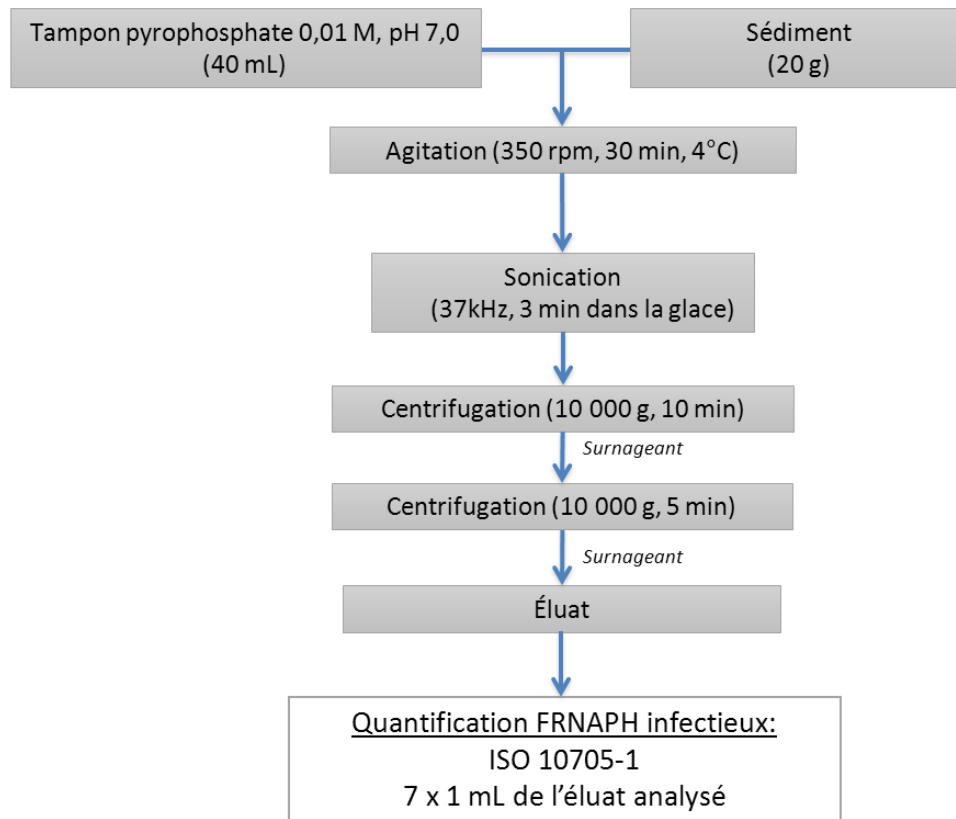


Figure 31 Protocole d'élution des bactériophages ARN F-spécifiques à partir de sédiment.

*Chapitre 3 : Propagation des bactériophages
ARN F spécifiques dans l'Alzette dans des
conditions hydro-climatologiques stables*

De précédentes études décrivent la présence des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de rivière (Lucena et al., 2003; Ogorzaly et al., 2009; Skraber et al., 2002) et dans les sédiments (Haramoto et al., 2009; Skraber et al., 2009). Leur détection respective dans ces deux compartiments met en évidence une dissémination des particules virales dans l'environnement hydrique. Néanmoins, à l'heure actuelle, peu d'études ont examiné les différentes routes empruntées par un virus suite à son introduction dans l'environnement (Skraber et al., 2002).

Ainsi, l'objectif principal de ce premier chapitre est d'analyser la propagation et le comportement des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'eau de la rivière de l'Alzette dans des conditions hydro-climatologiques stables (débit de base de la rivière où l'eau provient essentiellement des nappes souterraines en absence de précipitations). Deux principales voies de dissémination ont été étudiées : (i) la dispersion des particules virales dans les eaux de surface au fil de l'eau, contrôlée par les facteurs environnementaux et (ii) la sédimentation des bactériophages.

Afin de répondre à cet objectif, neuf campagnes de propagation ont été réalisées. Lors de chaque campagne, l'eau de surface et le sédiment ont été collectés en six points d'échantillonnage le long du tronçon étudié. La présence en amont d'une source de pollution fécale continue (effluent de la station d'épuration d'Hespérange) assure un apport constant en bactériophages ARN F-spécifiques dans le système hydrique. Le temps de résidence de la masse d'eau a été déterminé en fonction du débit de la rivière de manière à suivre précisément la propagation des bactériophages ARN F-spécifiques d'un point à un autre lors de chaque campagne.

Dans un premier temps, la dispersion des bactériophages ARN F-spécifiques a été étudiée dans le compartiment eau de surface. Le temps de résidence de la masse d'eau a été pris en compte lors de chaque campagne de propagation. Les 3 km de la section étudiée ont été parcourus par la masse d'eau en moins de 4 heures lors des campagnes réalisées en hiver et en plus de 10 heures lors des campagnes estivales. Ces différents temps de séjour ont été considérés lors du suivi des bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière ; une même masse d'eau étant échantillonnée à différents temps. Deux profils de propagation ont pu être observés au cours de ces neuf campagnes (Figure 32). Pour les campagnes où la température de l'eau était inférieure à 8°C et le débit de la rivière supérieur à 1,99 m³/sec, les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux sont restées stables tout au long de la section étudiée. A l'inverse, une décroissance des concentrations en fonction de la distance à la source a été observée pour les campagnes où la température de l'eau était supérieure à 11°C et le débit de la rivière inférieur à 1,45 m³/sec. Ainsi, outre l'influence du débit de la rivière dans la propagation des bactériophages ARN F-spécifiques, les résultats ont révélé une inactivation naturelle de ces particules phagiques en fonction de la température.

Afin de caractériser plus en détail la survie *in situ* des bactériophages ARN F-spécifiques, 287 plages de lyse de bactériophages infectieux, isolées des échantillons d'eau de surface des neuf campagnes de propagation, ont été identifiés par RT-qPCR (Ogorzaly et al., 2009). L'analyse de la distribution des bactériophages infectieux en fonction des conditions de température de l'eau et de débit a permis de mettre en évidence une différence de survie des génogroupes des bactériophages ARN F-

spécifiques, avec une persistance moins importante des bactériophages infectieux du génogroupe III comparés à ceux du génogroupe II.

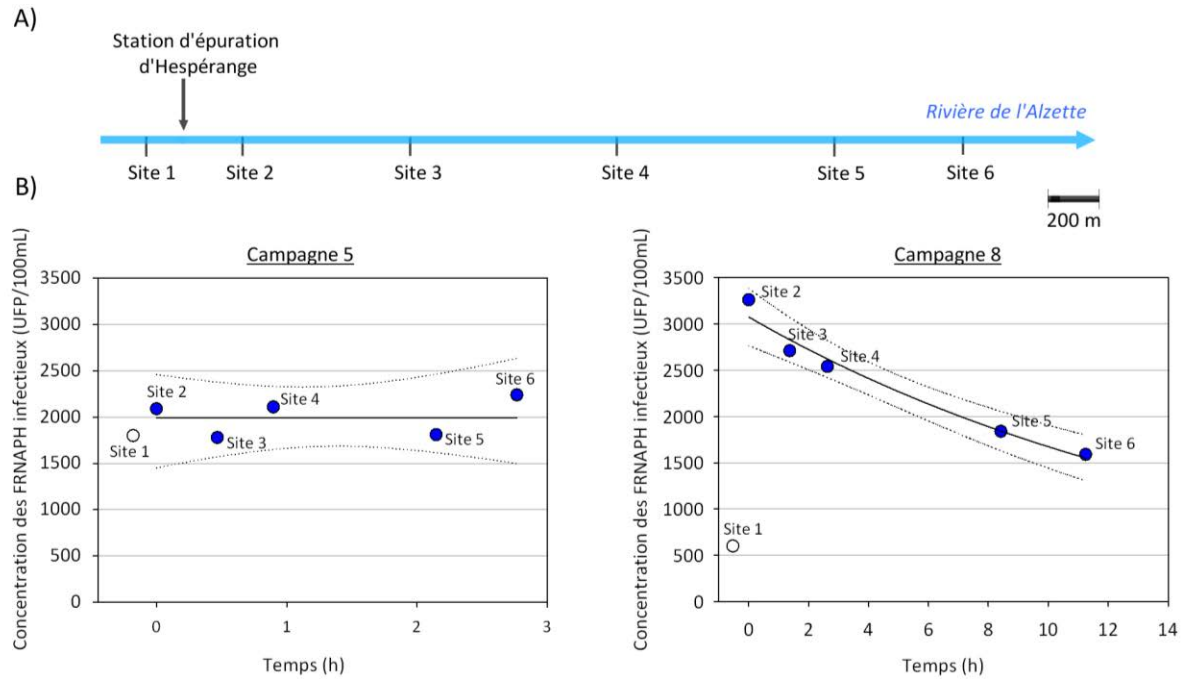


Figure 32 (A) Schématisation des six sites d'échantillonnage le long de l'Alzette et (B) mis en évidence des deux profils de propagation des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux observés lors de températures inférieures à 8°C et débits de la rivière supérieurs à 1,99 m³/sec (ex. campagne 5) et inversement (ex. campagne 8). Les modélisations de décroissance exponentielle sont indiquées en trait plein noir tandis que les limites de confiance (95%) sont en pointillées.

Pour chaque campagne où la température de l'eau dépassait les 11°C et le débit de la rivière était inférieur à 1,45 m³/sec, la décroissance exponentielle des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a pu être modélisée selon l'équation suivante : $C_d = C_0 \times e^{-k_d d}$, où C_0 est la concentration en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans la rivière à l'endroit du déversement (effluent de la station d'épuration), C_d la concentration en bactériophages infectieux à une distance d de la source de pollution et k_d le coefficient de décroissance exponentielle de la concentration en phages en fonction de la distance à la source de pollution. L'utilisation du temps de résidence de la masse d'eau a permis de déterminer la décroissance des phages en fonction du temps et ainsi de la modéliser selon l'équation suivante : $C_t = C_0 \times e^{-k_t t}$.

A partir de ces modélisations, la distance (D_{90}) et le temps (T_{90}) nécessaire à éliminer 90% de la concentration en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux ont été déterminés. Les valeurs de D_{90} et T_{90} estimées variaient respectivement de 2,8 à 9,5 km et de 11 h 16 min à 37 h 45 min.

Dans un deuxième temps, la sédimentation des bactériophages ARN F-spécifiques comme autre voie principale de dissémination a été évaluée afin de compléter l'analyse de la dynamique *in situ* des particules virales dans le tronçon étudié. La détection des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans le sédiment a confirmé leur transfert de la colonne d'eau vers le fond du lit de la rivière. Néanmoins, l'absence de décroissance significative en fonction de la distance à la source des

bactériophages totaux appartenant au génogroupe II, génogroupe détecté le plus abondant, n'a pas permis de confirmer cette hypothèse.

L'ensemble de ces résultats est présenté de façon plus détaillée sous la forme d'un article scientifique publié dans le journal Food and Environmental Virology.



ORIGINAL PAPER

In Situ Dynamics of F-Specific RNA Bacteriophages in a Small River: New Way to Assess Viral Propagation in Water Quality Studies

Blandine Fauvel^{1,2,3} · Christophe Gantzer^{2,3} · Henry-Michel Cauchie¹ · Leslie Ogorzaly¹

Received: 11 August 2016 / Accepted: 30 September 2016
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The occurrence and propagation of enteric viruses in rivers constitute a major public health issue. However, little information is available on the in situ transport and spread of viruses in surface water. In this study, an original in situ experimental approach using the residence time of the river water mass was developed to accurately follow the propagation of F-specific RNA bacteriophages (FRNAPHs) along a 3-km studied river. Surface water and sediment of 9 sampling campaigns were collected and analyzed using both infectivity and RT-qPCR assays. In parallel, some physico-chemical variables such as flow rate, water temperature, conductivity and total suspended solids were measured to investigate the impact of environmental conditions on phage propagation. For campaigns with low flow rate and high temperature, the results highlight a decrease of infectious phage concentration along the river, which was successfully modelled according to a first-order negative exponential decay. The monitoring of infectious FRNAPHs belonging mainly to the genogroup II was confirmed with direct phage genotyping and total phage particle quantification. Reported *k* decay coefficients according to exponential models allowed for the determination of the actual in situ distance

and time necessary for removing 90 % of infectious phage particles. This present work provides a new way to assess the true in situ viral propagation along a small river. These findings can be highly useful in water quality and risk assessment studies to determine the viral contamination spread from a point contamination source to the nearest recreational areas.

Keywords F-specific RNA bacteriophages · In situ propagation modelling · In situ survival · Water · Sediment

Introduction

River water is often used for the production of drinking water, irrigation or recreational areas. Therefore enteric virus occurrence in surface water generates a sanitary risk and remains a major public health issue (Ganesh and Lin 2013; Kern et al. 2013; Rodrigues et al. 2015). After their discharge in surface water, viral particles can take a variety of potential routes. Firstly, viruses spread in surface water by advection process, which refers to transport with the water flow rate; and their occurrence is affected by some environmental factors (Fong and Lipp 2005; Gantzer et al. 1998). Temperature (Bertrand et al. 2012; Lee and Sobsey 2011; Ogorzaly et al. 2010) and sunlight (Fisher et al. 2011; Kohn and Nelson 2006; Wommack et al. 1996) are among the most important stressors reducing the virus infectivity. Secondly, virus association with suspended solid particles leads to settling down to the riverbed sediment. Numerous data have already described the presence of viruses in sediment (Hargreaves et al. 2013; Leroy et al. 2008; Skrabber et al. 2009) and considered this compartment as a virus reservoir (Bosch et al. 2003). In addition, a higher persistence of viruses in sediment than in the water

✉ Leslie Ogorzaly
leslie.ogorzaly@list.lu

¹ Department of Environmental Research and Innovation (ERIN), Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), 41, rue du Brill, 4422 Belvaux, Luxembourg

² Laboratoire de Chimie, Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, 5 rue Albert Lebrun, Nancy 54000, France

³ CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy 54000, France

column has been reported according to a protective effect from proteolytic enzymes or other degrading factors present in flowing water and UV inactivation (Liew and Gerba 1980; Smith et al. 1978). Finally, a mobilization of viruses accumulated in sediments can occur after natural or anthropogenic disturbances. The resuspension of sediment and subsequent release of viral particles into the water column constitute a diffuse input on contamination (Fauvel et al. 2016; Williamson et al. 2014). All of these environmental factors and processes, which govern the fate and propagation of viruses in surface water, have been relatively well documented in laboratory conditions, but very few studies have reported data on the in situ transport and spread of viruses in river (Skraber et al. 2002). In addition, another important point to consider in the monitoring of enteric viruses in surface water is the variability and diversity of interactions with surfaces and inactivation rate observed among viruses of both similar and different families. For example, several studies have already demonstrated the survival divergence of F-specific RNA bacteriophage (FRNAPH) genogroups (GGs) in water (Muniesa et al. 2009; Yang and Griffiths 2013) as well as their differing adsorption behavior with solid particles (Boudaud et al. 2012; Deboosere et al. 2012; Haramoto et al. 2015). FRNAPHs are considered good indicators to assess viral contamination due to the nature of their genome, their size, and structure that are similar to those of pathogenic viruses (Havelaar 1993). FRNAPHs belong to the *Leviviridae* family, which is divided into two genera and four GGs: *Levivirus* including GGI and GGII and *Allolevivirus* including GGIII and GGIV. FRNAPHs are ubiquitous in aquatic environments worldwide (Haramoto et al. 2009; Lucena et al. 2003; Ogorzaly et al. 2009) and therefore constitute a good tool to understand the fate of viral particles in a complex aquatic environment.

Several questions still have to be addressed to understand the fate of viral particles in a complex aquatic environment and provide useful information in the framework of water management strategies. One critical question is whether or not viruses can persist in high concentration in the water column long enough to cause disease in individuals in contact with polluted water. In other words, how long and how far from a point-source contamination can infectious viral particles travel? The T_{90} of FRNAPHs, time necessary to remove 90 % of infectious phages in surface water, was previously determined either via laboratory tests (Bae and Schwab 2008; Brion et al. 2002; Long and Sobsey 2004; Yang and Griffiths 2013) or in situ via dialysis sacs to permit contact of contained phages with the external aqueous milieu (Durán et al. 2002; Mocé-Llivina et al. 2005; Muniesa et al. 2009). However, no work has currently investigated the survival of viruses, directly observed in their natural media (i.e. viral particles from

river, without laboratory cultivation steps) and subjected to advection process as well as environmental stressors.

The work reported here provides an original experimental approach using the residence time of the river water mass to assess the real in situ propagation of enteric viruses. The purpose of this study was to determine the in situ dynamics of the F-specific RNA bacteriophages in a small river by implementing this new method. Two main dissemination routes were investigated: (1) the phage propagation in surface water controlled by environmental variables and (2) the phage settling onto sediment.

In that context, a river stretch more than 3 km long with a unique source of fecal contamination (the effluent of a wastewater treatment plant) was selected as the ideal site for studying the fate of phage particles. The F-specific RNA bacteriophages were detected according to three distinct methods during nine experimental campaigns covering different seasons. First, the propagation of infectious FRNAPHs was modelled as a function of either time or distance along the studied river stretch. Second, genotyping of 287 plaques of infectious FRNAPHs was performed in order to characterize the in situ survival of the distinct genogroups. Third, the quantification of the total phage particles was investigated and confronted with the data of the infectious phages in order to clarify the different dissemination routes of FRNAPHs.

Materials and Methods

Study Area

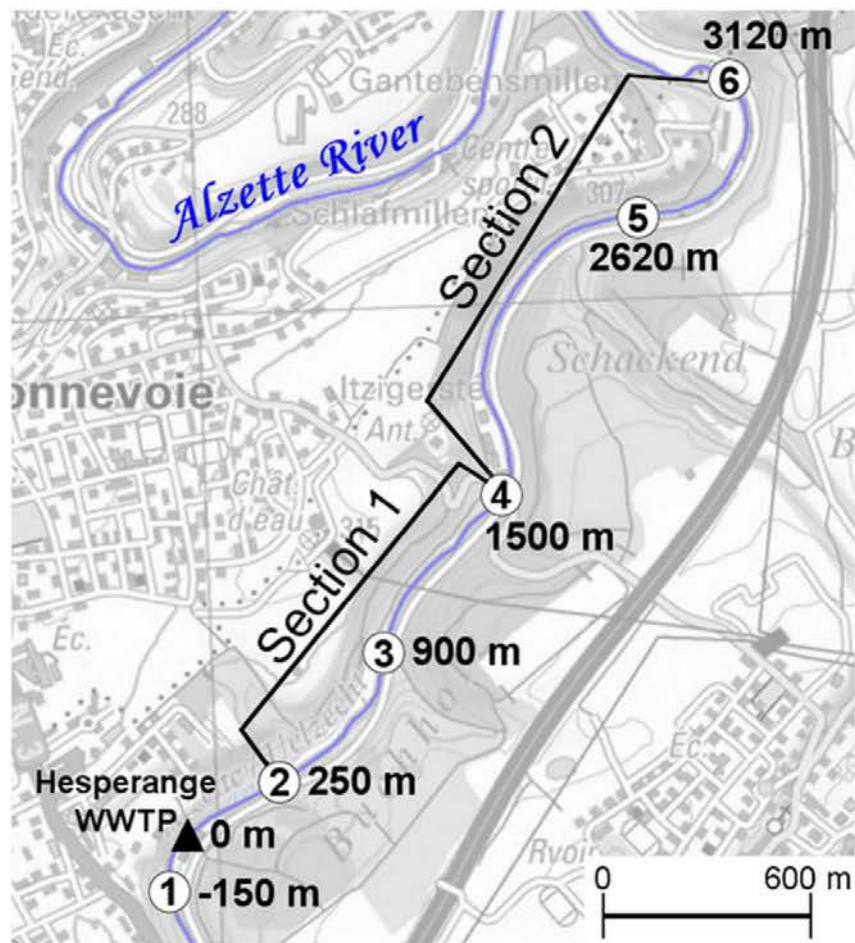
The study was conducted on the Alzette River, one of the main rivers in Luxembourg. In order to follow water mass and viral contamination, the 3.1 km-long river study site (Fig. 1) was selected based on the following conditions. On one hand, the effluent of a wastewater treatment plant (WWTP) upstream from the studied section allows for a continuous point source of fecal pollution. The presence of non-point sources, such as surface runoff or waterfowl are inherently more difficult to characterize. In order to minimize these sources, all samplings were performed under stable hydro-climatological conditions. On the other hand, the river stretch is a simple hydrographic network without dead arms. The alternation of segments with high flow velocity and slower velocity zones are supposed to ensure a good mixing of water and settling areas of suspended solids.

Input Pollution Sources

Upstream River Water

Three WWTP were located upstream from the studied area with respective capacities of 24,500, 90,000 and 95,000

Fig. 1 Profile of the studied river stretch. Numbers 1–6 indicate the six sampling sites. Conductivity monitoring point for the water residence time establishment were located at the sites 2, 4 and 6 and marked out both sections with different stream velocity



inhabitant-equivalents. The first WWTP was located 10 km upstream and the others were located further upstream. Fecal pollution upstream from the studied area was characterized during the nine sampling campaigns, with the collection and analysis of surface water at the site 1. An average of $1.01 \pm 0.75 \times 10^4$ (mean $\pm$ standard deviation) most probable number (MPN) per 100 mL of *Escherichia coli* and $8.48 \pm 6.52 \times 10^2$ plaque forming units (PFU) per 100 mL of infectious FRNAPHs were detected. Total phage particles were determined and revealed the presence of $7.61 \pm 2.34 \times 10^2$ genome copies (gc) per 100 mL for GGI, $2.74 \pm 2.20 \times 10^4$ gc/100 mL for GGII and $7.88 \pm 3.82 \times 10^2$ gc/100 mL for GGIII.

Hesperange Wastewater Treatment Plant

The WWTP of Hesperange constitutes the single point source of fecal pollution of the study area. This plant was renovated in 2006 and is composed of a primary treatment

followed by an activated sludge plant with nitrifying moving bed biofilm reactor technology. Its maximum capacity is 26,000 inhabitant-equivalents. *Escherichia coli* and infectious FRNAPHs were detected at the outlet of the WWTP with an average (9 campaigns) of $2.59 \pm 0.98 \times 10^4$ MPN/100 mL and $8.86 \pm 7.62 \times 10^3$ PFU/100 mL, respectively. Three out of four genogroups were observed in effluents: GGI ($2.68 \pm 3.77 \times 10^4$ gc/100 mL), GGII ($2.34 \pm 0.97 \times 10^5$ gc/100 mL) and GGIII ($4.03 \pm 6.10 \times 10^4$ gc/100 mL). Fecal pollution contribution of WWTP effluent in the river stretch was assessed by the comparison of *E. coli* and FRNAPH concentrations detected in surface water between upstream (site 1) and downstream (site 2) of the Hesperange WWTP. Concerning the input of *E. coli* in the river, the WWTP did not contribute significantly (Mann–Whitney rank sum test, $p = 0.724$) whereas a statistical difference was observed for infectious FRNAPHs (Mann–Whitney rank sum test, $p = 0.042$). This input of phage pollution by the WWTP effluent was particularly

perceptible during campaigns performed at low flow rates (Mann–Whitney rank sum test, $p = 0.041$) compared to higher flow rates (Mann–Whitney rank sum test, $p = 0.400$) due to a dilution effect.

Determination of Residence Time

In order to follow the water mass transiting along the river, the conductivity was used as a natural marker at different points of the transit sector. Three conductimeters (WTW Multi 3420) were placed along the studied stretch in accordance with the flow rate variation (Fig. 1). The whole section was therefore divided into two sections: the first one 1250 m in length with a faster flow rate (between site 2 and 4) and the second one 1620 m with a slower flow rate (between site 4 and 6). Water conductivity was monitored over several days with 15-min time gaps. Several sets of measurements were performed at different water levels to cover the variation of flow rate. Among the three conductimeter locations, similar peaks of conductivity were observed separately in time (Fig. 2a). This lag time is the time necessary of the charged water mass to cover the distance between each site. The knowledge of these times to cross sections 1 and 2 at different water levels enables the establishment of time residence equations for both sections of the Alzette River (Fig. 2b).

Surface water and sediment sampling

In addition to upstream samples (site 1), stream water and sediment samples were collected at five sampling sites dispatched along the studied area (from site 2 to site 6)

(Fig. 1). In order to have representative samples, water and sediment were taken in equal proportions from right bank, left bank, and middle of the river. The surface of the riverbed sediment was vacuumed with a pump system. Nine sampling campaigns were performed during 2014 and 2015 allowing a collection of 54 water and 42 sediment samples. Only seven out of nine campaigns (1, 2, 3, 6, 7, 8 and 9) were sampled for sediment, when the water level was lower than 60 cm. For each campaign, residence time of the water mass was determined in order to respect the travel time of water between each sampling sites (Table 3, in appendix). Samples were transported back to the laboratory in a refrigerated compartment before subsequent analysis. Sediment samples were stored for 24 h at 4 °C in order to remove excess water.

Hydrological and Physico-Chemical Data

The flow rate (m^3/s) of the Alzette River was estimated using the rating curve. The water level data, measured at the Hesperange WWTP, was provided by the “Administration de la Gestion de l’Eau”. Some factors, which can potentially affect the propagation of infectious FRNAPHs by either inactivating phages or influencing their interactions with environment, were evaluated for each water sample. Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$), water temperature ($^{\circ}\text{C}$), pH and oxygen ($\text{mg O}_2/\text{L}$) were measured with a portable probe (WTW Multi 3420). Total suspended solids (TSS) were quantified (mg/L) thanks to surface water filtration through glass fiber filter of $0.7 \mu\text{m}$ porosity (GF/F Whatman®). Finally, a measure of biochemical oxygen demand (BOD_5), biodegradable organic matter broken down

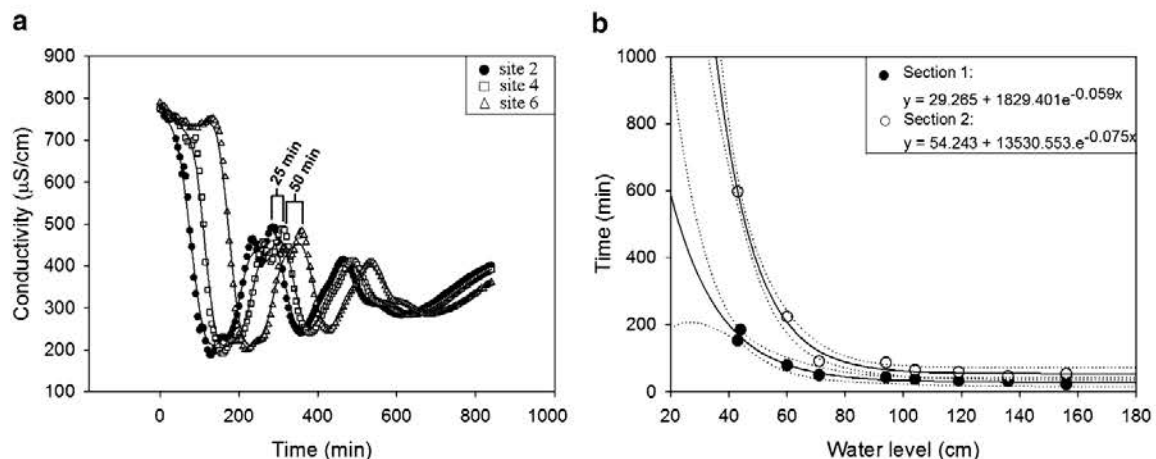


Fig. 2 **a** Water conductivity monitoring for a high water level (156 cm at the Hesperange WWTP) for section 1 (between site 2 and 4) and section 2 (between site 4 and 6). **b** Exponential regressions

(dark lines) of the residence time of the water body as a function of water level (95 % confidence limits in dotted lines). Each point represents an experimental measurement

by aerobic microorganisms after 5 incubation days (mg O₂/L), was determined (OxiTop[®] measurement system BOD₅).

Escherichia coli Determination

The fecal indicator bacteria *E. coli* concentration was quantified in water samples using the Colilert[®]-18 Quanti-tray[®] 2000 system (IDEXX Laboratories) and expressed in MPN/100 mL according to the manufacturer's instructions.

Elution of Phages From Sediment

Twenty milliliters of pyrophosphate buffer (0.01 M) at pH 7.0 were added to 10 g of wet sediment (sediment/liquid ratio = 0.5). The mixture was submitted to sonication (37 kHz) on ice for 3 min and interrupted for 30 s every minute for mixing manually the samples (Danovaro et al. 2001). Samples were then shaken at 400 rpm for 30 min at 4 °C (orbital shaker, KS 260 basic IKA[®]). Supernatant was retrieved twice after successive centrifugations at 10,000 g for 10 and 5 min, respectively. Ten 1-mL fractions of the supernatant were used for the determination of infectious FRNAPH concentration by plaque assay (cf. "Detection of Infectious F-Specific RNA Bacteriophages"). The recovery of the infectious FRNAPH elution step was assessed on different sediment samples by spiking a known amount of the most representative strain in sediment i.e. BZ13 strain DL20 (FJ483839) belonging to GGII. More than 10 % of infectious viral particles were found after the elution process with a recovery variability which could be influenced by the sediment matrix ($29.3 \pm 16.0 \%$, $n = 6$).

Detection of Infectious F-Specific RNA Bacteriophages

The concentration of infectious FRNAPHs was determined using *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* strain WG49 and the double-agar-layer technique as described in the ISO standard 10,705-1:2001. Nalidixic acid was added to media for limiting the growth of the abundant bacterial flora. Negative and positive controls (MS2 phage) were included in all analysis. Plates were incubated overnight at 37 °C before PFU counting. FRNAPHs were enumerated in 5 × 1 mL for each water sample and their concentrations were expressed in PFU/100 mL.

Plaque Isolation From Environmental Samples

From surface water samples collected along the 9 campaigns, 10 well-separated phage plaques formed on agar plates were randomly collected by micropipette aspiration and suspended in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich) supplemented with 5 % of

glycerol (Ogorzaly et al. 2009). After 1 min of agitation at 30 °C (1400 rpm, Thermomixer, Eppendorf), phage isolates (287 isolates) were stored at −80 °C until characterization by molecular tools.

Specific Detection of FRNAPH Genogroups by Real-Time RT-PCR

Genogroup-specific detection was carried out either directly on river water samples or on phages isolates obtained from the infectivity assay. In both cases, the primers/probes designed by Ogorzaly and Gantzer (2006) were selected to identify and/or quantify the four GGs, due to a spectral detection more adapted to track urban pollution (Hartard et al. 2015).

For river water samples, specific genogroup detection was performed on all water samples from the campaigns 4–9 resulting in 36 analyzed samples. A first step of clarification of surface water was performed (3000 g, 10 min) before concentration of phage particles by ultracentrifugation of 98 mL of water (Fauvel et al. 2016). After the RNA extraction (NucliSENS[®] Magnetic Extraction kit, BioMerieux, France), genogroup quantification was performed by a two-steps RT-qPCR method (Ogorzaly and Gantzer 2006) with some modifications (Fauvel et al. 2016). Construction of standard curves with target genomic sequences of each GG was developed to determine RNA genomic concentrations. A detection limit of 10 genome copies per RT-qPCR reaction was determined for the four GGs. A negative extraction control as well as negative and positive RT-qPCR controls were incorporated into each analysis. RT-qPCR inhibition was evaluated on the 36 analyzed samples by spiking a known amount of transcribed GA plasmids into extracted samples.

For the genotyping of infectious FRNAPHs, the real-time RT-PCR was directly conducted with a One-Step RT-PCR Kit (QuantiTech Probe RT-PCR, Qiagen, France) due to the high expected concentration of phages in one plaque (Ogorzaly et al. 2009).

Data Modelling and Statistical Analysis

The transport and propagation of FRNAPHs along the studied area was mathematically modeled. A first-order negative exponential equation was selected to fit the best to the field experiment data. The regression fit wizard was performed by the SigmaPlot 12.5 software according to the following equation: $C_t = C_0 e^{-kt}$, where t is time, k the first-order inactivation constant, C_0 is the initial concentration of phages, and C_t is the concentration of phages at time t . In this formulation, all of the factors and processes responsible for the virus dynamics are lumped into the single k constant.

Other statistical analyses were carried out with XLSTAT software (Addinsoft, France). Principal component analysis (PCA) was used to get a global overview of the effect of environmental variables on the infectious FRNAPH concentration in surface water, whereas Mann–Whitney and Spearman tests were used to compare two groups of data or to relate variable correlations, respectively.

Results

Fate of Infectious F-Specific RNA Bacteriophages in River

Propagation in water column

Nine campaigns of field experiments were carried out between June 2014 and July 2015, each one including the

monitoring of the water mass in order to follow FRNAPH propagation from a point source of fecal pollution. The time residence of the water mass for travelling over the river stretch evolved from one campaign to another according to fluctuation of the water level (Table 3, in appendix). The fate of infectious phage particles during each field campaign was modeled using FRNAPH concentration data as a first-order distance- or time-dependent decay kinetics. Two distinct patterns of FRNAPH propagation were observed (Fig. 3a, b). The first one showed a stable FRNAPH concentration all over the water course (campaigns 4, 5 and 6) whereas the other one described an exponential decay (campaigns 1, 2, 3, 7, 8 and 9). Among these decay models, one (campaign 2) was slightly different, needing the addition of a constant in the equation in order to fit to the data set ($C_t = a + C_0 e^{-kt}$). Indeed, infectious FRNAPH concentration from the campaign 2 presented a fast decrease between both first sites (sites 2 and 3) followed by a plateau phase along the rest of the

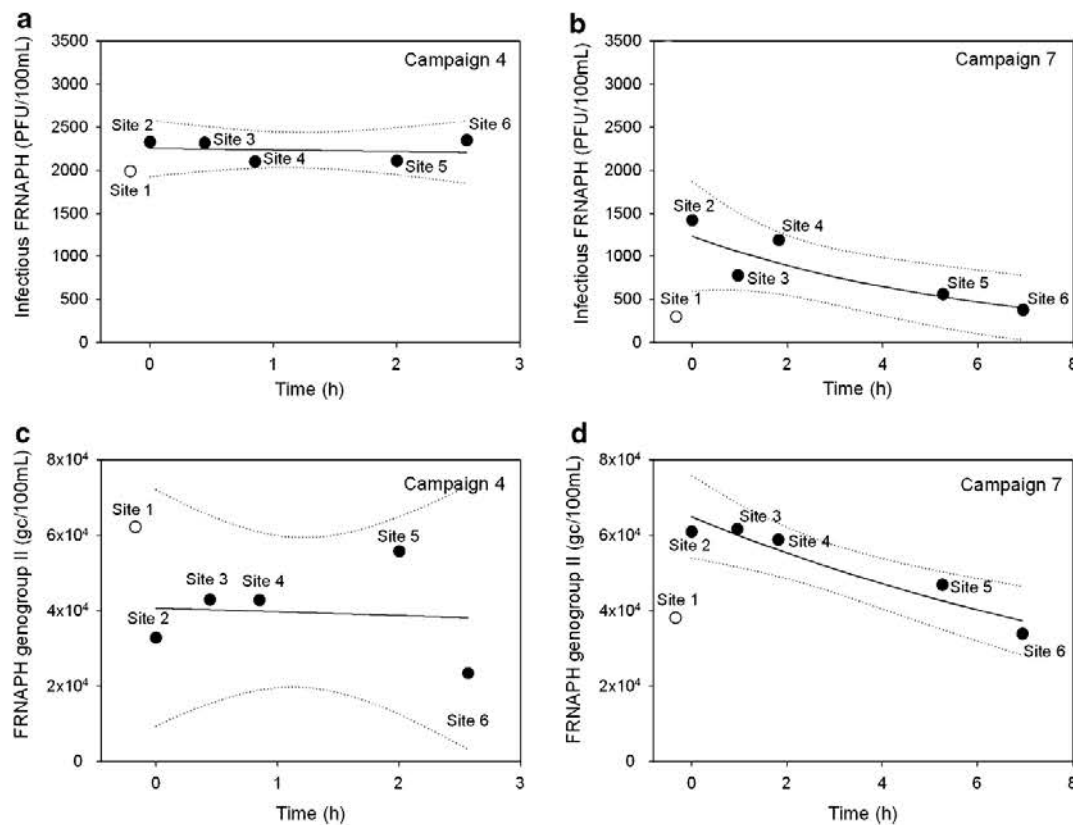


Fig. 3 Both propagation patterns of infectious F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) (a, b) and total genogroup II (c, d) observed along the studied river stretch according to the residence time of the water. First-order exponential regressions are indicated by

dark lines and 95 % confidence limits by dotted lines. Phage concentrations from upstream and downstream Hesperange wastewater treatment plant are represented in white and black points, respectively

Table 1 Data from exponential decay models describing the propagation of infectious FRNAPH along the studied area

Campaigns	Infectious F-specific RNA bacteriophages								Log ₁₀ reduction ^b
	Data from exponential decay models according to the distance $C_d = C_0 \text{ e}^{-kd}$				Data from exponential decay models according to the time $C_t = C_0 \text{ e}^{-kt}$				
	C_0	k	R^2	D_{90} (m)	C_0	k	R^2	T_{90} (h:min)	
1	1447.69	8.20E-04	0.996	2808.0	249.68	0.204	0.907	11:16	-0.99
2 ^a	1939.2	3E-3	0.968	×	1939.0	1.275	0.968	×	-0.41
3	1330.94	3.80E-04	0.887	6059.4	1156.38	0.096	0.970	23:57	-0.45
4	×	0	×	×	×	0	×	×	0.00
5	×	0	×	×	×	0	×	×	0.03
6	×	0	×	×	×	0	×	×	-0.03
7	1447.69	3.85E-004	0.676	5985.4	1233.12	0.161	0.716	14:18	-0.57
8	3470.98	2.43E-004	0.984	9479.6	3075.21	0.061	0.967	37:45	-0.31
9	1709.47	3.25E-004	0.654	7091.4	1547.00	0.082	0.841	28:05	-0.39

^a Equation of campaign 2 exponential decay model was different ($C_t = a + C_0 e^{-kt}$) and did not allow for the calculation of D_{90} or T_{90}

^b Log₁₀ reduction of infectious F-specific RNA bacteriophage concentrations between site 2 and site 6

studied stretch. These fitting exponential decay models resulted in a total of 6 validated k values allowing the determination of D_{90} (predicted distance in meter to achieve a 1-log₁₀ reduction of infectious FRNAPHs) and T_{90} (predicted number of hour to achieve a 1-log₁₀ reduction of infectious FRNAPHs) under the studied conditions (Table 1). The decay equation obtained for the campaign 2 did not allow for the calculation of D_{90} and T_{90} since 70 % of infectious FRNAPH reduction was observed between both first sites followed by a stable concentration. For the other campaigns presenting an exponential decay of phages, the estimated values of D_{90} and T_{90} varied with ranges from 2.8 to 9.5 km and from 11 h 16 to 37 h 45 min, respectively (Table 1).

Occurrence in Sediment

All of the 42 fresh sediment samples were positive for the presence of infectious FRNAPHs. No propagation pattern was observed along the studied area with a random variation of phage concentrations from one site to another (Fig. 6, in appendix). Indeed, an important dispersion occurred among all samples with an average of 96.8 ± 125.1 PFU/g of dry sediment and a minimum and maximum concentration of 0.7 PFU/g and 495.6 PFU/g, respectively.

Fate of Total Phage Particles in Surface Water

In addition to the monitoring of the infectious FRNAPHs, analysis of each FRNAPH GG was independently conducted with the RT-qPCR system developed by Ogorzaly and Gantzer (2006). All samples were inhibited at less than

20 % excepted for samples of the campaign 4 with 58 ± 6 % of inhibition. Among the four GGs, GGII was noted to be the most abundant in the 36 river water samples with 100 % of detection and a range from 4.7×10^3 to 6.3×10^4 gc/100 mL. Other GGs were not systematically detected with 33.3, 44.4 and 88.8 % of samples under the detection limit for GGI, GGIII and GGIV, respectively. The GGI (from 9.3×10^2 to 6.1×10^4 gc/100 mL) was observed more often than GGIII (from 3.2×10^2 to 1.7×10^4 gc/100 mL) and GGIV (from 3.1×10^2 to 6.2×10^2 gc/100 mL). Concentration variation among water samples can be due to the variation of GG discharges at the outlet of the Hesperange WWTP. The propagation modelling for GGI, GGIII and GGIV was precluded due to their low level of detection. However, for GGII, two distinct patterns of propagation were observed (Fig. 3c, d). For the campaigns 4, 5, 6 and 8, a weak random variation of GGII concentrations from one site to another occurred inducing a failure of the decay modelling, whereas an exponential decrease was observed along the studied area for both others campaigns (7 and 9). Both k values obtained ($k = 0.080$, $R^2 = 0.886$ and $k = 0.015$, $R^2 = 0.626$ for campaigns 7 and 9, respectively) were lower than those calculated for the infectious FRNAPHs. From these results, the GGII total phage particles seem to be less affected by environmental stressors or settling process than infectious FRNAPHs.

Effect of Environmental Factors on Infectious FRNAPHs

The effects of flow rate, conductivity, pH, water temperature, oxygen, TSS and BOD₅ on the infectious FRNAPH

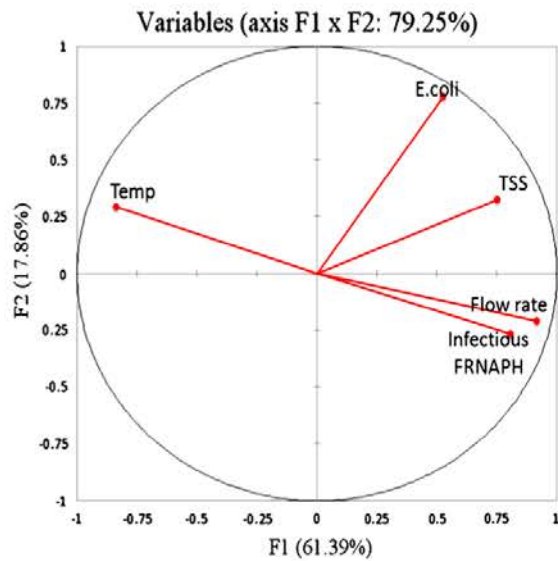


Fig. 4 Principal component analysis of the physico-chemical and microbiological parameters measured on water samples collected from site 2 to 6 during the 9 campaigns ($n = 45$). TSS total suspended solids; Temp water temperature; FRNAPH F-specific RNA bacteriophages

concentrations in river water were investigated. Water temperature (directly measured) and microbial activity (assessed with measurements of oxygen and BOD₅) can influence the survival of infectious FRNAPHs; whereas chemical composition (assessed with oxygen, pH and conductivity measurements) or presence of organic matter (assessed with BOD₅) can take part into the attachment of phage particles to TSS.

Conductivity, pH, oxygen and BOD₅ were stable over the 9 campaigns. The chemical composition of surface water and the presence of organic matter do not seem associated with the variability of microbiological measurements (infectious FRNAPHs and *E. coli*). On the

contrary, flow rate, water temperature and TSS varied (Fig. 7, in appendix). The relationships between these latter parameters, *E. coli* and infectious FRNAPHs were studied by PCA (Fig. 4). More than 79.25 % of the total information in the data can be explained with this PCA (PC1 61.39 %, PC2 17.86 %) and all of the variables considered are well represented with respect to the correlation circle. Table 2 presents the correlation matrix between all variable parameters. First, inability of fecal indicator bacteria to assess viral contamination in aquatic environment was shown by the absence of correlation between *E. coli* and infectious FRNAPHs (Spearman correlation test, $r = 0.286$, $p = 0.057$). Then, correlations were observed between infectious phages and other variables.

On one hand, total suspended solid was weakly positively correlated with infectious FRNAPHs ($r = 0.394$, $p = 0.008$). If phage particles are attached to TSS, they should present the same dynamic along the river stretch. A comparison of TSS and infectious FRNAPHs between the beginning (site 2) and the end (site 6) of the studied river section highlighted a different dynamic of each suspended particles. Whatever the external conditions, TSS concentrations along the studied river remained stable with a low range of log₁₀ reduction (from 0.12 to -0.22) between sites 2 and 6. Whereas propagation of infectious FRNAPHs varied depending on the external conditions with a high range of log₁₀ reduction (from 0.03 to -0.99).

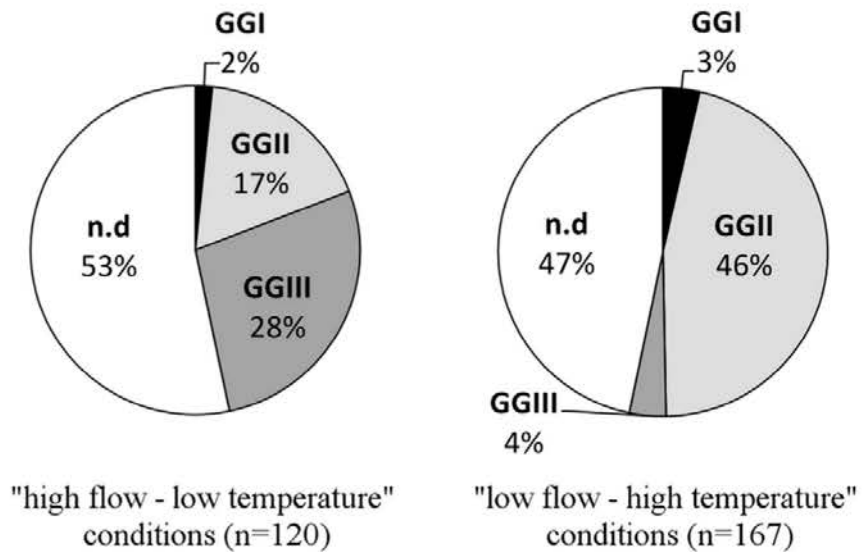
On the other hand, infectious phages were more significantly positively correlated with flow rate ($r = 0.698$, $p < 0.0001$) and negatively with water temperature ($r = -0.678$, $p < 0.0001$) (Table 1). In addition, important variations of flow rate and water temperature were measured during the 9 campaigns (from 0.53 to 4.16 m³/s and from 3.7 to 20.3 °C, respectively). According to these results and both different infectious FRNAPH patterns (cf. “Propagation in Water Column”), “high flow–low temperature” (campaigns 4, 5 and 6 where flow rate was higher than 1.99 m³/s and water temperature lower than 8 °C) and

Table 2 Correlation matrix (Spearman correlation coefficient and p values)

Variables	Temperature	TSS	<i>E. coli</i>	Infectious FRNAPHs	Flow rate
Temperature	1				
TSS	−0.433 $p = 0.003$	1			
<i>E. coli</i>	−0.321 $p = 0.032$	0.444 $p = 0.002$	1		
Infectious FRNAPHs	−0.678 $p < 0.0001$	0.394 $p = 0.008$	0.286 $p = 0.057$	1	
Flow rate	−0.822 $p < 0.0001$	0.602 $p < 0.0001$	0.346 $p = 0.020$	0.698 $p < 0.0001$	1

TSS total suspended solids; FRNAPHs F-specific RNA bacteriophages

Fig. 5 Distribution of the four genogroups (GG) of infectious F-specific RNA bacteriophages in surface water according to environmental conditions. *nd* Not detected with selected primers (Ogorzaly and Gantzer 2006)



"low flow–high temperature" (campaigns 1, 2, 3, 7, 8 and 9 where flow rate was lower than 1.45 m³/s and water temperature higher than 11 °C) conditions seem to have an effect on phage dynamic in the river.

Impact of Environmental Conditions on Infectious F-Specific RNA Bacteriophage Genogroup Repartition

Genogroup-specific detection carried out on 287 isolates showed different GG distributions according to environmental conditions (Fig. 5). Out of the 120 plaques isolated from "high flow–low temperature" conditions, 28 % were identified as belonging to GGII, 17 % to GGIII and 2 % to GGI. The distribution was different for "low flow–high temperature" conditions with a more important proportion of GGII (46 %) and less GGIII detected (4 %). In both cases, the proportion of not detected samples (53 and 47 % for both respective conditions) can be assimilated to a non-urban pollution depending on the choice of primers/probes (Hartard et al. 2015). Nevertheless, the affiliation to the *Leviviridae* family of 108 out of 142 non detected isolates was examined with a RNase test (ISO 10705-1). The addition of the RNase enzyme allows distinguishing FRNAPHs and F-specific DNA bacteriophages (FDNAPHs) (*Inoviridae* family). Each isolate suspension spotted onto plates containing *Salmonella typhimurium* strain WG49, which were not able to develop in presence of RNase activity, was confirmed to be FRNAPHs. Among the isolates tested with RNase, 70 % of them were confirmed to be FRNAPHs, 22 % were FDNAPHs and 8 % of plaques were not developed with or without nucleases.

Discussion

The objective of this study was to determine the in situ dynamics of F-specific RNA bacteriophages in a small river. To this purpose, an original experimental approach considering the residence time of the river water mass was applied along five sampling sites on the Alzette River. F-specific RNA bacteriophages were screened in surface water and sediment along nine sampling campaigns. Two principal dissemination routes were considered: (1) the spread of FRNAPHs in surface water controlled by environmental variables and (2) the settling onto sediment.

The transport of suspended particles related to water flow was the first way to consider in the phages' propagation. Infectious FRNAPHs were detected in the Alzette River with concentrations ranging from 1.5 to 3.5 log₁₀ PFU/100 mL, which was comparable to the results of previous studies (Lucena et al. 2003; Ogorzaly et al. 2009; Skraber et al. 2009). The analysis of all data collected from the nine campaigns emphasized that the variability of infectious FRNAPH concentrations was significantly correlated to flow rate and water temperature. For campaigns with high flow rates and low temperatures, the concentration of infectious FRNAPHs globally remained stable, whereas for campaigns with lower flow rates and higher temperatures, phage concentrations were lower and decreased along the river. The increase of flow rate is often associated with an increase of phages in surface water, due to the capability of the higher velocity to resuspend riverbed sediments (Fauvel et al. 2016), whereas an increase of water temperature is often associated with inactivation of infectious phages in surface water (Bae and Schwab

2008; Yang and Griffiths 2013). Therefore, in addition to the propagation of infectious FRNAPHs in surface water by advection processes, results reveal a natural inactivation of bacteriophages related to water temperature. The impact of the seasonal temperature (summer vs winter) on the survival of infectious FRNAPHs was previously shown (Durán et al. 2002; Hata et al. 2016). In order to characterize the in situ survival of the distinct genogroups of infectious FRNAPHs, genotyping of 287 individual infectious phage plaques was carried out. The distribution of GGII and GGIII differed according to flow rate and water temperature conditions. Infectious FRNAPHs belonging to GGIII were detected in lower proportion during “low flow–high temperature” than during “high flow–low temperature” in favor of GGII. The greater survival at high temperature of GGII compared to GGIII was previously reported (Long and Sobsey 2004). This view confirms previous observations regarding the differential persistence of FRNAPH GG in surface water (Muniesa et al. 2009; Schaper et al. 2002). Furthermore, the occurrence of infectious FRNAPHs belonging especially to GGII and GGIII highlight the anthropogenic pressure on the studied area. Indeed, FRNAPHs are often proposed as tracers to distinguish human (GGII and GGIII) from non-human (GGI and GGIV) fecal contamination sources (Lee et al. 2009, 2011). This predominance of an urban pollution in the Alzette River stretch is also confirmed by the abundance of total phage particles GGII directly quantified in water samples by RT-qPCR. Thus, the in situ propagation of infectious FRNAPHs in the studied river stretch mainly describes the behavior of infectious GGII phages.

As far as campaigns with low flow rate and high temperature are concerned, the transport of infectious FRNAPHs was successfully modeled according to a first-order exponential decay. This approach was already chosen by other authors as the best way to explain the dynamic of a microbial population in a small river (Beaudeau et al. 2001). Reported decay coefficients, k values, varied from 0.082 to 0.204 with the highest value of 1.275 for campaign 2. This single k -coefficient lumped together environmental stressors and processes responsible for infectious FRNAPH dynamics (Jamieson et al. 2004). The precedent described results highlighted the effect of flow rate and water temperature on the variability of infectious FRNAPHs. However, the k values obtained from models were not significantly correlated to temperature solely (Mann–Whitney rank sum test, $p = 0.059$) or flow rate solely (Mann–Whitney rank sum test, $p = 0.005$). Considering the k values, the monitoring of in situ phage propagation underlined that despite the predominance of environmental stressors such as water temperature and flow rate, the combination of all environmental factors explain the phage dynamics. The

intricacy of the environmental factor association was previously demonstrated. For example, Kutz and Gerba (1988) showed the different inactivating effect of the same temperature conditions on an enteric virus according to the type of water (tap water, polluted or unpolluted river water, etc.). This outcome underlined the combined impact of temperature and water chemical components on virus survival. The experimental approach developed in the present study therefore constitutes an interesting tool to assess the in situ survival of FRNAPHs in a river by taking into account the complexity of numerous environmental factors.

From exponential decay models of infectious FRNAPHs, corresponding T_{90} values were estimated to be ranging between 11 and 38 h in the studied river stretch. These values of T_{90} , estimated for a majority of infectious phages belonging to GGII, are globally lower than in other studies. Indeed, for strains belonging to GGII, Brion et al. (2002) and Yang and Griffiths (2013) have determined, in laboratory experiments, T_{90} values of 1.5 days to 4 days at 25 °C, respectively. Muniesa et al. (2009) have meanwhile shown through the use of dialysis bags a T_{90} of about 3 days for GGII phages in river water at 20 °C. The different characterization of the survival time of infectious FRNAPHs in these previous studies, either through laboratory tests or through the use of dialysis bags, compared to this work, can explained shorter T_{90} estimates of infectious FRNAPHs. This present work provides the first investigation on the real in situ survival of viruses, directly originating from the river and subjected to the combination of flow rate and environmental stressors.

In order to further enhance the determination of the in situ dynamics of FRNAPHs in the river, the settling of infectious FRNAPHs to sediment was the other main investigated dissemination route. The presence of infectious FRNAPHs in the sediment compartment confirms the settling of phage particles from surface water towards the sediment. However, no propagation pattern was observed in sediment samples along the studied area, phage concentrations varying randomly from one site to another. In the surface water compartment, a decrease of phage concentration from the pollution point source (WWTP) took place under “low flow–high temperature” conditions. In addition to infectious phage inactivation, the settling to sediment could also explain this reduction. In order to test this hypothesis, the monitoring of total phage particles was carried out in the surface water compartment. If only inactivation is responsible for the reduction of infectious FRNAPHs along the river, total phage particles (estimated by viral RNA quantification) have to remain stable in the water column. Whereas, if phage reduction is mainly due to the settling to sediment, a reduction of total phage particles would also be

observed. In this study, only the propagation of total phage particles belonging to GGII could be determined along the river stretch. The modelling for GGI, GGIII and GGIV was precluded due to their low level of detection. No significant decrease of FRNAPH GGII was observed under “low flow–high temperature” conditions with a weak random variation from one sampling site to another. Exceptions occurred for campaigns 7 and 9 with a weak decrease of total GGII phages. Nevertheless, this slight reduction of the total GGII phage particles compared to infectious FRNAPHs for these same campaigns did not permit confirming the settlement of phage particles. These results confirm on one hand the longer persistence of viral genomes compared to the infectious status of the corresponding virus (Bertrand et al. 2012; Gassilloud et al. 2003) and on the other hand the low impact of sedimentation. Finally, the stability of TSS concentrations disproves also the hypothesis of sedimentation as being significantly responsible for the decrease of FRNAPHs throughout the course of the river stretch. These last results highlighted the slow rate of the suspended particles sedimentation process, potentially undetectable in the time scale covered by the water mass transit along the studied sites.

To conclude, the innovative use of the residence time of the water mass enabled an accurate study of the in situ dynamics of FRNAPHs in a small river. First, the detection of FRNAPHs in three different ways allowed characterizing the main dissemination routes of the viral particles. The inactivation of infectious FRNAPHs was the major process of the in situ viral particle decrease along the river stretch whereas the settling onto sediment does not seem significantly responsible. It will be interesting to study the in situ dynamic of FRNAPHs in a longer section than the one selected here in order to overview both the propagation of viral particles in surface

water and their transfer to sediment. Secondly, in addition to the determination of the real in situ survival rate of infectious phages (T_{90}), this original phage monitoring described here allowed the estimation of the distance necessary to remove 90 % of infectious FRNAPHs (D_{90}). In the studied river stretch, D_{90} values were estimated to be ranging from 2.8 km up to 9.5 km. In the literature, no data is currently available to compare these D_{90} values since this is the first time that the in situ transport of a viral pollution is investigated. Since FRNAPHs can be considered as adequate model organisms for enteric viruses (Havelaar et al. 1993), these D_{90} values could be interesting data to complete risk assessment models. This new method of viral propagation monitoring can therefore be very useful in water quality and risk assessment studies for determining the spread of viral pollution from a point contamination source to the nearest recreational areas.

Acknowledgments The authors would like to thank Delphine Colard and Cécile Walczak from the LIST for their valuable technical assistance in sampling campaigns and lab experiments. We also thank Dr. Christian Penny (LIST) for the proficient proofreading of the final manuscript. This work was funded by an AFR grant from the National Research Fund (AFR code 6035344), Luxembourg.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Appendix

See Figs. 6 and 7 and Table 3.

Fig. 6 Concentration of infectious F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) in sediment samples at the 6 sampling sites during 7 campaigns

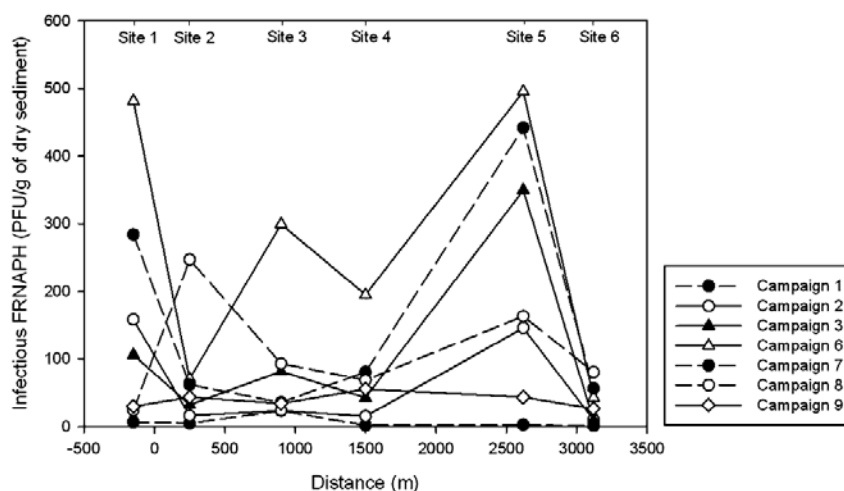


Fig. 7 Dispersion of the physico-chemical and microbiological parameters measured during the 9 sampling campaigns from site 2 to site 6 ($n = 45$). Box 25 and 75th percentiles, whisker 10 and 90th percentiles, horizontal line within the box median, dot minimum and maximum values. TSS total suspended solids; BOD_5 biochemical oxygen demand after 5 incubation days; FRNAPH F-specific RNA bacteriophages

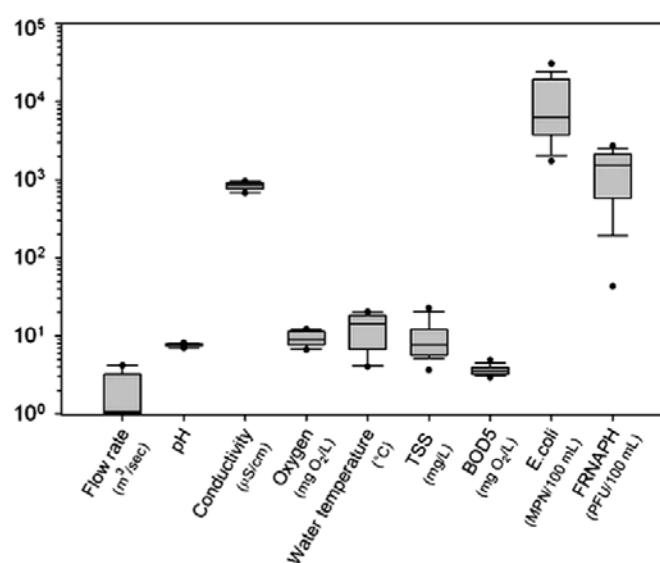


Table 3 Time residence of the water mass and stream velocity for sections 1 and 2 of the studied river during the 9 campaigns

Number of sampling campaign	Date	Water level (cm)	Time residence section 1 (min)	Stream velocity section 1 (m/s)	Time residence section 2 (min)	Stream velocity section 2 (m/s)
1	06/24/2014	42	183	0.11	634	0.04
2	01/07/2014	42	183	0.11	634	0.04
3	07/16/2014	44	166	0.12	553	0.05
4	01/14/2015	75	51	0.41	103	0.26
5	02/12/2015	71	57	0.36	120	0.22
6	03/17/2015	58	89	0.23	229	0.12
7	04/21/2015	53	109	0.19	308	0.09
8	06/03/2015	45	158	0.13	517	0.06
9	07/14/2015	43	174	0.12	592	0.05

References

- Bae, J., & Schwab, K. J. (2008). Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 477–484. doi:10.1128/AEM.02095-06.
- Beaudeau, P., Tousset, N., Bruchon, F., Lefèvre, A., & Taylor, H. D. (2001). In situ measurement and statistical modelling of *Escherichia coli* decay in small rivers. *Water Research*, 35(13), 3168–3178. doi:10.1016/S0043-1354(01)00011-2.
- Bertrand, I., Schijven, J. F., Sanchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., et al. (2012). The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1059–1074. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x.
- Bosch, A., Pintó, R. M., & Abad, F. X. (2003). Survival and transport of enteric viruses in the environment. In *Viruses in foods* (pp. 151–188). doi:10.1007/0-387-29251-9_6.
- Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., et al. (2012). Removal of MS2, Qβ and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Research*, 46(8), 2651–2664. doi:10.1016/j.watres.2012.02.020.
- Brion, G. M., Meschke, J. S., & Sobsey, M. D. (2002). F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Research*, 36(9), 2419–2425. doi:10.1016/S0043-1354(01)00547-4.
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Trucco, A., Serresi, M., & Vanucci, S. (2001). Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1384–1387. doi:10.1128/AEM.67.3.1384-1387.2001.
- Deboosere, N., Pinon, A., Caudrelier, Y., Delobel, A., Merle, G., Perelle, S., et al. (2012). Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiology*, 32(1), 48–56. doi:10.1016/j.fm.2012.04.007.
- Durán, A. E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., & Jofre, J. (2002). Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 338–347. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x.
- Fauvel, B., Cauchie, H. M., Gantzer, C., & Ogorzaly, L. (2016). Contribution of hydrological data to the understanding of the spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events. *Water Research*, 94, 328–340. doi:10.1016/j.watres.2016.02.057.
- Fisher, M. B., Love, D. C., Schuech, R., & Nelson, K. L. (2011). Simulated sunlight action spectra for inactivation of MS2 and PRD1 bacteriophages in clear water. *Environmental Science and Technology*, 45(21), 9249–9255. doi:10.1021/es201875x.
- Fong, T. T., & Lipp, E. K. (2005). Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(2), 357–371. doi:10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005.
- Ganesh, A., & Lin, J. (2013). Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. *International Journal of Environmental Health Research*, 23(6), 544–564. doi:10.1080/09603123.2013.769205.
- Gantzer, C., Dubois, É., Crance, J.-M., Billaudel, S., Kopecka, H., Schwartzbrod, L., et al. (1998). Influence of environmental factors on the survival of enteric viruses in seawater. *Oceanologica Acta*, 6(21), 983–992.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., & Gantzer, C. (2003). Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3965–3969. doi:10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003.
- Haramoto, E., Fujino, S., & Otagiri, M. (2015). Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment*, 520, 32–38. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.034.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., & Kunikane, S. (2009). Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan. *Water Research*, 43(15), 3759–3764. doi:10.1016/j.watres.2009.05.043.
- Hargreaves, K. R., Anderson, N. J., & Clokie, M. R. J. (2013). Recovery of viable cyanophages from the sediments of a eutrophic lake at decadal timescales. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(2), 450–456. doi:10.1111/1574-6941.12005.
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., & Gantzer, C. (2015). Occurrence of and sequence variation among F-specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6505–6515. doi:10.1128/AEM.01905-15.
- Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., & Tanaka, H. (2016). Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(14), 4244–4252. doi:10.1128/AEM.00621-16.
- Havelaar, A. H. (1993). A bacteriophage standard for bathing waters. Final report, Commission of the European Communities. B4, 3040/92/012609.

- Havelaar, A. H., Van Olphen, M., & Drost, Y. C. (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 2956–2962.
- Jamieson, R., Gordon, R., Joy, D., & Lee, H. (2004). Assessing microbial pollution of rural surface waters: a review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management*, 70(1), 1–17. doi:10.1016/j.agwat.2004.05.006.
- Kern, A., Kadar, M., Szomor, K., Berencsi, G., Kapusinszky, B., & Vargha, M. (2013). Detection of enteric viruses in Hungarian surface waters: first steps towards environmental surveillance. *Journal of Water and Health*, 11(4), 772–782. doi:10.2166/wh.2013.242.
- Kohn, T., & Nelson, K. L. (2006). Sunlight-mediated inactivation of MS2 coliphage via exogenous singlet oxygen produced by sensitizers in natural waters. *Environmental Science and Technology*, 41(1), 192–197. doi:10.1021/es061716i.
- Kutz, S. M., & Gerba, C. P. (1988). Comparison of virus survival in freshwater sources. *Water Science and Technology*, 20(11–12), 467–471.
- Lee, J. E., Lee, H., Cho, Y. H., Hur, H. G., & Ko, G. (2011). F+ RNA coliphage-based microbial source tracking in water resources of South Korea. *The Science of The Total Environment*, 412–413, 127–131. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.061.
- Lee, J. E., Lim, M. Y., Kim, S. Y., Lee, S., Lee, H., Oh, H. M., et al. (2009). Molecular characterization of bacteriophages for microbial source tracking in Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7107–7114. doi:10.1128/AEM.00464-09.
- Lee, H. S., & Sobsey, M. D. (2011). Survival of prototype strains of somatic coliphage families in environmental waters and when exposed to UV low-pressure monochromatic radiation or heat. *Water Research*, 45(12), 3723–3734. doi:10.1016/j.watres.2011.04.024.
- Leroy, M., Prigent, M., Dutertre, M., Confalonieri, F., & Dubow, M. (2008). Bacteriophage morphotype and genome diversity in Seine River sediment. *Freshwater Biology*, 53(6), 1176–1185. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.01985.x.
- Liew, P. F., & Gerba, C. P. (1980). Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(2), 305–308.
- Long, S. C., & Sobsey, M. D. (2004). A comparison of the survival of F+ RNA and F+ DNA coliphages in lake water microcosms. *Journal of Water and Health*, 2(1), 15–22.
- Lucena, F., Méndez, X., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Guerrero, A., et al. (2003). Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(5), 1748–1752. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x.
- Mocé-Llivina, L., Lucena, F., Jofre, J., Mocé-Llivina, L., Lucena, F., & Jofre, J. (2005). Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6838–6844. doi:10.1128/AEM.71.11.6838-6844.2005.
- Muniesa, M., Payan, A., Mocé-Llivina, L., Blanch, A. R., & Jofre, J. (2009). Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Research*, 43(6), 1559–1564. doi:10.1016/j.watres.2008.12.038.
- Ogorzal, 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24), 8019–8025. doi:10.1128/AEM.00917-10.
- Ogorzal, L., & Gantzer, C. (2006). Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods*, 138(1–2), 131–139. doi:10.1016/j.jviromet.2006.08.004.
- Ogorzal, 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.
- Rodrigues, M. T., Henzel, A. A., Staggemeier, R., de Quevedo, D. M., Rigotto, C., Heinzelmänn, L., et al. (2015). Human adenovirus spread, rainfalls, and the occurrence of gastroenteritis cases in a Brazilian basin. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(11), 720. doi:10.1007/s10661-015-4917-4.
- Schaper, M., Durán, A. E., Jofre, J., Durán, A. E., & Jofre, J. (2002). Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3702–3707. doi:10.1128/AEM.68.8.3702-3707.2002.
- Skraber, S., Gantzer, C., Maul, A., & Schwartzbrod, L. (2002). Fates of bacteriophages and bacterial indicators in the Moselle river (France). *Water Research*, 36(14), 3629–3637. doi:10.1016/S0043-1354(02)00063-5.
- Skraber, S., Schijven, J., Italiaander, R., & Roda Husman, A. M. (2009). Accumulation of enteric bacteriophage in fresh water sediments. *Journal of Water and Health*, 7(3), 372–379. doi:10.2166/wh.2009.098.
- Smith, E. M., Gerba, C. P., & Melnick, J. L. (1978). Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(4), 685–689.
- Williamson, K. E., Harris, J. V., Green, J. C., Rahman, F., & Chambers, R. M. (2014). Stormwater runoff drives viral community composition changes in inland freshwaters. *Frontiers in microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2014.00105.
- Wommack, K. E., Hill, R. T., Muller, T. A., & Colwell, R. R. (1996). Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1336–1341.
- Yang, Y., & Griffiths, M. W. (2013). Comparative persistence of subgroups of F-specific RNA phages in river water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4564–4567. doi:10.1128/AEM.00612-13.

En résumé, ces résultats nous ont permis de réaliser une étude précise de la propagation in situ des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'Alzette dans des conditions hydro-climatologiques stables. Les suivis des bactériophages infectieux et totaux le long de la section étudiée ont permis de caractériser la principale voie de dissémination empruntée par les particules virales. De plus, l'utilisation du temps de résidence de la masse d'eau a permis, pour la première fois, de donner des indications réelles de la survie in situ, en temps et en distance, des bactériophages infectieux dans une rivière. Ces résultats, ainsi que la méthode utilisée pour les obtenir, peuvent s'avérer très utiles pour estimer la qualité microbiologique de l'eau et évaluer les risques pour la santé humaine. Dans la continuité de cette étude, il est à présent intéressant d'examiner le comportement in situ des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'Alzette dans des conditions hydro-climatologiques instables. La perturbation du système hydrique suite à de fortes intempéries aura-t-elle un impact sur la dynamique des bactériophages dans la rivière ?

*Chapitre 4 : Influence des événements
hydro-climatologiques sur la dynamique
des bactériophages ARN F-spécifiques
dans la rivière Alzette*

Les événements pluvieux, de plus en plus fréquents suite aux changements climatiques récents, ont un impact direct sur la qualité de l'eau et par conséquent sur la santé humaine (Hofstra, 2011). En effet, beaucoup d'études mettent en évidence un lien temporel entre les crues et les épidémies d'origine hydrique (Bruggink and Marshall, 2010; Nichols et al., 2009). Lors de fortes intempéries, une augmentation de la charge microbienne dans les eaux de surface a été observée (Kistemann et al., 2002; Sidhu et al., 2012). Diverses origines peuvent expliquer cet apport tels la saturation des réseaux d'égouts unitaires et des stations d'épurations (Rodríguez et al., 2012) ou le lessivage des surfaces agricoles (fumier, champs d'élevage) (Crowther et al., 2002). La remise en suspension du sédiment est également suspectée dans l'apport de microorganismes (Mwanamoki et al., 2014). Pour mieux comprendre l'influence des événements pluvieux sur l'augmentation de la charge microbienne dans les eaux de surface, de nombreuses études ont étudiées la dynamique des bactéries pendant des crues (McDonald and Kay, 1981; Staley et al., 2012; Tiefenthaler et al., 2011). Néanmoins, peu d'études ont examinées l'impact des fortes intempéries sur la charge virale. Une augmentation du génome de virus entériques, tels que les adénovirus humains et les norovirus, a été observée (Ngaosuwanikul et al., 2013; Phanuwat et al., 2006) mais, à notre connaissance, aucune étude n'avait encore intégrée le suivi temporel du caractère infectieux des virus lors de crues.

L'objectif principal de cette étude est donc d'analyser la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux (génome) dans les eaux de surface de l'Alzette lors d'événements pluvieux. Trois aspects ont été étudiés : (i) la variation temporelle du flux de bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière au cours d'un événement pluvieux, (ii) les diverses origines responsables de l'apport de la pollution phagique et (iii) les nouvelles données pour l'évaluation des risques en santé humaine.

Afin de répondre à ces objectifs, deux crues ont été analysées : la première en juillet 2014 et la seconde en novembre 2014. Un litre d'eau de surface a été collecté toutes les heures pendant la durée entière des deux crues en amont et en aval de la station d'épuration d'Hespérange par l'intermédiaire d'échantillonneurs automatiques. Une originalité de cette étude est l'analyse des données en bactériophages ARN F-spécifiques en flux (UFP ou cg/sec) et non en concentration (UFP ou cg/100 mL), ce qui permet d'intégrer les variations de débit d'eau responsables de la dilution des concentrations virales. L'ensemble des résultats obtenus est présenté sous forme d'un article scientifique publié dans le journal *Water Research*.

Dans l'article ci-joint, seuls les résultats obtenus en amont de la station d'épuration d'Hespérange ont été présentés. En effet, la station d'épuration d'Hespérange contribue, dans une certaine mesure, à l'apport de bactériophages ARN F-spécifiques pendant la crue d'été (test de Wilcoxon, $p < 0,001$) mais pas significativement pendant la crue d'automne (test de Wilcoxon, $p = 1,0$) en raison de l'importante augmentation du débit dans la rivière. Peu de différences sont observables entre les échantillons collectés en amont ou en aval de la station d'épuration (Figure 33). Néanmoins, afin de présenter la globalité des résultats obtenus au cours de cette étude, les points forts de l'article seront exposés cette fois-ci à l'aide des résultats obtenus en aval de la station d'épuration.

La première étape du travail a été d'étudier l'impact de deux événements de crue sur la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux. Des augmentations de flux de 2,7 et 2,0 $\log_{10}$ en phages infectieux ont respectivement été observées lors des crues estivale et automnale (Figure 33).

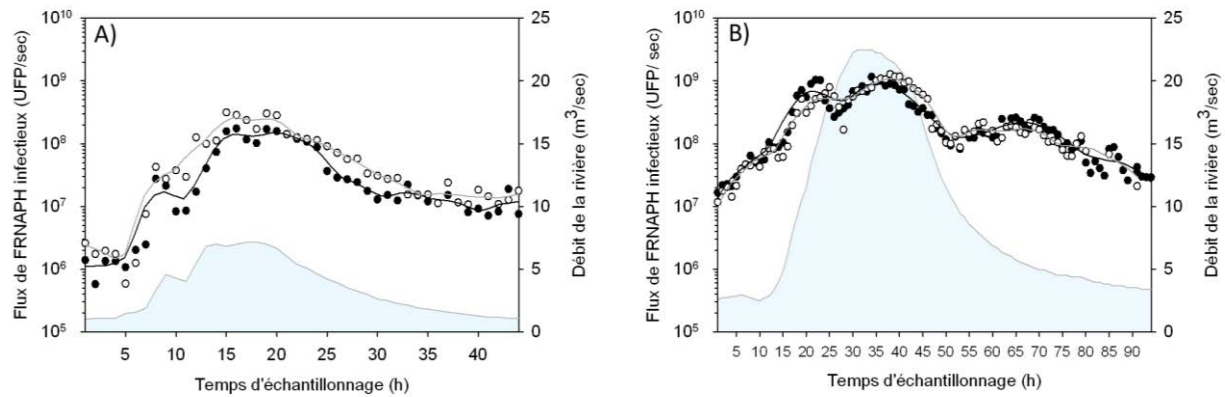


Figure 33 Flux des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux en amont (●) et en aval (○) de la station d'épuration d'Hespérange durant deux événements de crue (A) en été et (B) en automne.

En hydrologie, l'origine et le transport des particules en suspension dans l'eau de surface, lors des événements de crue, sont caractérisés par l'analyse des hystérèses obtenues suite à la mise en relation de la turbidité (ou matière en suspension) et du débit de la rivière (Williams, 1989). Les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux étant considérés comme colloïdes dans le milieu hydrique, cette même approche a donc été appliquée pour comprendre l'origine de l'augmentation de la charge virale dans la rivière (Figure 34). De cette analyse, deux vagues de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux ont été mis en évidence. Une première augmentation du flux de phages a été observée respectivement à 8 h et 20 h pour la crue estivale et automnale ; puis une deuxième augmentation a été constatée à 16 h et 35 h, respectivement. Selon l'analyse hydrologique des hystérèses, la première augmentation du flux de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux serait issue de la remise en suspension du sédiment accumulé au fond du lit de la rivière, tandis que la deuxième vague serait principalement due au lessivage des surfaces et/ou à la saturation des stations d'épurations.

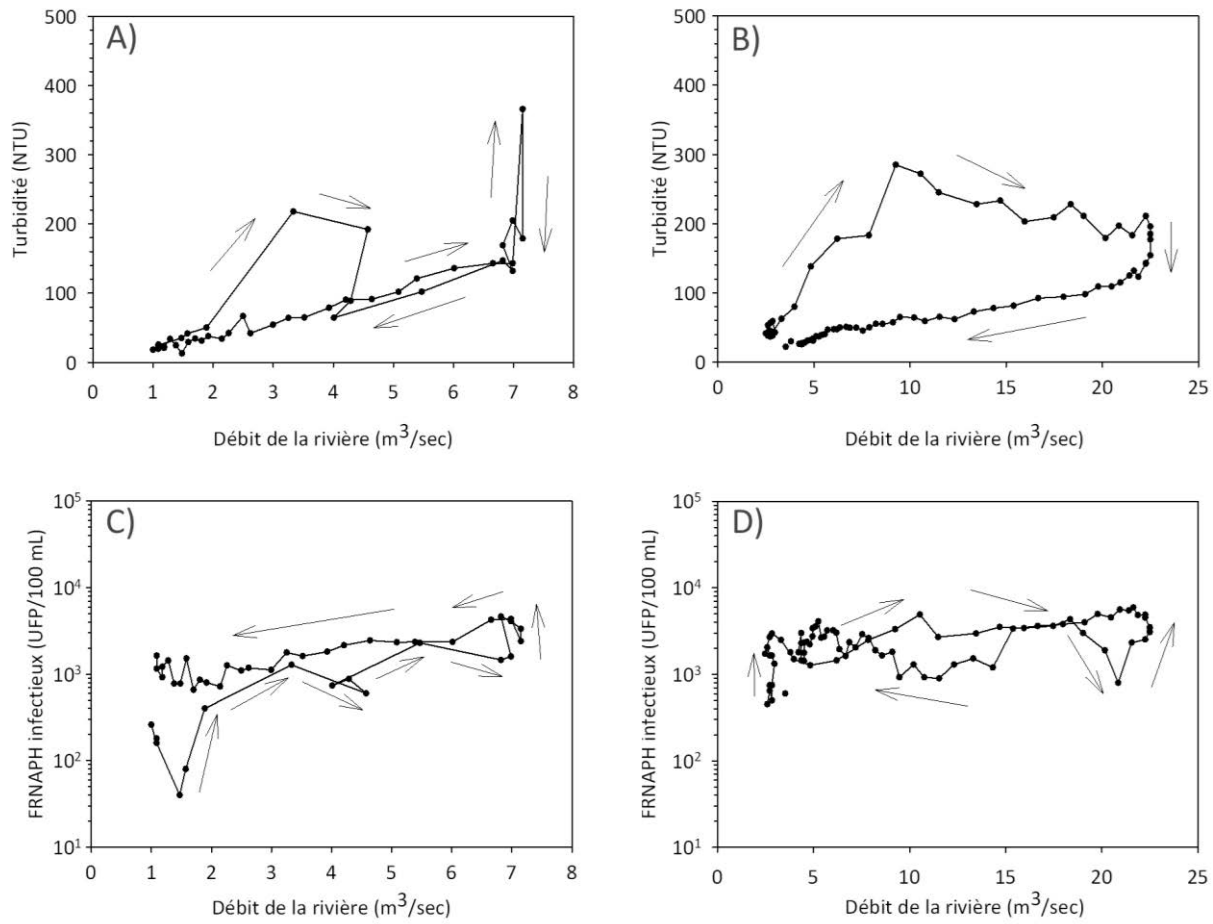


Figure 34 Hystérèses obtenues suite à la mise en relation de la turbidité (A,B) ou des bactériophages ARN F-spécifiques (C,D) avec le débit de la rivière en aval de la station d'épuration d'Hespérange durant la crue d'été (A,C) et d'automne (B,D).

La seconde étape du travail s'est intéressée à la distribution des génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques. L'analyse du ratio des phages appartenant au génogroupe II par rapport à ceux appartenant au génogroupe I a permis de caractériser l'origine de la pollution fécale. Un décalage entre l'augmentation du flux du génogroupe I et celui du génogroupe II a été mis en évidence dans la publication. L'augmentation du génogroupe II en parallèle de la turbidité concorde avec l'hypothèse d'une première vague de pollution virale suite à la remise en suspension du sédiment (confirmer par la présence de génogroupe II dans le sédiment, cf chapitre 5). L'augmentation plus tardive du génogroupe I coïncide avec l'arrivée de la deuxième vague de pollution virale potentiellement due au débordement des stations d'épurations et/ou au lessivage des surfaces. La présence de bactériophages appartenant au génogroupe I dans les fèces animaux tel le bétail ou les animaux domestiques appuie cette hypothèse (Schaper et al., 2002b). La même analyse peut être faite pour les résultats obtenus en aval de la station d'épuration à l'exception de la remise en suspension du génogroupe II lors de la crue d'été (Figure 35). Cette absence d'augmentation du ratio génogroupe II par rapport au génogroupe I peut être due aux fortes pluies antécédentes (20,8 mm dans les 10 jours précédents la crue) qui auraient provoqué une première remise en suspension du sédiment et donc des bactériophages du génogroupe II avant la crue.

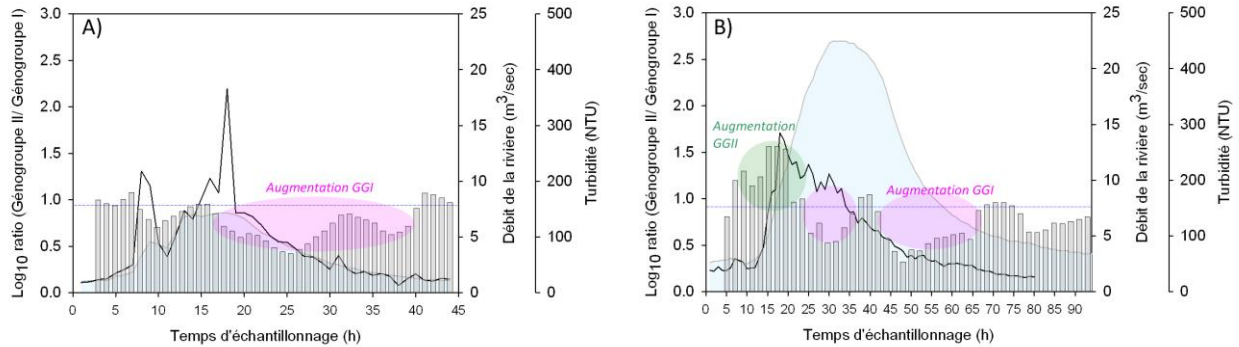


Figure 35 Histogramme présentant les variations de ratio des bactériophages ARN F-spécifiques totaux du génogroupe II par rapport à ceux du génogroupe I durant deux événements de crue en été (A) et en automne (B) en aval de la station d'épuration d'Hespérage. La turbidité (trait plein noir) est également indiquée. Le ratio génogroupe II par rapport au génogroupe I avant l'événement de crue est tracé en pointillés bleus tandis que les bulles de couleurs renseignent sur les augmentations successives de génogroupe I et génogroupe II.

Enfin, dans une dernière partie, l'apport de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux pendant les événements de crue a été évalué. Les bactériophages totaux appartenant au génogroupe II sont les plus abondants et représentent la majorité des phages infectieux et inactivés (ou ARN libres) présents dans la zone d'étude. L'analyse du ratio de ces bactériophages totaux par rapport aux bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a permis de déterminer l'apport des phages non-infectieux par rapport aux infectieux (Figure 36). Une importante contribution des bactériophages infectieux a été observée au moment du pic de crue mais aussi après l'épisode de crue. Malgré la remise à niveau du débit de la rivière post-crue, le flux en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux est resté élevé. Ces résultats apportent de nouvelles informations pour l'évaluation des risques pour la santé humaine lors des événements de crue.

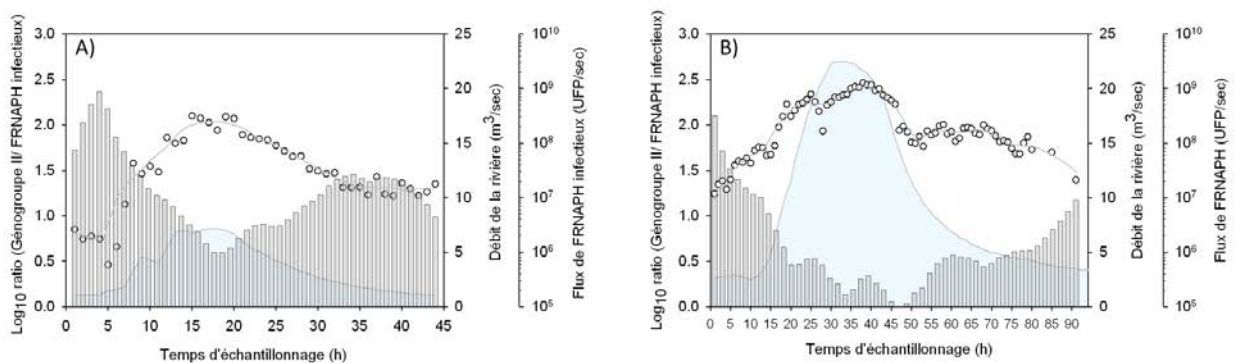


Figure 36 Histogramme présentant les variations de ratio des bactériophages ARN F-spécifiques totaux appartenant au génogroupe II par rapport aux phages infectieux durant deux événements de crue en été (A) et en automne (B) en aval de la station d'épuration d'Hespérage. Le flux des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux (○) en aval de la station est également indiqué.



Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Contribution of hydrological data to the understanding of the spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events

Blandine Fauvel^{a, b, c}, Henry-Michel Cauchie^a, Christophe Gantzer^{b, c}, Leslie Ogorzaly^{a, *}

^a Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Department of Environmental Research and Innovation (ERIN), 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

^b Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie, Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy F-54000, France

^c CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy F-54000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2015

Received in revised form

16 February 2016

Accepted 28 February 2016

Available online 3 March 2016

Keywords:

F-specific RNA bacteriophages

Rainfall-runoff event

Sediment resuspension

Microbial source tracking

ABSTRACT

Heavy rainfall events were previously reported to bring large amounts of microorganisms in surface water, including viruses. However, little information is available on the origin and transport of viral particles in water during such rain events. In this study, an integrative approach combining microbiological and hydrological measurements was investigated to appreciate the dynamics and origins of F-specific RNA bacteriophage fluxes during two distinct rainfall-runoff events. A high frequency sampling (automatic sampler) was set up to monitor the F-specific RNA bacteriophages fluxes at a fine temporal scale during the whole course of the rainfall-runoff events. A total of 276 rainfall-runoff samples were collected and analysed using both infectivity and RT-qPCR assays. The results highlight an increase of 2.5 log₁₀ and 1.8 log₁₀ of infectious F-specific RNA bacteriophage fluxes in parallel of an increase of the water flow levels for both events. Faecal pollution was characterised as being mainly from anthropic origin with a significant flux of phage particles belonging to the genogroup II. At the temporal scale, two successive distinct waves of phage pollution were established and identified through the hydrological measurements. The first arrival of phages in the water column was likely to be linked to the resuspension of riverbed sediments that was responsible for a high input of genogroup II. Surface runoff contributed further to the second input of phages, and more particularly of genogroup I. In addition, an important contribution of infectious phage particles has been highlighted. These findings imply the existence of a close relationship between the risk for human health and the viral contamination of flood water.

© 2016 Luxembourg institute of Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Surface waters can be contaminated by many pathogens (bacteria, viruses and protozoa) responsible for gastrointestinal diseases (Bosch, 2007; Ramírez-Castillo et al., 2015). The presence of enteric pathogens in surface water is due to faecal contamination, which can come from various sources. The discharge of inadequately treated wastewater is the most common source of pathogens in aquatic environments (Dungeni et al., 2010; Teklehaimanot et al., 2015). Others inputs of faecal pollution appear, particularly during heavy rainfall events. The direct discharge of overflow of

wastewater treatment plants in surface water (Rodríguez et al., 2012a), failure of septic tanks in rural areas (Panasiuk et al., 2015), washing out of faecal deposits from domestic or wild animals, breeding activities and agricultural use of manure (Crowther et al., 2002; Doran and Linn, 1979) are possible significant sources of faecal contamination during rainfall-runoff events. Throughout these particular hydrological events, resuspension of riverbed sediment is also suspected to release microorganisms in the water column (Mwanamoki et al., 2014).

With potential climate change and the increase of extreme rainfall events, water quality and its impact on human health are today important issues (Carlton et al., 2014; Hofstra, 2011; Hunter, 2003). Implication of specific microbial pathogens in waterborne disease outbreaks was demonstrated in a comprehensive review compiling 93 studies. The analysis of this data showed that bacteria

* Corresponding author.

E-mail address: leslie.ogorzaly@list.lu (L. Ogorzaly).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.057>

0043-1354/© 2016 Luxembourg institute of Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

were the most commonly found causative pathogens (89.1%) in comparison with viruses (25.7%), or protozoa (21.6%) (Cann et al., 2012). In the same way, the correlation between hydrological parameters and outbreak occurrences were demonstrated in some other works (Curriero et al., 2001; Nichols et al., 2009). For instance, a relationship between occurrence of gastroenteritis outbreak associated with norovirus (1018 viral gastroenteritis for the period 2002–2007) and rainfall was confirmed through statistical procedures in an Australian study (Bruggink and Marshall, 2010).

Numerous data in the literature highlighted the increase of faecal bacteria concentration in surface water during rainfall events and explored its probable origins (McDonald and Kay, 1981; Sidhu et al., 2012; Staley et al., 2012; Tiefenthaler et al., 2011). The flushing of old bacteria stores in river sediment at the onset of the flood followed by the arrival of the overflow of combined sewer systems in river water were two probable origins (Chu et al., 2011). In order to determine the origins of this higher bacteria concentration in water, the relationship between bacteria and total suspended solids (TSS) was often investigated (Chen and Chang, 2014; McCarthy et al., 2012). The measurement of the TSS concentration in water is commonly used as a proxy to assess the water quality and wet-weather pollution (Rossi et al., 2005). The spatial distribution of catchment sediment sources was also explored using a hysteresis approach to study the relationship between concentration of suspended solids (measured by TSS or turbidity) and water discharge (Williams, 1989). This information tends to give insights into the origins and transport of sediment. A positive correlation between faecal indicator bacteria and suspended material could result from the resuspension of streambed sediment or erosion of soils transported to the stream (Tiefenthaler et al., 2011). The interaction between sediment and water column compartments was recently taken into account to develop a new modelling approach to predict bacterial concentrations in rivers (Ghimire and Deng, 2013).

In comparison with data available on faecal bacteria, few studies investigated the impact of rainfall events on the viral load in surface water. Even though it has been largely documented that viral particles have a different behaviour or survival compared to bacteria (Keswick et al., 1984; Nasser et al., 1993). A higher genome contamination of enteric pathogen viruses, such as human adenovirus, norovirus or enterovirus, were observed during floods using molecular tools (Corsi et al., 2014; Ngaosuwanikul et al., 2013; Phanuwat et al., 2006). Nevertheless, no information on their infectivity was available, precluding the assessment of a potential risk of enteric viral infections. Indeed viral genome has a higher persistence compared to infectivity (Gassilloud et al., 2003; Ogorzalay et al., 2010). Hata et al. (2014) drew attention to the reliability of molecular detection steps that can be affected by the complexity of water components during rainfall events. Appropriate indicators of pathogenic viruses, such as F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH), detected and quantified by both molecular and infectious tools, were significantly more concentrated during storm events than in baseflow conditions (Cole et al., 2003). FRNAPH are ubiquitous in aquatic environments worldwide, with average concentrations ranging from 1 to 5 log₁₀ plaque-forming units (PFU)/ml in raw sewage (Contreras-Coll et al., 2002; Lucena et al., 2003; Ogorzalay and Gantzer, 2006) and 1 to 3 log₁₀ PFU/ml in river water (Haramoto et al., 2009; Lucena et al., 2003; Ogorzalay et al., 2009). FRNAPH belong to the *Leviviridae* family and are divided into two genus *Levivirus* and *Allolevivirus*. Each genus is divided into two genogroups (genogroups I and II for *Levivirus* and genogroups III and IV for *Allolevivirus*). According to numerous studies performed so far, FRNAPH of genogroups II and III are generally linked with a human associated-contamination, whereas those of genogroups I and IV are mainly derived from animal associated-contamination (Haramoto et al., 2009; Lee et al., 2011, 2009). They may be included as candidates for tracking the origin of

faecal pollution. However, this distribution of phage genogroups is not absolute with detection of genogroup I in urban wastewater (Haramoto et al., 2015; Hartard et al., 2015). Furthermore, infectious units from genogroups I and II are described as more resistant in environment than ones from genogroups III and IV, which can potentially biased the original genogroup distribution (Muniesa et al., 2009). These phages and most of the human enteric viruses share similar physical characteristics such as the size, nature of genome and the shape. They are thus proposed as models to predict the presence of pathogenic viruses in surface water (Havelaar et al., 1993; Jofre, 2007). In addition, their ease of detection and their higher presence in surface water compared to enteric viruses allow the performance of a fine-scale analysis of viral pollution in the environment.

The work reported here aims to provide original information on occurrence and transport of FRNAPH during a rainfall-runoff event by exploring the relationship between phage dynamics and hydrological parameters. Specifically, the main objectives are (i) to parameterise the hydrographs in order to analyse the level and the dynamics of phage fluxes during rainfall-runoff events (rising and falling limbs), (ii) to investigate the possible origins of phage pollution wave arrivals in an aquatic environment and (iii) to give new data for risk assessment by detection of infectious phage particles during rainfall-runoff events.

For this study, surface water was sampled from the Alzette River, located in the south of Luxembourg, downstream and upstream from a wastewater treatment plant. The effect of rainfall on water quality was estimated by infectious FRNAPH enumeration and molecular biology tools.

2. Materials and methods

2.1. Study area

The study was conducted on the Alzette River, one of the main rivers in Luxembourg. The Alzette River runs from Thil (France) for 73 km before joining into the Sauer River at Ettelbrück (Luxembourg). The watershed of the Alzette River covers 1174 km² of which 286 km² drain into the study area (Fig. 1). The land use in this sub-catchment includes 21.1% of urban areas, 48.2% of agricultural areas and 30.7% of forest and semi-natural areas (data from program EU-CORINE Land Cover, 2006).

The sampling area was close to the city of Hesperange, with about 14,000 inhabitants and located 6 km upstream from Luxembourg City. Three wastewater treatment plants (WWTP) were located upstream from the sampling area with respective capacities of 24,500, 90,000, and 95,000 inhabitant-equivalents. In addition, a fourth WWTP was present directly in the sampling area (Hesperange WWTP). Sampling sites were thus considered under anthropic influence.

The WWTP of Hesperange was renovated in 2006 and converted into a nitrifying activated sludge plant with moving bed biofilm reactor technology. Its maximum capacity is 26,000 inhabitant-equivalents. An average of $2.3 \pm 1.0 \times 10^4$ (mean $\pm$ standard deviation) most probable number/100 mL ($n = 6$) of *Escherichia coli* and $4.4 \pm 4.0 \times 10^3$ PFU/100 mL ($n = 6$) of infectious FRNAPH were estimated in the Hesperange WWTP effluents. An efficiency of 91.3% was determined for FRNAPH. Three out of four genogroups were observed in effluents ($n = 4$): genogroup I ($3.0 \pm 2.3 \times 10^5$ genome copies (gc)/100 mL), genogroup II ($3.1 \pm 1.7 \times 10^5$ gc/100 mL) and genogroup III ($2.2 \pm 0.9 \times 10^4$ gc/100 mL).

2.2. Stream water sampling and processing

Stream water samples were collected upstream and downstream from the Hesperange WWTP using automatic samplers



Fig. 1. Main drainage network of Luxembourg. The Alzette River watershed (in green), including the studied sub-catchment (striped area). Sampling locations were upstream and downstream the Hesperange WWTP.

(ISCO). One-litre samples were collected every hour during the course of the studied periods. Samples were transported back to the laboratory in a refrigerated compartment every 24 h for analysis.

Samplings were carried out during two contrasting hydrologic conditions: during low flow (96 samples) and during rainfall-runoff events (276 samples). Two automatic sampling campaigns were performed over 24 h when the water was at its lowest level. For the first campaign, the water discharge was of 2.33 m³/sec (10th–11th February 2015) and for the second, the water discharge was of 0.63 m³/sec (8th–9th July 2015). In the same way, two rainfall events were analysed: the first occurred in summer and lasted for 44 h (29th–31st July 2014) and the second occurred in autumn and lasted 94 h (3rd–7th November 2014). A rainfall-runoff event was

defined as a significant increase of water discharge in the stream compared to low flow (minimum eight times higher than the low flow). The length of the event was calculated from the increased flow departure until return of the normal low flow.

2.3. Meteorological, hydrological and physico-chemical data

Daily rainfall data of the closest meteorological station (6 km from the studied site) were provided by the “Administration des Services Techniques de l’Agriculture” (ASTA, <http://www.agrimeteo.lu>). The water discharge (m³/sec) of the Alzette River was estimated using the rating curve and the water level data provided by the “Administration de la Gestion de l’Eau”. Turbidity

of each water sample was measured in nephelometric units (NTU) with a portable turbidimeter (HACH 2100Q).

2.4. Detection of infectious F-specific RNA bacteriophages

The concentration of infectious FRNAPH was determined using *Salmonella enteric typhimurium* strain WG49 and the double-agar-layer technique in accordance with the ISO standard 10705-1:2001. Nalidixic acid was added to media to limit the growth of abundant bacterial flora. Negative and positive controls were included in the determination of infectious FRNAPH. Plates were incubated overnight at 37 °C before counting PFU. FRNAPH were enumerated in 5×1 mL of surface water for each sample and their concentrations were expressed in PFU per 100 mL.

2.5. Genogroup detection of F-specific RNA bacteriophages

Prior to the FRNAPH genogroup determination, a clarification of surface water was performed with a centrifugation at 3000 g for 10 min at 4 °C (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Then, an ultracentrifugation of 98 mL of supernatant at 235,000 g for 1 h 30 min at 4 °C (L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter OptimaTM) was performed to concentrate phage particles (Skraber et al., 2011). Each pellet was resuspended in 1 mL of the NucliSens lysis buffer (BioMerieux, France) and stored at –80 °C until the next steps of sample treatment.

The RNA extraction was performed using the NucliSens Magnetic Extraction kit (BioMerieux, France). The elution step was carried out in 100 µL of elution buffer and extracted nucleic acids were stored at –80 °C. Genogroup detection and quantification were performed by the quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR) method developed by Ogorzaly and Gantzer (2006) on ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, France). Two modifications were brought to this method with the use of TaqMan® Environmental MasterMix 2.0 (Applied Biosystems®) in a final volume of 25 µL.

RNA genomic concentration of each genogroup (gc/100 mL) was determined thanks to standard curves. The target genomic sequences of MS2 (NC001417), GA (NC001426), MX1 (AF059242) and SP (X07489), belonging to genogroups I, II, III and IV respectively, were inserted into four plasmids (pEX-A, Eurofins Genomics). Plasmids were transcribed in RNA (RiboProbe® *in vitro* Transcription Systems, Promega) in order to take into account reverse transcription and real-time PCR in the obtaining of standard curves. A detection limit of 10 genome copies per RT-qPCR reaction was determined for the four genogroups.

Negative extraction control and negative and positive RT-qPCR controls were incorporated for each FRNAPH genogroup detection. RT-qPCR inhibition was evaluated on 202 samples of 372 total samples by spiking a known amount of GA plasmids into extracted samples. The quantity of GA plasmid measured in water sample was then compared to the quantity initially introduced.

2.6. Calculation of fluxes of viruses

Each concentration of FRNAPH (PFU or gc/100 mL) detected in the Alzette River was converted into flux (PFU or gc/sec) by taking into account the flow of the river (m³/sec). FRNAPH fluxes were calculated using the following equation: $F = C \times Q \times 10,000$, where F is the flux expressed in PFU or gc/sec; C is the FRNAPH concentration expressed in PFU or gc/100 mL and Q corresponds to water discharge in the stream expressed in m³/sec.

2.7. Hydrologic variables

The stream flow response of the studied sub-watershed during

rainfall events was characterised by the hydrograph. Runoff coefficient (in %) related event runoff to total rainfall, both expressed as a height over catchment area (mm). The rising and falling limbs corresponded respectively to the increase and decrease of water discharge during the event. The discharge peak was the highest point in the hydrograph and it separated the rising and falling phases. On the contrary, the low flow of the river represented the stream discharge during dry conditions. In this study, this terminology was applied to the dynamics of FRNAPH in response of a rainfall-runoff event. The rising and falling phases were defined as the increase and decrease of FRNAPH fluxes during the event. The major peak of FRNAPH, separating the rising and falling limbs, was defined as the first higher infectious FRNAPH flux during the rainfall event.

2.8. Loess analysis

A smoothing algorithm was performed on viral data of rainfall-runoff events in order to reduce the skewness of their distribution. LOESS (Local RegrESSion) algorithm was performed by the Sigma-Plot 12.5 software. A smoothing parameter corresponding to a 0.15 sampling proportion was used. Local regressions, resulting from the LOESS algorithm, were used to perform ratio of genogroup II genome on infectious FRNAPH and ratio of genogroup II on genogroup I. Calculations of ratio was performed to give an idea of the relative distribution of infectious FRNAPH and each genogroup in the river water during rainfall-runoff events.

3. Results

3.1. Situation of the monitored area

The studied area was analysed twice during a 24-h period when the water level of the river was at its lowest (Fig 2). During these periods, the river had an average flow of 0.7 m³/sec and 2.7 m³/sec depending on the season. Turbidity was stable whatever the season with values around 10.8 ± 2.1 NTU. Ranges of variation of $1.5 \log_{10}$ of infectious FRNAPH fluxes (from 6.0 to 7.5 $\log_{10}$ PFU/sec) and 0.7 $\log_{10}$ (from 7.3 to 8.0 $\log_{10}$ PFU/sec) were observed upstream of the WWTP during the low flow period of summer and winter, respectively. The same results were observed for infectious FRNAPH concentrations, with variations of $1.5 \log_{10}$ ($7.8 \pm 9.9 \times 10^2$ PFU/100 mL) and 0.7 $\log_{10}$ ($1.6 \pm 0.6 \times 10^3$ PFU/100 mL). These daily fluctuations can come from non-regular outputs of all WWTP upstream from the studied area. It is of note that the analysis of water samples collected upstream and downstream from the WWTP showed that the contribution of the Hesperange WWTP mainly took place in summer when the flow of the river was at its lowest. Indeed, in contrast to the winter period during which infectious FRNAPH fluxes were similar upstream ($4.4 \pm 1.8 \times 10^7$ PFU/sec) and downstream ($4.8 \pm 2.4 \times 10^7$ PFU/sec) from the WWTP (Wilcoxon signed rank test, $p = 0.808$), fluxes of infectious FRNAPH were higher downstream ($1.2 \pm 0.9 \times 10^7$ PFU/sec) than upstream from the WWTP ($5.4 \pm 7.0 \times 10^6$ PFU/sec) during summer low flow period (Wilcoxon signed rank test, $p < 0.001$). Fluxes of FRNAPH genogroups were also determined. Genogroup II was most abundant and detected during both low flow periods (Table 1). Similarly to infectious FRNAPH fluxes, a daily variability of FRNAPH II fluxes occurred ($1.1 \log_{10}$ and $0.9 \log_{10}$ during the low flow period of summer and winter respectively). Other genogroups have not been systematically detected (some points under the detection limit). Genogroup I was detected more than genogroup III while genogroup IV was not found in the river. RT-qPCR inhibition was evaluated for 91 of the 96 low flow samples collected. No sample was inhibited at more than 50%.

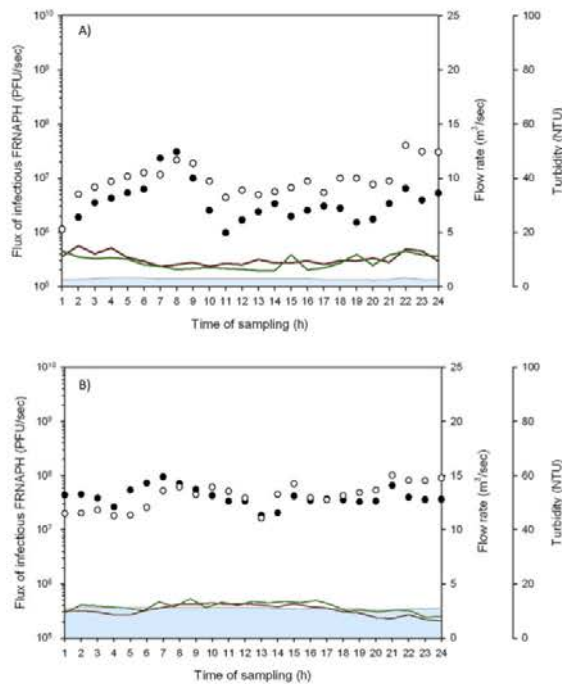


Fig. 2. Hydrological parameters and infectious FRNAPH fluxes during summer (A) and winter (B) low flow. Flow rate in blue area; turbidity upstream and downstream WWTP in red and green lines respectively; ● infectious FRNAPH upstream WWTP; ○ infectious FRNAPH downstream WWTP. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.2. Rainfall-runoff events characterisation

The main parameters for hydrograph description of rainfall-runoff events are reported in Table 2. The autumn event showed

a much higher water discharge at the peak of the hydrograph (22.5 m³/sec) than that of the summer event (7.1 m³/sec). In the same way, the flow rate prior to the autumn event (2.6 m³/sec) was much higher than the flow rate prior to the summer one (0.5 m³/sec). In addition to flow rate, the autumn event lasted twice as long as the summer event with a time of hydrograph duration of 82 h versus 39 h. Despite all these differences, the duration of rising and falling limbs lasted the same proportion of time. During the summer event, the runoff coefficient was lower (7%) than during the autumn event (34%). This means that the proportion of total rainfall that becomes runoff during the event was higher in autumn than in summer, most probably due to wetter antecedent conditions and subsequent higher soil saturation. All of these differences between the two studied rainfall events can be explained by the water catchment storage conditions, which differ depending on weather conditions associated with seasons. Observed precipitation patterns were also different in both seasons despite that cumulative rainfall was similar (28.5 and 32.9 mm for the summer and autumn events, respectively). In summer, discontinuous precipitation appeared with one important brief rainfall pulse cumulating in 20 mm in one hour. In autumn, considerable and continuous precipitation occurred during more than 10 h with a maximum of 4 mm per hour (Fig. 3A and C).

For each sampling data, turbidity profiles were similar at the upstream and downstream Hesperange WWTP sites. An increase occurred during the rising limb (from 12.6 to 366 NTU and from 34.4 to 306 NTU, for the summer and autumn events, respectively). Most variations appeared for the summer event with three distinct turbidity peaks. Local rainfall pulses and intense thunderstorms in summer might explain the two distinct water discharge peaks and the repercussion on turbidity.

3.3. FRNAPH detection during rainfall-runoff events

3.3.1. WWTP contribution

The contribution of the Hesperange WWTP in terms of discharge volume was very small compared to stream water discharge coming from upstream (Table 2). Concerning the input of infectious FRNAPH in the river (Fig. 3B and D), the WWTP

Table 1
Detection rate, concentrations and fluxes of FRNAPH genogroups in water samples.

		Detection rate (%)	FRNAPH concentration Min (PFU or gc ^a /100 mL)	FRNAPH concentration Max (PFU or gc ^a /100 mL)	FRNAPH flux Min (PFU or gc ^a /sec)	FRNAPH flux Max (PFU or gc ^a /sec)	Log ₁₀ difference in flux
Summer low flow (n = 24)	Infectious FRNAPH	100	1.4×10^2	4.4×10^3	9.8×10^5	3.1×10^7	1.5
	Genogroup I	79.1	9.9×10^2	3.7×10^3	6.5×10^6	2.2×10^7	0.5
	Genogroup II	100	2.0×10^4	2.4×10^5	1.4×10^8	1.7×10^9	1.1
	Genogroup III	33.3	6.3×10^2	2.7×10^3	3.7×10^6	2.1×10^7	0.7
Winter low flow (n = 24)	Infectious FRNAPH	100	6.6×10^2	3.4×10^3	1.9×10^7	9.5×10^7	0.7
	Genogroup I	29.1	7.6×10^2	8.1×10^3	2.1×10^7	2.1×10^8	1
	Genogroup II	100	3.8×10^3	2.6×10^4	9.9×10^7	7.5×10^8	0.9
	Genogroup III	4.1	6.1×10^3	6.1×10^3	1.6×10^8	1.6×10^8	—
Summer event (n = 44)	Infectious FRNAPH	100	6.0×10^1	2.5×10^3	5.7×10^5	1.7×10^8	2.5
	Genogroup I	72.7	6.7×10^2	6.0×10^3	1.1×10^7	1.8×10^8	1.2
	Genogroup II	100	4.9×10^3	7.1×10^4	5.9×10^8	6.6×10^9	1.0
	Genogroup III	68.2	5.8×10^2	1.4×10^4	7.9×10^6	1.7×10^8	1.3
Autumn event (n = 51)	Infectious FRNAPH	100	6.7×10^2	7.2×10^3	1.7×10^7	1.2×10^8	1.8
	Genogroup I	54.9	4.0×10^2	4.9×10^3	1.9×10^7	7.5×10^8	1.2
	Genogroup II	96.1	6.3×10^2	4.7×10^4	1.2×10^8	4.5×10^9	1.6
	Genogroup III	39.2	3.2×10^2	6.4×10^3	5.1×10^8	3.1×10^9	0.7

^a Genome copies.

Table 2

Hydrological parameters of the summer and autumn rainfall-runoff events.

		Summer event (29th–31st July 2014)	Autumn event (3rd–7th November 2014)
River water	Pre-event flow rate (m ³ /sec)	0.5	2.6
	Flow rate at the peak of the hydrograph (m ³ /sec)	7.1	22.5
	Event duration (h)	39	82
	Rising limb duration (h)	12 (30.7%)	21 (25.6%)
	Falling limb duration (h)	27 (69.3%)	61 (74.4%)
	Total rainfall ^a (mm)	28.5	32.9
	Antecedent rainfall ^b (mm)	20.8	2.8
	Runoff coefficient (%)	7	34
	Effluent flow rate of WWTP (m ³ /sec)	0.09	0.11
Effluent WWTP	Flow rate of the overflow of WWTP in the stream (m ³ /sec)	0.03	0.13

^a On the total duration of the event.^b 10 days prior the event.

contributed only to a small extent during the summer rainfall event (Wilcoxon signed rank test, $p < 0.001$) and not significantly during the autumn event (Wilcoxon signed rank test, $p = 1.0$). The flow of the river was so important during the rainfall event that phage input coming from the WWTP effluent was negligible (dilution effect). For the sake of clarity, only upstream data was presented.

3.3.2. Detection of infectious FRNAPH

A total of 276 rainfall water samples were collected and analysed in the Alzette River during both summer and autumn events. All samples analysed were positive for infectious FRNAPH. An increase of $2.5 \log_{10}$ of infectious FRNAPH flux was measured for the summer event (from 5.7×10^5 to 1.7×10^8 PFU/sec) and $1.8 \log_{10}$ for the autumn event (from 1.7×10^7 to 1.2×10^9 PFU/sec). Similar results were observed for infectious FRNAPH concentrations, with increases of $1.6 \log_{10}$ (from 6.0×10^1 to 2.5×10^3 PFU/100 mL) and $1.0 \log_{10}$ (from 6.7×10^2 to 7.2×10^3 PFU/100 mL) for summer and autumn events, respectively. These increases of infectious FRNAPH were divided into two successive waves of infectious FRNAPH for both rainfall-runoff events. During the summer event, a first increase of infectious FRNAPH flux occurred 8 h after the beginning of the event and a second increase after 16 h of sampling time. These two waves also appeared after 20 and 35 h for the autumn event. Then, for both events, a slow decrease of infectious FRNAPH fluxes occurred during the falling phases, lasting three times longer than the rising phase. Flow rate of the Alzette river got back to its initial flow rate whereas fluxes of infectious FRNAPH always were superior to the pre-event ones (with $0.7 \log_{10}$ and $0.2 \log_{10}$ of differences between the beginning and the end of summer and autumn event, respectively).

3.3.3. Characterisation and quantification of FRNAPH genogroups

During rainfall-runoff events, genogroups I, II and III were detected (Table 1). Genogroup II was noted to be the most abundant in all stream water samples. Flux variations of genogroup II genome copies were from 5.9×10^8 to 6.6×10^9 gc/sec ($1.0 \log_{10}$) and from 1.2×10^8 to 4.5×10^9 gc/sec ($1.6 \log_{10}$) for the summer and autumn events, respectively (Table 1). Flux variations were also observed for genogroup I with $1.2 \log_{10}$ increase for both events and for genogroup III with $1.3 \log_{10}$ and $0.7 \log_{10}$ for the summer and autumn events. Inhibition of RT-qPCR was evaluated for 111 of the 276 rainfall-runoff samples collected. Thirty-one percent of samples were inhibited at more than 50% and only 1.8% at 90%.

For both events, an increase of genogroup II fluxes took place before the water discharge peak whereas a rise of genogroup I occurred at the same time as the peak of hydrograph (Fig. 4). The low detection rate of genogroup III during the autumn event (39.2%) did not allow us to establish dynamics. For the summer event, genogroup III increased at the same time than genogroup II,

before the water discharge peak. Decrease of genogroups occurred slowly during the falling phase of the hydrograph until a similar flux of the pre-event.

3.3.4. Input of infectious FRNAPH during rainfall-runoff events

A comparison between genogroup fluxes and infectious FRNAPH can be made to estimate the input of non-infectious versus infectious phages during the rainfall-runoff event. Genogroup II, the most abundant of genogroups detected in the water samples, was used to perform the comparison. During the summer event, an increase of $2.5 \log_{10}$ (Table 1) of infectious FRNAPH flux was observed compared to $1.1 \log_{10}$ of genogroup II genome. Ratios of genogroup II genome on infectious FRNAPH are presented in Fig. 5. The basal ratio was defined during the pre-event and had a value of about $2 \log_{10}$ and $1.5 \log_{10}$ for summer and autumn events, respectively. As concentration of genogroup II was higher than infectious FRNAPH, the ratio of genogroup II to infectious FRNAPH was positive. At the beginning of the rising phase, infectious FRNAPH and genogroup II genome increased in the same proportion, which did not induce a variation of the ratio. A decrease of the ratio (reduction of about $1 \log_{10}$ compared to the basic value) occurred during the water discharge peak due to an unbalance of fluxes in favour of infectious FRNAPH. An input of infectious phages of genogroup I can be responsible for this difference of ratio. At the end of events, the ratio remained lower than pre-events, particularly for the summer event ($0.8 \log_{10}$ of difference) meaning a higher rate of infectious FRNAPH in the stream compared to the initial situation.

3.4. Analysis of FRNAPH appearance pattern during rainfall-runoff events

3.4.1. Turbidity hysteresis patterns

From a hydrological point of view, a rainfall-runoff event was generally characterised using a hysteresis approach. The relationship between turbidity and water discharge was investigated in order to determine sources and transport of sediment during events. This link was established for both events (Fig. 6A and B). Each hysteresis plot displayed specific patterns. During the summer event, a double clockwise and a single-valued line pattern (Fig. 6A) were the result of the three turbidity peaks observed (Fig. 3A). The double clockwise corresponded to a successive increase and decrease of turbidity as a function of the increase of the flow rate. This chronology was consistent with the first two peaks of turbidity preceding the water discharge peak. The single-valued line pattern was associated with the third peak of turbidity, which was simultaneous with the peak of water discharge. During the autumn event, the turbidity peak also appeared before the peak of the hydrograph inducing a clockwise hysteresis pattern (Fig. 3C).

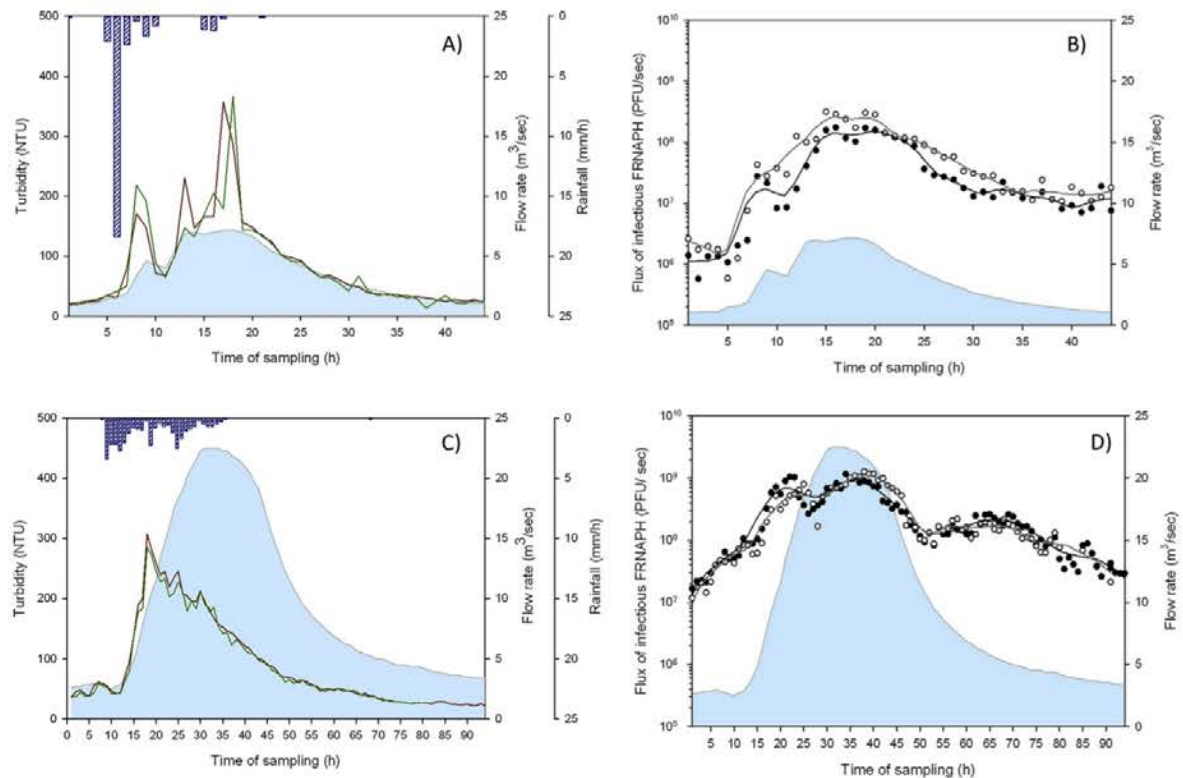


Fig. 3. Hydrological parameters and infectious FRNAPH fluxes during summer (A, B) and autumn (C, D) rainfall-runoff events. Flow rate in blue area; rainfall in bar chart, turbidity upstream and downstream WWTP in red and green lines respectively; ● infectious FRNAPH upstream WWTP; ○ infectious FRNAPH downstream WWTP; smoothed curves of infectious FRNAPH upstream and downstream WWTP in dark and grey lines respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4.2. Infectious FRNAPH hysteresis patterns

Since viral particles can be considered as colloid in aquatic environment, we suggested applying the hysteresis approach to F-specific RNA bacteriophages. This analysis allowed us to clarify the sources and transport of phage particles during event and to establish their link with other solids, such as suspended matter or sediment. The infectious FRNAPH concentrations and water discharge relationships were presented in Fig. 6C and D. For both events, a pattern close to a figure of eight appeared which was the result of the two waves of infectious FRNAPH. This profile was first a brief clockwise pattern and then an anti-clockwise pattern. This profile allowed us to describe the chronological arrival of the two distinct waves of infectious FRNAPH during both events (Fig. 3, Section 3.3.2). It is interesting to note the size difference of loops for both figure of eight patterns of the summer and autumn events. In the hysteresis plot of summer event, the first clockwise loop was smaller than the anti-clockwise loop. This observation was reversed for the hysteresis plot of autumn event. Dynamics of infectious FRNAPH as a function of the flow rate progressed in the same way in both events studied though in different response proportion (size of loops).

3.4.3. Distribution of FRNAPH genogroups

Assuming an equivalent efficiency of the four RT-qPCR assays, specific to each FRNAPH genogroup, it was possible to compare the distribution of different genogroups during rainfall-runoff events. The faecal pollution was characterised considering the ratio between

genogroup II (human-associated contamination) and genogroup I (mostly animal-associated contamination). Both of these genogroups were the most abundant in water samples. The variation of this ratio during rainfall-runoff events is presented in Fig. 7. The basal ratio was defined during the pre-event and had a value of about $1 \log_{10}$ for the both events. As genogroup II was more abundant than genogroup I, the ratio of genogroup II to genogroup I was almost always positive. An increase of the ratio occurred in parallel to the first peak of turbidity with a ratio genogroup II to genogroup I of $1.6 \log_{10}$ for both events. These increases were due to input of genogroup II and not a decrease of genogroup I (as described in Section 3.3.3). A second variation of the ratio genogroup II to genogroup I occurred in the second part of hydrographs with a decrease of the ratio inferior to the initial value. For the summer event, the ratio decreased right from the beginning of the hydrograph peak until the end of the falling phase with an average value of $0.8 \log_{10}$. For the autumn event, the low values of ratio occurred a few hours after the peak of the hydrograph with an inversion of the ratio ($-0.1 \log_{10}$). An important input of genogroup I explained this counterbalance. These observations showed different faecal pollution sources at different time of the rainfall-runoff events.

4. Discussion

The objective of this study was to provide new comprehensive information on the origin, dynamics and transport of viral particles

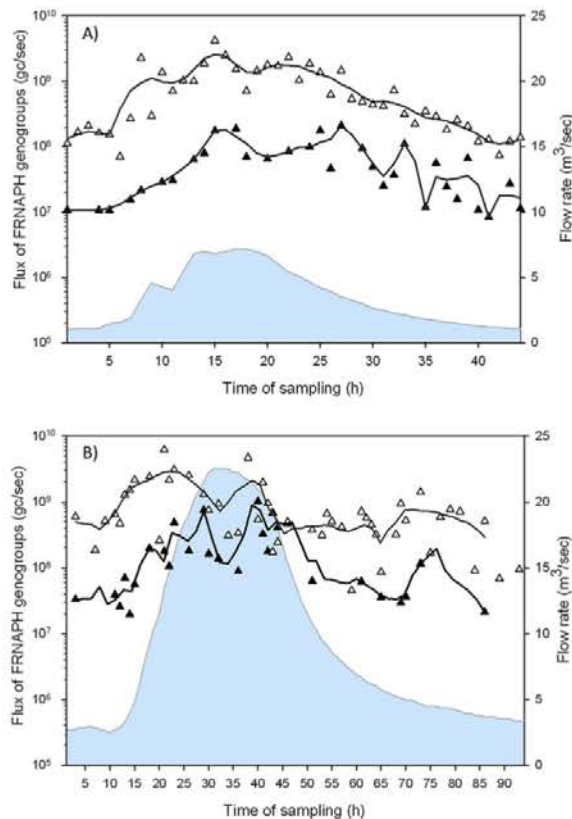


Fig. 4. Fluxes of genogroups I and II upstream the WWTP during summer (A) and autumn (B) rainfall-runoff events. Flow rate in blue area; $\blacktriangle$ genogroup I; $\triangle$ genogroup II; smoothed curves of genogroup I and II in dark and grey lines respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

in surface water during rainfall-runoff events. To this purpose, F-specific RNA phages, selected as faecal and viral pollution indicators, were detected and quantified using both culture and molecular assays. Data was then analysed in an innovative way integrating hydrological, climatological and microbiological parameters.

In low flow conditions, infectious FRNAPH were detected in the Alzette River with concentrations ranging from 2.1 to 3.2 $\log_{10}$ PFU/100 mL, which was comparable to the results of previous studies (Lucena et al., 2003; Ogorzaly et al., 2009; Skraber et al., 2009a; Stewart-Pullaro et al., 2006). It corresponded to the initial faecal pollution of the river and correlatively suggested possible viral pollution. In rainfall-runoff conditions, the FRNAPH concentration reached 3.4 and 3.9 $\log_{10}$ PFU/100 mL, with an average increase of 1.6 and 1.0 $\log_{10}$ for the summer and autumn events, respectively. Faecal pollution and consequently viral pollution were therefore significantly increased. Viral loads were significantly higher during storm event conditions than under low flow conditions as has previously been reported (Hata et al., 2014). Different trends of coliphage concentrations during the storm event as a function of the sampling schemes were also reported (Cole et al., 2003). In order to determine the input of faecal pollution during a rainfall-runoff event, relevant water samples covering the different phases of the hydrograph are essential. Thus, the high frequency

sampling (automatic samplers) seems to be the most appropriate sampling method to monitor the dynamics of viral fluxes to a fine temporal scale during a rainfall-runoff event. Furthermore, FRNAPH concentrations were converted to fluxes. For both events, the flow rate of surface water increased more than eight times compared to low flow conditions, making a comparison of phage concentrations difficult. The conversion in fluxes avoids this problem and so provides a precise idea of the total number of phages present in river water.

Besides the detection of the infectious FRNAPH increase, two distinct waves of phage pollution were also highlighted all along both the rainfall-runoff events. Integration of hydrological parameters in addition to microbial data allowed interpretation of these two chronological arrivals. Phage behaviour observed during both events showed a similar hysteresis pattern in two steps, named figure of eight (Williams, 1989). The first part is a clockwise loop and the second one is an anti-clockwise loop, reflecting two different origins of infectious FRNAPH separate in time. In order to determine these distinct origins, a parallel with turbidity versus water discharge hysteresis patterns can be made. Indeed, the basic relationship between turbidity (or total suspended solid) and flow rate is frequently used in the literature to identify the spatial distribution of sediment origins (Brasington and Richards, 2000; Karimaei Tabarestani and Zarrati, 2014; Smith and Dragovich, 2009). Five classes of hysteresis are classically described: single-valued line, clockwise loop, anti-clockwise loop, single line plus a loop and figure of eight, each motif supplying an indication on the origin of suspended solid delivery through the catchment during rainfall-runoff events (Williams, 1989). In this study, the clockwise loop firstly observed is due to a rapid increase of FRNAPH flux preceding the water discharge peak. This type of loop is attributed to a flushing-out of sediment available in the riverbed before the flow peak (Lawler et al., 2006; Smith and Dragovich, 2009). The assumption of sediment resuspension occurring at the beginning of the rainfall-runoff events was confirmed by the turbidity versus water discharge hysteresis, which also displayed a clockwise schema. Moreover, the presence of viral particles in river sediments was already reported, and some authors considered it as a probable reservoir of virus (Staggemeier et al., 2015; Wu et al., 2009). Then, the anti-clockwise loop observed for FRNAPH was the result of a second increase of viral flux slightly shifted in time compared to the water discharge peak. Since viral particles tend to travel at a velocity closer to the mean flow velocity, the infectious FRNAPH flux tends to lag behind the flood wave. Thus, the lag time increased with the distance of source contaminants downstream (Williams, 1989). The input of wastewater excess from the WWTP (Lawler et al., 2006) can be one of the explanations of this interval. The second reported cause of the anti-clockwise loop is the surface runoff, which depends of cumulative effects of the seasonal precipitations and the degree of soil saturation in water. These chronological origins progressed in the same way for both events studied but with different proportions. For the summer rainfall-runoff event, the hysteresis pattern of discharge water against FRNAPH concentration presented a clockwise loop smaller than the anti-clockwise loop. This observation was reversed for the autumn event hysteresis pattern. The infectious FRNAPH behaviour and turbidity variations in surface water were a combined result of the intensity of the rainfall and the status of the watershed. During summer, water catchment storage was low mainly due to high temperatures and evapo-transpiration. This resulted in low pre-event discharge (0.5 m^3/sec) and low runoff coefficient (7%). Observations of antecedent rainfall prior the rainfall-runoff event also allowed us to determine the amount of available sediment at the bottom of the riverbed. Ten days prior to the summer rainfall-runoff event, 20 mm of precipitation occurred flushing out the

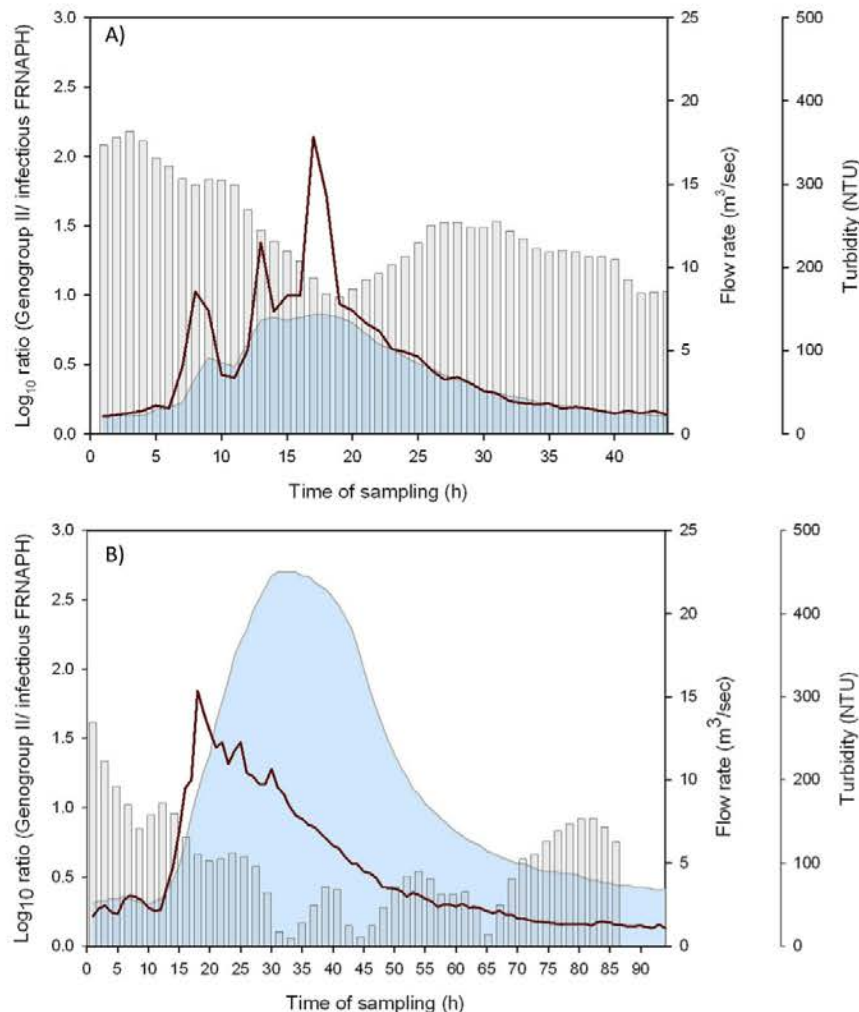


Fig. 5. Variation of $\log_{10}$ -transformed ratio genogroup II genome on infectious FRNAPH fluxes (bar charts) during summer (A) and autumn (B) rainfall-runoff events. Red line represents turbidity for each event. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

bottom of the river. Therefore, little sediment was available during the summer event. In autumn, the catchment progressively water saturated due to the frequency of seasonal precipitation and the increase of water storage. Consequently, pre-event discharge values ($2.6 \text{ m}^3/\text{sec}$) and runoff coefficients (34%) were higher. However, unlike during the summer event, a lot of sediment was hypothetically accessible at the bottom of the riverbed due to no antecedent rainfall prior to the event. Thus, FRNAPH fluxes observed during the rainfall-runoff events resulted from two successive waves of FRNAPH pollution coming from two chronological origins: first the resuspension of riverbed sediment and later the surface runoff or the WWTP effluents. Furthermore, the intensity of each pollution wave can vary depending on the status of the water catchment storage acting on the intensity of the surface runoff, and antecedent rainfall, acting on sediment resuspension.

In order to establish the origin of the faecal pollution encountered in the Alzette River in low flow and rainfall-runoff conditions, FRNAPH genogroups were quantified using a molecular approach.

The application of RT-qPCR can be hampered by the presence of molecular inhibitors such as humic and fulvic acids, organic compounds, bacterial debris or nucleases (Gibson et al., 2012; Rodríguez et al., 2012b), especially in the case of complex water samples gathered during rainfall-runoff events. Virus recovery efficiency and nucleic acid extraction can also be affected (Hata et al., 2014). Only 1.0% of tested samples ($n = 202$ of 392 total samples) had an inhibition rate superior or equal to 90%. Molecular data reported here was under estimated to a certain extent, but that did not prevent the data treatment. Moreover, molecular data can be considered as more appropriate than infectivity data for source identification, since the FRNAPH genogroups exhibit difference environmental persistence characteristics. Infectious units from genogroups I and II are universally described as more persistent than genogroups III and IV. These distinct survival properties of the FRNAPH genogroups can hindered the establishment of their original proportion in water, thus giving misleading information when they are used for microbial source tracking (Long and Sobsey,

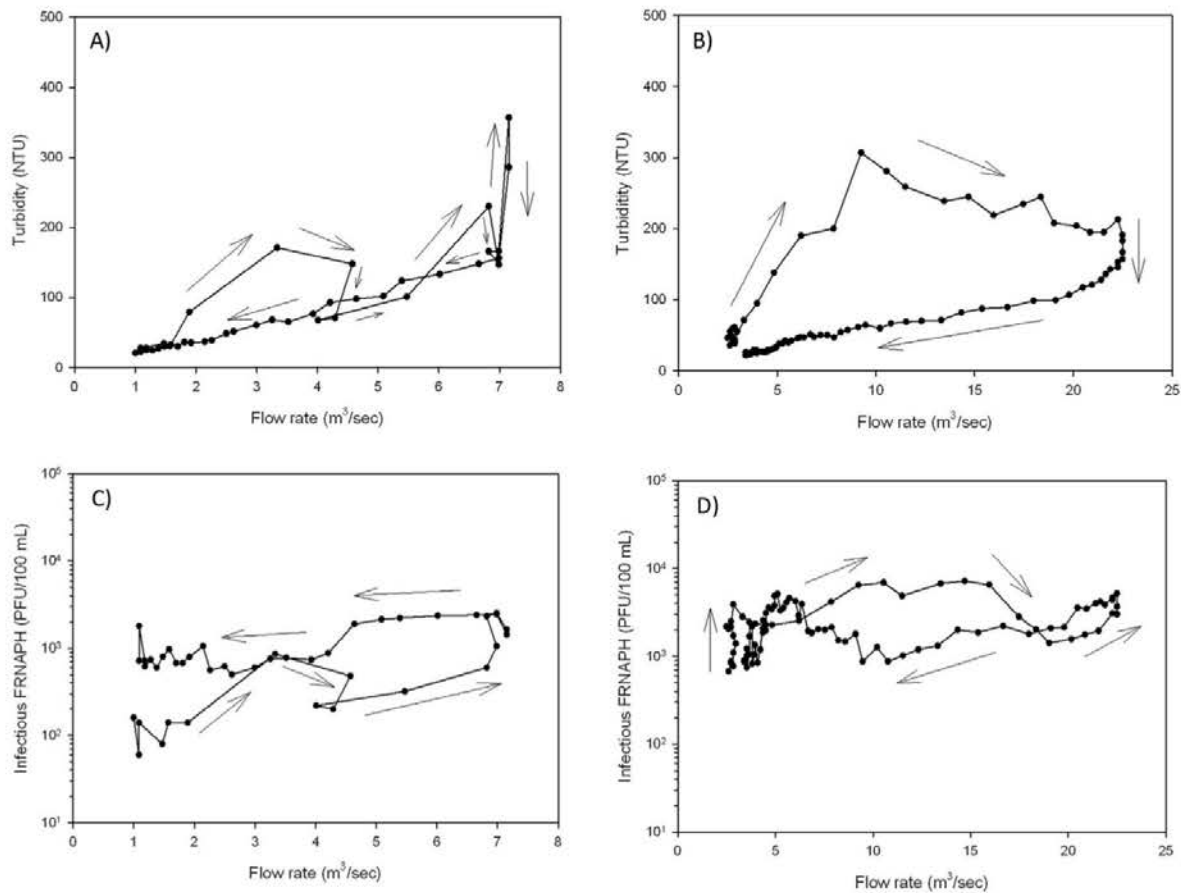


Fig. 6. Hysteresis plots of water discharge against turbidity (A, B) and infectious FRNAPH concentration (C, D) during summer (A, C) and autumn events (B, D), respectively.

2004; Muniesa et al., 2009; Ravva and Sarreal, 2016; Yang and Griffiths, 2013). Considering the molecular data, the viral genome persists longer than the infectious status of the corresponding virus (Bertrand et al., 2012; Gassilloud et al., 2003), and no significant difference of RNA persistence has been showed for the four genogroups (Kirs and Smith, 2007; Ogorzaly et al., 2010). The use of the RT-qPCR results for the source identification allows the prevention of this limitation. In addition, the origin of human or animal faecal pollution was determined here with the ratio of genogroup II to genogroup I, both considered as the most persistent among the four genogroups.

The faecal pollution observed in the Alzette River can be described as of human origin, as evidenced by the broad occurrence (100% of positive samples) and the high concentration (more than $4.3 \log_{10}$ genome copies/100 mL) of genogroup II in low flow conditions. The presence of the three wastewater treatment plants upstream from the studied area can be a cause of this anthropic pollution. Furthermore, the comparison of the infectious FRNAPH flux upstream and downstream from the Hesperange WWTP in summer and in winter showed a small impact of the WWTP only during lowest flow rate of the river (in summer). Animal sources of faecal pollution were also possible in the Alzette River as highlighted by the presence of genogroup I in water samples (around 2.2×10^7 gc/sec), but its link to human pollution is not excluded

(Hartard et al., 2015; Harwood et al., 2013). FRNAPH genogroups were also detected during both events studied with a presence and increase of genogroups I, II and III. For instance, genogroup II presented an increase of $1.0 \log_{10}$ (5.9×10^8 to 6.6×10^9 gc/sec) and $1.6 \log_{10}$ (1.2×10^8 to 4.5×10^9 gc/sec) for summer and autumn events, respectively. Given that genogroups I and II were mostly detected during both studied events rather than genogroup III, only the ratio of genogroup II to genogroup I was investigated. Considering that genogroup II is highly specific to human pollution and that genogroup I may be excreted in high quantities by animals this ratio may inform about both animal and human inputs. This approach was similar to that used by Ogorzaly et al. (2009). A significant increase of the ratio genogroup II to genogroup I occurred in parallel to the first peaks of turbidity, regardless of the event examined. This variation mainly resulted in a significant input of genogroup II from resuspended sediment. The sediment may contain more genogroup II because the baseline of the faecal pollution was mainly human. Indeed, hysteresis analyses demonstrated the contribution of sediment resuspension phenomenon in the first wave of FRNAPH contamination. Moreover, this assumption was supported by the major occurrence of genogroup II in the sediment of the riverbed of the Alzette River (data not shown). In a second phase, the ratio genogroup II to genogroup I decreased for both events with a more pronounced drop during the rainfall-

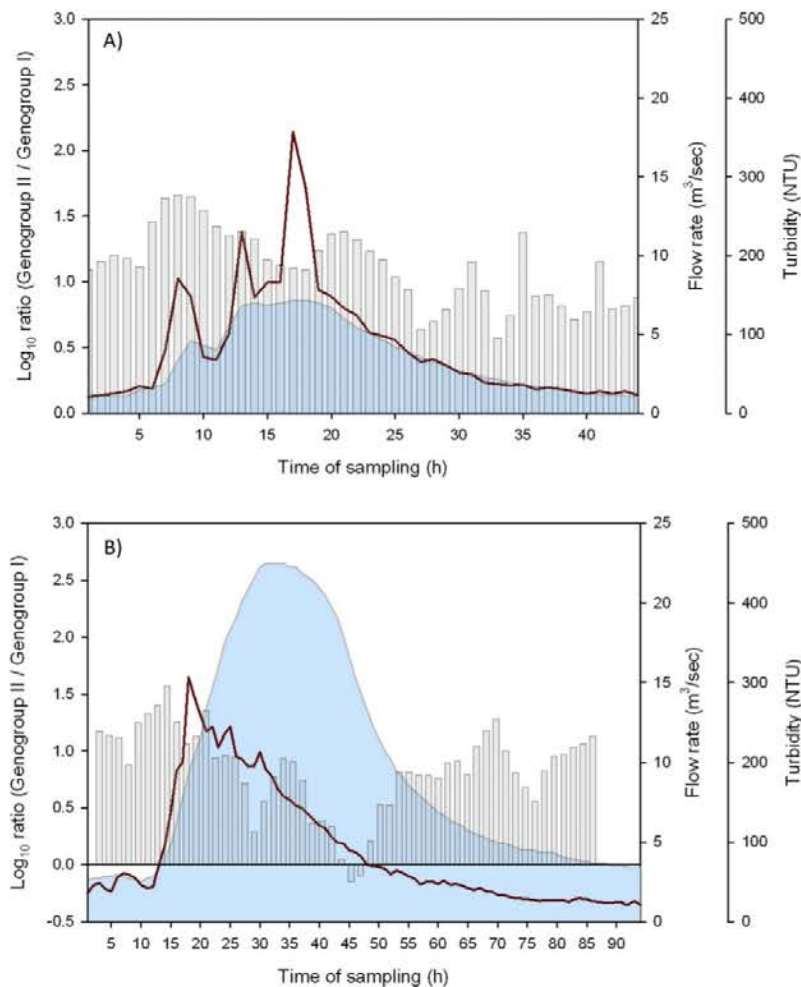


Fig. 7. Variation of $\log_{10}$ -transformed ratio genogroup II on genogroup I fluxes (bar charts) during summer (A) and autumn (B) rainfall-runoff events. Red line represents turbidity for each event. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

runoff autumn event. In addition to the genogroup II, an input of genogroup I counterbalanced the ratio genogroup II to genogroup I. Hysteresis pattern interpretations showed that the second input of infectious FRNAPH arrived slightly shifted in time in comparison to the wave of discharge water. Runoff of urban and rural areas or excess water of WWTP effluents were possible origins coming from upstream of the measuring station. Genogroup I, which were mainly derived from animal faeces, came mainly from surface runoff as explained by the runoff coefficient of summer 7% and autumn events 34%. During the summer event, genogroup I was also meaningful during the falling phase, where the ratio genogroup II to genogroup I was lowest. Surface runoff can take more time during the summer season due to the drought of the soil absorbing rainwater.

In some other studies, the risk concept was broached with molecular results of enteric virus pathogens presenting a higher occurrence in flood water (Ngaosuwanikul et al., 2013; Sidhu et al., 2012). However, given that a viral genome has a higher persistence compared to infectivity, an exaggerated conclusion can be made. Compared to these studies, monitoring of infectious FRNAPH, in

parallel with genogroups, informs on the real amount and proportion of infectious phages during a rainfall-runoff event. The genogroup II to infectious FRNAPH ratio may thus give additional information linked with the age of the pollution. At the beginning of the events, the ratio was stable due to an equivalent increase of infectious FRNAPH and genogroup II genome. The input of genogroup II coming from resuspended sediment can be considered as infectious. Much data in the literature has shown the persistence of viruses in sediment (Skraber et al., 2009b; Smith et al., 1978). Indeed, it was suggested that the adsorption to solid particles could protect viruses and prolong their infectivity (Labelle et al., 1980). Accessibility of UV rays to sediment is limited by the depth and turbidity of surface water. Then, the genogroup II genome to infectious FRNAPH ratio decreased for both events during the peak of discharge water. The arrival of infectious genogroup I from surface runoff can explain this variation of ratio. At the end of the events, the ratio of genogroup II genome to infectious FRNAPH was lower than prior to the event. The rate of infectious phage particles was much more important at the end of the event than at the beginning. It therefore appeared, for the first time, that the infectious FRNAPH

input continued for some time after rainfall-runoff events despite the fact that flow rate of the Alzette river return to its normal level. If similar dynamic patterns occur for pathogenic viruses, this implies that a human health threat is not only present during the rainfall-runoff event but also after. These new data have to be taken into account in the risk assessment studies. In conclusion, these results provide chronological information on infectious FRNAPH that could allow a better estimation of the risk for human health during a rainfall-runoff event.

5. Conclusions

A combination of microbiological and hydrological approaches allowed a better understanding of the origin and dynamics of viral particles in a stream during rainfall-runoff events. These findings clearly highlighted the importance of the hydrologic cycle to virus fate and transport. Specifically, these results revealed that:

- The FRNAPH flux in the water column increase in accordance with hydrograph variations.
- FRNAPH load observed during the rainfall-runoff events result from two successive waves of FRNAPH pollution coming from two distinct origins: first the resuspension of riverbed sediment and later the surface runoff or WWTP effluents.
- Sediment available on the riverbed contributes to a supply of genogroup II in the water column, while genogroup I principally comes from the surface runoff.
- The polluted charge present a higher flux of infectious phage particles during rainfall-runoff events compared to low flow.
- Viral pollution decreases more slowly than the flow of the river with a flux of infectious FRNAPH always higher in post-rainfall runoff event compared to pre-events.

Acknowledgements

The authors would like to thank D. Collard, A. Tavares-Furtado and C. Walczak for their excellent technical assistance in sampling campaigns and lab experiments. We thank N. Martinez Carreras, C. Hissler and C. Tailliez for their valuable assistance in understanding the rainfall-runoff events. We also thank L. L'Hoste for his help in the production of the Alzette watershed map and J.F. Ifly for the installation of automatic sampling in the studied area. Blandine Fauvel received an AFR grant from the National Research Fund (AFR code 6035344), Luxembourg.

References

- Bertrand, I., Schijven, J.F., Sanchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A.M., Myrmet, M., Sellwood, J., Cook, N., Gantzer, C., 2012. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J. Appl. Microbiol.* 112, 1059–1074. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x>.
- Bosch, A., 2007. Human Viruses in Water: Perspectives in Medical Virology, vol. 17. Elsevier, pp. 91–108. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17005-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17005-1).
- Brasington, J., Richards, K., 2000. Turbidity and suspended sediment dynamics in small catchments in the Nepal Middle Hills. *Hydrol. Process.* 14, 2559–2574. [http://dx.doi.org/10.1002/1099-1085\(200010\)14:14<2559::AID-HYP114>3.0.CO;2-E](http://dx.doi.org/10.1002/1099-1085(200010)14:14<2559::AID-HYP114>3.0.CO;2-E).
- Bruggink, L.D., Marshall, J.A., 2010. The incidence of norovirus-associated gastroenteritis outbreaks in victoria, Australia (2002–2007) and their relationship with rainfall. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2822–2827. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph7072822>.
- Cann, K.F., Thomas, D.R., Salmon, R.L., Wyn-Jones, A.P., Kay, D., 2012. Extreme weather-related weather events and waterborne disease. *Epidemiol. Infect.* 141, 671–686. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268812001653>.
- Carlton, E.J., Eisenberg, J.N.S., Goldstick, J., Cevallos, W., Trostle, J., Levy, K., 2014. Heavy rainfall events and diarrhea incidence: the role of social and environmental factors. *Am. J. Epidemiol.* 179, 344–352. <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwt279>.
- Chen, H.J., Chang, H., 2014. Response of discharge, TSS, and *E. coli* to rainfall events in urban, suburban, and rural watersheds. *Environ. Sci. Process. Impacts* 16, 2313–2324. <http://dx.doi.org/10.1039/C4EM00327F>.
- Chu, Y., Salles, C., Tournoud, M.G., Got, P., Troussellier, M., Rodier, C., Caro, A., 2011. Faecal bacterial loads during flood events in Northwestern Mediterranean coastal rivers. *J. Hydrol.* 405, 501–511. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhydrol.2011.05.047>.
- 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. Environ. Microbiol.* 69, 6507–6514. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507>.
- Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierzo, V., Boque, M., Gawler, A., Höller, C., Lambiri, M., Miolo, G., Moreno, B., Niemi, M., Sommer, R., Valentin, B., Wiedenmann, A., Young, V., Joffre, J., 2002. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. *Water Res.* 36, 4963–4974. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00229-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00229-4).
- Corsi, S.R., Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Hughes, P.E., Baldwin, A.K., 2014. Human and bovine viruses in the Milwaukee River watershed: hydrologically relevant representation and relations with environmental variables. *Sci. Total Environ.* 490, 849–860. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.072>.
- Crowther, J., Kay, D., Wyer, M.D., 2002. Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK: relationships with land use and farming practices. *Water Res.* 36, 1725–1734. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00394-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00394-3).
- Curriero, F., Patz, J., Rose, J., Lele, S., 2001. Analysis of the association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948–1994. *Am. J. Public Health* 91, 1194–1199. <http://dx.doi.org/10.2105/AJPH.91.8.1194>.
- Doran, J.W., Linn, D.M., 1979. Bacteriological quality of runoff water from pastureland. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 985–991.
- Dungeni, M., van Der Merwe, R.R., Momba, M.N.B., 2010. Abundance of pathogenic bacteria and viral indicators in chlorinated effluents produced by four wastewater treatment plants in the Gauteng Province, South Africa. *Water SA* 36, 607–614.
- 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, 3965–3969. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003>.
- Ghimire, B., Deng, Z., 2013. Hydrograph-based approach to modeling bacterial fate and transport in rivers. *Water Res.* 47, 1329–1343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.051>.
- Gibson, K.E., Schwab, K.J., Spencer, S.K., Borchardt, M.A., 2012. Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples. *Water Res.* 46, 4281–4291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.030>.
- Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M., 2015. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 520, 32–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.034>.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., Kunikane, S., 2009. Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan. *Water Res.* 43, 3759–3764. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.043>.
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., Gantzer, C., 2015. Occurrence of and sequence variation among F-specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6505–6515. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01905-15>.
- Harwood, V.J., Boehm, A.B., Sassoubre, L.M., Vijayavel, K., Stewart, J.R., Fong, T.T., Caprais, M.P., Converse, R.R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J.A., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J.F., Kashian, D.R., Noble, R.T., Taylor, H., Wicki, M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Res.* 47, 6929–6943. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.064>.
- Hata, A., Katayama, H., Kojima, K., Sano, S., Kasuga, I., Kitajima, M., Furumai, H., 2014. Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows. *Sci. Total Environ.* 468–469, 757–763. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.093>.
- Havelaar, A.H., Van Olphen, M., Drost, Y.C., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2956–2962.
- Hofstra, N., 2011. Quantifying the impact of climate change on enteric waterborne pathogen concentrations in surface water. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 3, 471–479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cosust.2011.10.006>.
- Hunter, P.R., 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *J. Appl. Microbiol.* 94 (Suppl. 1), 375–465. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.5.x>.
- Joffre, J., 2007. Indicators of waterborne enteric viruses. In: *Human Viruses in Water, Perspectives in Medical Virology*. Elsevier, pp. 227–249. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069\(07\)17011-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-7069(07)17011-7).
- Karimae Tabarestani, M., Zarrati, A.R., 2014. Sediment transport during flood event: a review. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12, 775–788. <http://dx.doi.org/10.1007/s13762-014-0689-6>.
- Keswick, B.H., Gerba, C.P., Dupont, H.L., Rose, J.B., 1984. Detection of enteric viruses in treated drinking-water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1290–1294.
- Kirs, M., Smith, D.C., 2007. Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F-specific RNA coliphages: a method for use in microbial source tracking. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 808–814. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00399-06>.
- Labelle, R.L., Gerba, C.P., Goyal, S.M., Melnick, J.L., Bogdan, G.F., 1980. Occurrence of

- enteric viruses in estuarine sediments relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 588–596.
- Lawler, D.M., Petts, G.E., Foster, I.D.L., Harper, S., 2006. Turbidity dynamics during spring storm events in an urban headwater river system: the Upper Tame, West Midlands, UK. *Sci. Total Environ.* 360, 109–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.08.032>.
- Lee, J.E., Lee, H., Cho, Y.-H., Hur, H.-G., Ko, G., 2011. F+ RNA coliphage-based microbial source tracking in water resources of South Korea. *Sci. Total Environ.* 412–413, 127–131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.061>.
- Lee, J.E., Lim, M.Y., Kim, S.Y., Lee, S., Lee, H., Oh, H.-M., Hur, H.-G., Ko, G., 2009. Molecular characterization of bacteriophages for microbial source tracking in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7107–7114. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00464-09>.
- Long, S.C., Sobsey, M.D., 2004. A comparison of the survival of F+RNA and F+DNA coliphages in lake water microcosms. *J. Water Health* 2, 15–22.
- Lucena, F., Méndez, X., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Guerrero, A., Cárdenas, M., Gantzer, C., Schwartzbrood, L., Skrabber, S., Jofre, J., 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *J. Appl. Microbiol.* 94, 808–815. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x>.
- McCarthy, D.T., Hathaway, J.M., Hunt, W.F., Deletic, A., 2012. Intra-event variability of Escherichia coli and total suspended solids in urban stormwater runoff. *Water Res.* 46, 6661–6670. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.01.006>.
- McDonald, A., Kay, D., 1981. Enteric bacterial concentrations in reservoir feeder streams: baseflow characteristics and response to hydrograph events. *Water Res.* 15, 961–968. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(81\)90203-7](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(81)90203-7).
- Muniesa, M., Payan, A., Moce-Livina, L., Blanch, A.R., Jofre, J., 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Res.* 43, 1559–1564. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.038>.
- Mwanamoki, P.M., Devarajan, N., Thevenon, F., Atibu, E.K., Tshibanda, J.B., Ngelinkoto, P., Mpiana, P.T., Prabakar, K., Mubedi, J.L., Kabele, C.G., Wildi, W., Poté, J., 2014. Assessment of pathogenic bacteria in water and sediment from a water reservoir under tropical conditions (Lake Ma Vallée), Kinshasa Democratic Republic of Congo. *Environ. Monit. Assess.* 186, 6821–6830. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-014-3891-6>.
- Nasser, A.M., Tchotch, Y., Fattal, B., 1993. Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and Poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Water Sci. Technol.* 27, 401–407.
- Ngaosuwanikul, N., Thippornchai, N., Yamashita, A., Vargas, R.E.M., Tunyong, W., Mahakunkijchareon, Y., Ikuta, K., Singhasivanon, P., Okabayashi, T., Leangwutiwong, P., 2013. Detection and characterization of enteric viruses in flood water from the 2011 Thai flood. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66, 398–403. <http://dx.doi.org/10.7883/yoken.66.398>.
- Nichols, G., Lane, C., Asgari, N., Verlander, N.Q., Charlett, A., 2009. Rainfall and outbreaks of drinking water related disease and in England and Wales. *J. Water Health* 7, 1–8. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2009.143>.
- 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, 8019–8025. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00917-10>.
- Ogorzaly, L., Gantzer, C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *J. Virol. Methods* 138, 131–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004>.
- 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, 1257–1264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.011>.
- Panasiuk, O., Hedström, A., Marsalek, J., Ashley, R.M., Viklander, M., 2015. Contamination of stormwater by wastewater: a review of detection methods. *J. Environ. Manag.* 152, 241–250. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.050>.
- Phanuwan, C., Takizawa, S., Oguma, K., Katayama, H., Yunika, A., Ohgaki, S., 2006. Monitoring of human enteric viruses and coliform bacteria in waters after urban flood in Jakarta, Indonesia. *Water Sci. Technol.* 54, 203. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2006.470>.
- Ramírez-Castillo, F.Y., Loera-Muro, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F.J., Harel, J., Guerrero-Barrera, A.L., 2015. Waterborne pathogens: detection methods and challenges. *Pathogens* 4, 307–334. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens4020307>.
- Ravva, S.V., Sarreal, C.Z., 2016. Persistence of F-specific RNA coliphages in surface waters from a produce production region along the central coast of California. *PLoS One* 11, e0146623. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146623>.
- Rodríguez, R.A., Gundy, P.M., Rijal, G.K., Gerba, C.P., 2012a. The impact of combined sewage overflows on the viral contamination of receiving waters. *Food Environ. Virol.* 4, 34–40. <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-011-9076-3>.
- Rodríguez, R.A., Thie, L., Gibbons, C.D., Sobsey, M.D., 2012b. Reducing the effects of environmental inhibition in quantitative real-time PCR detection of adenovirus and norovirus in recreational seawaters. *J. Virol. Methods* 181, 43–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.01.009>.
- Rossi, L., Krejci, V., Rauch, W., Kreikenbaum, S., Fankhauser, R., Gujer, W., 2005. Stochastic modeling of total suspended solids (TSS) in urban areas during rain events. *Water Res.* 39, 4188–4196. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.041>.
- Sidhu, J.P.S., Hodgson, L., Ahmed, W., Chong, M.N., Toze, S., 2012. Prevalence of human pathogens and indicators in stormwater runoff in Brisbane, Australia. *Water Res.* 46, 6652–6660. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.03.012>.
- Skraber, S., Langlet, J., Kremer, J.R., Mossong, J., De Landtsheer, S., Even, J., Muller, C.P., Hoffmann, L., Cauchie, H.M., 2011. Concentration and diversity of noroviruses detected in Luxembourg wastewaters in 2008–2009. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5566–5568. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00632-11>.
- Skraber, S., Ogorzaly, L., Helmi, K., Maul, A., Hoffmann, L., Cauchie, H.-M., Gantzer, C., 2009a. Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Res.* 43, 4780–4789. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.020>.
- Skraber, S., Schijven, J., Italiaander, R., de Roda Husman, A.M., 2009b. Accumulation of enteric bacteriophage in fresh water sediments. *J. Water Health* 7, 372. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2009.098>.
- Smith, E.M., Gerba, C.P., Melnick, J.L., 1978. Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 685–689.
- Smith, H.G., Dragovich, D., 2009. Interpreting sediment delivery processes using suspended sediment-discharge hysteresis patterns from nested upland catchments, south-eastern Australia. *Hydrol. Process.* 23, 2415–2426. <http://dx.doi.org/10.1002/hyp.7357>.
- Staggemeier, R., Bortoluzzi, M., da Silva Heck, T.M., da Silva, T., Spilki, F.R., de Matos Almeida, S.E., 2015. Molecular detection of human adenovirus in sediment using a direct detection method compared to the classical polyethylene glycol precipitation. *J. Virol. Methods* 213, 65–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.11.019>.
- Staley, C., Reckhow, K.H., Lukasik, J., Harwood, V.J., 2012. Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in a Florida freshwater lake. *Water Res.* 46, 5799–5812. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.012>.
- Stewart-Pullaro, J., Daugomah, J.W., Chestnut, D.E., Graves, D.A., Sobsey, M.D., Scott, G.I., 2006. F+ RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters. *J. Appl. Microbiol.* 101, 1015–1026. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03011.x>.
- Teklehaimanot, G.Z., Genthé, B., Kamika, I., Momba, M.N.B., 2015. Prevalence of enteropathogenic bacteria in treated effluents and receiving water bodies and their potential health risks. *Sci. Total Environ.* 518–519, 441–449. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.019>.
- Tiefenthaler, L., Stein, E.D., Schiff, K.C., 2011. Levels and patterns of fecal indicator bacteria in stormwater runoff from homogeneous land use sites and urban watersheds. *J. Water Health* 9, 279–290. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2010.056>.
- Williams, G.P., 1989. Sediment concentration versus water discharge during single hydrologic events in rivers. *J. Hydrol.* 111, 89–106.
- Wu, J., Rees, P., Storrer, S., Alderisio, K., Dorner, S., 2009. Fate and transport modeling of potential pathogens: the contribution from sediments. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 45, 35–44. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1752-1688.2008.00287.x>.
- Yang, Y., Griffiths, M.W., 2013. Comparative persistence of subgroups of F-specific RNA phages in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4564–4567. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00612-13>.

En résumé, la combinaison d'approches microbiennes et hydrologiques nous a permis de comprendre l'origine et la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'Alzette pendant des événements de crue.

Une augmentation de la concentration et du flux en bactériophages infectieux a été observée suite aux fortes intempéries. Le suivi temporel heure par heure des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux tout au long des deux événements de crue a permis de mettre en évidence un apport important des particules virales infectieuses au moment de la crue mais également après la montée des eaux. Ces résultats apportent de nouvelles informations dans l'évaluation des risques pour la santé humaine lors d'événements de crue. En effet, si les virus pathogènes présentent une dynamique semblable à celle des bactériophages ARN F-spécifiques, les risques encourus pour l'Homme suite à un contact direct ou indirect avec l'eau de surface sont non seulement réels pendant la crue mais perdurent aussi après l'événement.

Deux vagues successives de pollution virale ont été constatées. La remise en suspension du sédiment dès les premières heures de la montée des eaux constitue le premier apport en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux du génogroupe II; tandis que le débordement des stations d'épuration et/ou le lessivage des surfaces constitue la deuxième vague de pollution avec une arrivée plus tardive de bactériophages infectieux et totaux du génogroupe I.

Ces deux premiers chapitres nous ont donc permis d'étudier la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'Alzette en fonction des conditions hydro-climatologiques. De plus, la présence de bactériophages ARN F-spécifiques dans le sédiment (chapitre 3) a confirmé le transfert des particules virales de l'eau de surface vers le sédiment. Ce quatrième chapitre a mis en évidence la réciproque, c'est-à-dire la remise en suspension des particules virales du sédiment vers l'eau de surface. Le prochain chapitre a donc pour objectif d'apporter des informations supplémentaires sur l'origine de l'accumulation des bactériophages ARN F-spécifiques dans le sédiment.

*Chapitre 5 : Distribution des
bactériophages ARN F-spécifiques de la
colonne d'eau au sédiment dans la
rivière Alzette*

L'origine de l'accumulation des particules virales dans le sédiment suscite l'intérêt de la communauté scientifique depuis quelques décennies. La distribution des virus entre l'eau de surface et le sédiment est étroitement liée à la capacité des particules virales à interagir avec les autres particules en suspension. C'est pourquoi le statut de la particule virale (libre ou associée à une surface) a été investigué. Au regard des matrices analysées (eau de surface ou effluent de station d'épuration), il est suggéré dans la littérature que la majorité des particules virales sont libres ou associées à des particules inférieures à 0,3 μm (Hejkal et al., 1981; Payment et al., 1988). Dans ces conditions, la sédimentation des particules virales demeure énigmatique. Qui plus est, les associations entre particules virales et solides de l'environnement sont très difficiles à prédire. De nombreuses variables peuvent effectivement influencer ces interactions telles que les propriétés intrinsèques du virus, les conditions physico-chimiques du milieu ou les propriétés du support d'attachement.

Ainsi, l'objectif de ce troisième chapitre est de mieux définir la distribution des bactériophages ARN F-spécifiques entre la colonne d'eau et le sédiment dans l'Alzette. Pour se faire, trois aspects ont été abordés : (i) l'étude du statut (libre ou associé à une particule solide) des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans la colonne d'eau en fonction des conditions hydro-climatologiques, (ii) la détermination de la capacité d'attachement des quatre génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques au sédiment et (iii) l'exploration *in situ* de la distribution des quatre génogroupes infectieux dans l'eau de surface et le sédiment.

Dans un premier temps, quatre échantillons d'eau de l'Alzette, prélevés distinctement en période de débit de base, en début de crue, au pic d'un hydrogramme de crue et dans la phase de récession d'une crue, ont été analysés. Après trois centrifugations successives (3 000 g, 10 000 g et 230 000 g), les résultats obtenus montrent que le statut des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux varie en fonction des conditions hydro-climatologiques (Figure 37). La capacité des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux à sédimenter suite aux diverses accélérations appliquées à l'échantillon est particulièrement différente pour les deux conditions extrêmes (débit de base *versus* pic de crue). Dès la première centrifugation à 3 000 g, 54,9% des bactériophages infectieux ont été éliminés du surnageant de l'échantillon prélevé au pic d'une crue tandis que seulement 15,5% des phages ont sédimenter pour l'échantillon prélevé en période de débit de base. A l'inverse, la sédimentation des particules en suspension était identique dès la première centrifugation avec 86,7% à 96,9% de perte malgré une turbidité initiale variée entre les échantillons. Ainsi, le comportement différent des particules virales par rapport aux particules en suspension suggère qu'en conditions de débit de base et lors de la montée des eaux d'une crue, les bactériophages ARN F-spécifiques peuvent être soit libres, soit associés à des particules trop fines pour sédimenter. Tandis qu'au pic d'une crue et, dans une certaine mesure, pendant la phase de récession d'une crue, les bactériophages ARN F-spécifiques peuvent être associés à des particules capables de sédimenter.

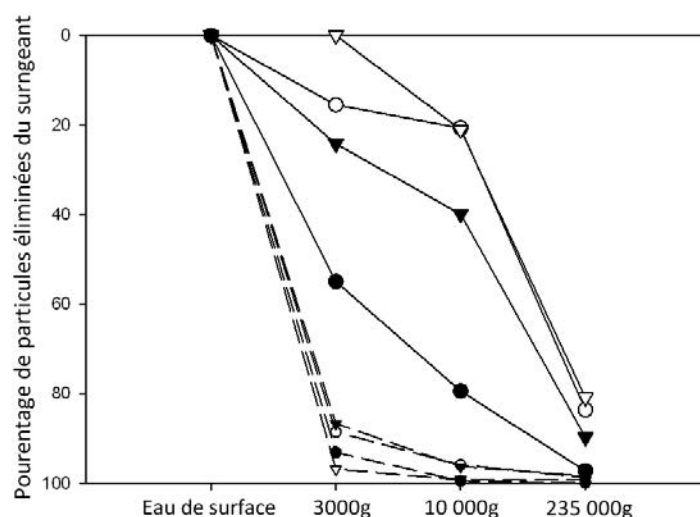


Figure 37 Pourcentage de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux (traits pleins) et de particules en suspension (traits pointillés) éliminées après les centrifugations successives, en fonction des conditions hydro-climatologiques (○ débit de base, ▽ phase de montée d'une crue, ● pic d'une crue, ▼ phase de récession d'une crue).

Dans une seconde partie de l'étude, la capacité d'attachement des bactériophages ARN F-spécifiques au sédiment a été évaluée. Pour se faire, quatre souches fréquemment détectées dans le sédiment et représentatives des quatre génogroupes ont été isolées et testées dans des expériences en mode batch. L'inactivation des bactériophages infectieux et leur attachement au sédiment ont été différenciés grâce aux résultats combinés des quantifications des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux. Un comportement différent des quatre génogroupes en l'absence et en la présence de sédiment a été observé. D'une part, les souches des génogroupes I et II se sont avérées plus persistantes que les souches des génogroupes III et IV en absence de sédiment. D'autre part, en présence de sédiment, aucun attachement à cette matrice environnementale n'a été constaté pour les phages appartenant au génogroupe I tandis que les phages du génogroupe II, III, et IV ont été capables de s'attacher au sédiment dès les premières minutes de contact. Une dynamique similaire après contact avec le sédiment a aussi été observée pour les quatre souches de référence des génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques.

Dans une dernière partie de l'étude, l'analyse de 166 plages de lyse a permis de mettre en évidence une différence de distribution des quatre génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux entre l'eau et le sédiment. Les bactériophages infectieux appartenant au génogroupe III ont été moins détectés dans le sédiment (15%) que dans l'eau de rivière (33%) ; tandis que les phages appartenant au génogroupe II sont plus présents dans le sédiment (73%) que dans la colonne d'eau (55%). L'abondance des phages appartenant au génogroupe II dans le système d'étude ainsi que les résultats obtenus lors des expériences en batch peuvent expliquer la présence majoritaire du génogroupe II dans le sédiment. En effet, malgré la capacité d'attachement des bactériophages appartenant aux génogroupes II, III et IV, seuls les phages du génogroupe II persistent dans les conditions testées.

L'ensemble de ces résultats est décrit de manière plus détaillée dans un article scientifique publié dans le journal *Science of the Total Environment*.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Interactions of infectious F-specific RNA bacteriophages with suspended matter and sediment: Towards an understanding of FRNAPH distribution in a river water system

Blandine Fauvel^{a,b,c}, Leslie Ogorzaly^{a,*}, Henry-Michel Cauchie^a, Christophe Gantzer^{b,c}

^a Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST), Department of Environmental Research and Innovation (ERIN); 41, rue du Brill, L-4422 Belvaux, Luxembourg

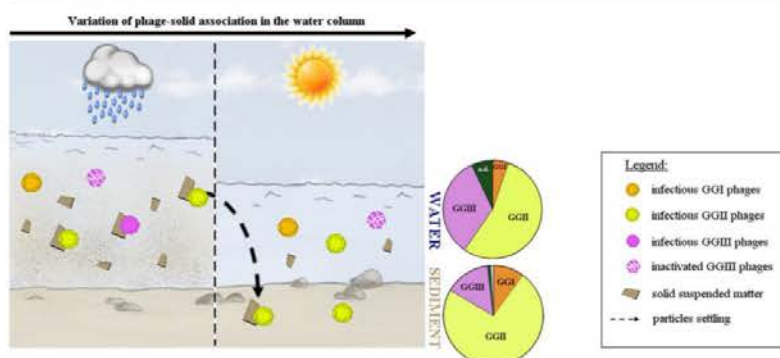
^b Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie, Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy F-54000, France

^c CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy F-54000, France

HIGHLIGHTS

- Hydro-climatological conditions influence phage-solid association in water column.
- FRNAPH from genogroups II, III and IV able to sorb to the riverbed sediment
- Fast attachment kinetics to sediment for all strains
- Genogroup distribution differs between water and sediment compartments.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2016

Received in revised form 13 September 2016

Accepted 15 September 2016

Available online xxxx

Editor: D. Barcelo

Keywords:

F-specific RNA bacteriophages

Phage partitioning

Attachment to sediment

River system

ABSTRACT

The association of viruses with settling particles is certainly a major process controlling the spread of viral pollution in surface water and sediment. To better understand the viral distribution in a river system, the behavior of F-specific RNA bacteriophages (FRNAPHs) was investigated in relationship with the suspended solids and sediment. The partitioning of phage particles (free or associated with solids) in surface water and the attachment capabilities of eight distinct strains of phages to sediment were studied in lab experiments. *In situ* observations were also performed with the genotyping of 166 individual plaques of FRNAPHs isolated from surface water and sediment. The results reported here demonstrate a variation of the status of infectious phages as a function of the hydro-climatological conditions. Phage-solid association seems to mainly occur during the peak of rainfall-runoff events but also to a certain extent during the recession phase compared to low flow conditions. The transfer of phages from the water column to sediment may occur at this time. Furthermore, the ability of FRNAPHs to interact with sediment was established for six strains out of eight, belonging to genogroups II, III and IV. A similar dynamic was observed for strains within a same genogroup despite different intensity of attachment and inactivation rates for strains of genogroups III and IV. The latter results match the *in situ* observations in the water and

Abbreviations: FRNAPHs, F-specific RNA bacteriophages; GGs, genogroups; PFU, plaque forming unit; WWTP, wastewater treatment plant; gc, genome copies; PBS, phosphate buffer saline.

* Corresponding author.

E-mail address: leslie.ogorzaly@list.lu (L. Ogorzaly).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.115>

0048-9697/© 2016 Luxembourg Institute of Science and Technology. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

sediment compartments of the studied area. Infectious FRNAPH genogroup II was more abundant in sediment than in surface water. Its capability to sorb to sediment and its higher persistence in the environment compared to genogroups III and IV were the two main explanations. Together, lab and *in situ* experiments produce an overall vision of the mechanisms governing FRNAPH distribution among the water column and riverbed sediment.

© 2016 Luxembourg Institute of Science and Technology. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

The quality of water resources is mainly influenced by anthropogenic activities, which can entail the occurrence of human pathogenic viruses in surface water, such as enteric viruses transmitted by the fecal-oral route (Hot et al., 2003; Lodder and de Roda Husman, 2005; Pusch et al., 2005; Wyn-Jones et al., 2011). The spread of viral particles in water resources through fecal pollution is notably demonstrated by a high frequency of virus detection not only in environmental waters, but also in the sediment compartment. To date, presence of viruses has been observed in marine (Danovaro et al., 2001; De Flora et al., 1975; Jakubowska-Deredas et al., 2012) and freshwater (Hargreaves et al., 2013; Leroy et al., 2008; Maranger and Bird, 1996; Skrabber et al., 2009) sediments. This compartment is commonly considered as a reservoir of viruses (Bosch et al., 2003). In addition, sediment has been reported to play a major role in the survival rate of infectious viruses. A higher persistence of viruses in sediment than in the water column has been described, as a consequence of a protective effect against inactivating agents (Smith et al., 1978) or a low accessibility of destructive UV rays to trapped viruses (Rao et al., 1984).

Several studies have addressed viral partitioning in surface water to predict sedimentation of viruses (Characklis et al., 2005; Gerba et al., 1978; Hejkal et al., 1981; Metcalf et al., 1984; Payment et al., 1988). Regardless of the matrix analyzed (surface water or treated wastewater), it is suggested that the majority of viral particles are free or associated with particles smaller than 0.3 µm. So, viruses tend to preferentially remain suspended in the water column, which still raises many questions about the transfer of viral particles from contaminated water to sediment. The prediction of virus-solid association in the aquatic environment is difficult due to number of variables, such as intrinsic properties of viruses, physicochemical environmental parameters and surface properties of the support. This was highlighted in the study of Moore et al. (1975) which presented an optimal condition for viral attachment in presence of divalent cations, but also the difference of behavior depending on the viruses tested. Another focus was set on the viral capability to interact with solid particles which influences the distribution of viruses in aquatic systems (Bellou et al., 2015; Bitton, 1975; Gerba et al., 1978; Syngouna and Chrysikopoulos, 2013). These interesting and complex data are essential to predict the fate and transport of viral pollution in aquatic ecosystems.

F-specific RNA bacteriophages (FRNAPHs) are able to replicate in *Escherichia coli*, which are highly present in the animal and human gut. Their concentration in water is thus directly correlated to fecal pollution. The shape and structure of FRNAPHs is similar to the one of enteric viruses, pathogenic for humans (*i.e.* Norovirus, hepatitis A virus). Hence, they help describing the behavior and the fate of pathogenic viruses in the environment or during the process of water treatment. They are generally considered as a valuable tool to evaluate an overall viral hazard in water. FRNAPHs belong to the *Leviviridae* family, which is divided into two genera and four genogroups (GGs): *Levivirus* including GGI and GGII and *Allolevivirus* including GGIII and GGIV. GGI and IV are mainly excreted by animals. GGII and GGIII seem more specific to humans (Hartard et al., 2015; Lee et al., 2011; Lee et al., 2009) especially when primer sequences described by Ogorzaly and Gantzer (2006) are used for the detection by real-time RT-PCR (Ogorzaly and Gantzer, 2006). The reason of such specificity has not been elucidated yet. Nevertheless, some differences between the genogroups have been

underlined. GGI and GGII have a higher survival rate in water compared to GGIII and GGIV (Muniesa et al., 2009). More recently, it was established by using a set of reference species (MS2, GA, and Q8 for GGI, GGII and GGIII, respectively) that even if the surface charge seems the same for all genogroups, the hydrophobicity characteristics were highly different (Dika et al., 2013; Langlet et al., 2008). Attachment to food (Deboosere et al., 2012) or behavior during wastewater treatment (Boudaud et al., 2012; Haramoto et al., 2015) was demonstrated to be significantly impacted. Sometimes the most hydrophobic phage (GA) displayed the highest attachment (food, sludge) while on other matrixes the less hydrophobic one does (sand, ultrafiltration membranes used for water treatment). Such differences should also influence attachment to suspended matter or sediment in water resources but, to our knowledge, no study has investigated the attachment of different FRNAPH GGs or strains on such a complex environmental matrix. This last point seems however crucial with regard to understanding the behavior of phage particles in aquatic environments.

Thus, the purpose of this study was to define the distribution of the four genogroups of FRNAPHs in a river water system including the suspended matter and the sediment compartments. The attachment capability of laboratory and naturally sediment-related strains of phages to the sediment was also determined, in order to inform on the previously observed distribution patterns. Moreover, this will feed the understanding of the varying compartment of the four genogroups under the different hydro-climatological conditions, especially the part due to sediment mobilization or to the enhanced fecal pollution through wastewater discharge and surface runoff. To the best of our knowledge, the establishment of a relationship between the comparative presence of FRNAPHs in surface water and sediment is still unclear and has not been addressed in the scientific literature yet.

Three distinct approaches were followed. First, the partitioning of FRNAPH particles (free or associated to solids) in surface water was investigated under various hydro-climatological conditions to forecast sedimentation behavior. Second, FRNAPH-solid matter interactions were studied in batch experiments for determining the attachment behavior of viral particles to particulate matter, depending on the surface properties of FRNAPHs. In this purpose, four FRNAPH strains isolated from sediment samples and belonging respectively to the four genogroups were identified and tested using fresh sediment and water samples from the study site. The representativeness of sediment isolates from each genogroup was confirmed with batch experiments performed also with prototypic laboratory strains. Third, genotyping of 166 plaques of infectious FRNAPHs collected from surface water and sediment samples was performed in order to have an insight on genogroup distribution in both compartments. In order to clarify the mechanisms governing FRNAPH distribution in the water column and sediment compartments, the *in situ* observations were finally confronted with the data of the lab experiments.

2. Materials and methods

2.1. Collection and processing of river water and sediment samples

2.1.1. Sampling site

Sediment and river water samples were collected from the Alzette River, one of the main rivers in Luxembourg. The sampling site was close to the city of Hesperange, with about 14,000 inhabitants and

located 6 km upstream from Luxembourg-city. Four wastewater treatment plants (WWTP) were located in the 10 km stretch upstream from the sampling site with respective capacities of 24,500, 90,000, 95,000 and 26,000 inhabitant-equivalents. The nearest WWTP, composed of a primary treatment and an activated sludge plant with nitrifying moving bed biofilm reactor technology, was located 1.4 km upstream from the sampling site. A phage removal efficiency of 91.3% during the sewage treatment process was estimated, resulting in a concentration (mean $\pm$ standard deviation) of $4.4 \pm 4.0 \times 10^3$ plaque forming units (PFU)/100 mL ($n = 6$) of infectious FRNAPHs in the WWTP effluents. Three out of the four genogroups were observed in the WWTP effluents ($n = 4$): GGI ($3.0 \pm 2.3 \times 10^5$ genome copies (gc) / 100 mL), GGII ($3.1 \pm 1.7 \times 10^5$ gc/100 mL) and GGIII ($2.2 \pm 0.9 \times 10^4$ gc/100 mL).

2.1.2. Water and sediment sampling

The environmental samples were collected over two different kinds of campaigns. The first one was used to assess the distribution of infectious FRNAPHs in surface water and sediment. A total of 15 surface water and 18 sediment samples were collected during the years 2014–2015. A pump system was developed for vacuuming the surface of the riverbed sediment. It is composed of a sterile 1-L glass bottle connected on one side to a 50-L vacuum container and on the other side to a rigid plastic pipe (diameter = 25 mm). This system is operated by opening a valve allowing sediment to flow through the pipe into the bottle. The second set of water sampling was used to evaluate the partitioning of FRNAPH particles in surface water. Four stream water samples were collected under different hydro-climatologic conditions from low flow to high flow rates during rainfall-runoff events (Table 1). All samples were transported back to the laboratory in a refrigerated compartment. Samples containing sediment were stored for 24 h at 4 °C in order to allow settlement of particles.

2.1.3. Elution of phages from sediment

Twenty milliliters of pyrophosphate buffer (0.01 M) at pH 7.0 were added to 10 g of wet sediment (sediment/liquid ratio = 0.5). The mixture was submitted to sonication (37 kHz) on ice for 3 min and interrupted for 30 s every minute for mixing manually the samples (Danovaro et al., 2001). Samples were then shaken at 400 rpm for 30 min at 4 °C (orbital shaker, KS 260 basic IKA®). Supernatant was retrieved twice after successive centrifugations at 10,000g for 10 and 5 min. Ten 1-mL fractions of the supernatant were used for the determination of infectious FRNAPH concentration by plaque assay. The recovery of the infectious FRNAPH elution step was assessed on different sediment samples by spiking a known amount of the most representative strain in sediment i.e. BZ13 strain DL20 (FJ483839) belonging to GGII. More than 10% of infectious viral particles were found after the

elution process with a recovery variability which could be influenced by the sediment matrix ($29.3 \pm 16.0\%$, $n = 6$).

2.2. F-specific RNA bacteriophages

2.2.1. Detection of infectious FRNAPHs

The concentration of infectious FRNAPHs was determined using *Salmonella enteric* serovar Typhimurium strain WG49 as host bacteria and the double-agar-layer technique as described in the ISO standard 10705-1 (2001). Nalidixic acid was added to media for limiting the growth of the abundant bacterial flora. Negative and positive controls (MS2 phage) were included in the determination of infectious FRNAPH concentrations. Plates were incubated overnight at 37 °C before PFU counting.

2.2.2. Plaque isolation from environmental samples

From surface water and sediment samples collected during the years 2014–2015, 10 well-separated phage plaques formed on agar plates were randomly collected by micropipette aspiration and suspended in a 1 mL volume of phosphate-buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich) supplemented with 5% of glycerol (Ogorzaly et al., 2009). After 1 min of agitation at 30 °C (1400 rpm, Thermomixer, Eppendorf), phage isolates (57 isolates from surface water and 109 from sediment) were stored at -80 °C until characterization. Genotyping and identification of the field-collected strains were performed using a high throughput sequencing technology based on whole genome sequencing (unpublished protocol).

2.2.3. Bacteriophage strains and stock production

Once collected and identified, FRNAPH strains belonging to each genogroup (GGI to GGIV) was replicated before use in batch experiments. MS2 strain DL16 (EF108464), BZ13 strain DL20 (FJ483839), Q8 strain HL4-9 (FJ483841) and FI strain BR1 (FJ539134) were selected as the most representative sediment isolates of the GGI (predominance of 73% of strain DL16, $n = 14$), GGII (39% of strain DL20, $n = 111$), GGIII (75% of strain HL4-9, $n = 35$) and GGIV (100% of strain BR1, $n = 1$), respectively. In the same way, phage stock suspensions of prototypic laboratory strains, MS2 (GQ153927), CA (X03869), Q8 (AB971354) and SP (X07489) belonging to GGI, GGII, GGIII and GGIV, respectively, were carried out.

Production of phage stock suspensions was achieved by growing host bacteria *Escherichia coli* K-12 Hfr (CIP 104130) to the exponential growth phase and subsequent inoculation with the respective phages according to the standard procedure ISO 10705-1 (2001), without the chloroform step. After production, the phage suspensions were centrifuged at 3000g for 20 min to separate bacteria from bacteriophage particles. The supernatant was decontaminated by successive filtrations through sterile membrane filters (first 0.8 μ m then 0.22 μ m, Millipore). The initial concentrations of phage stocks were estimated at about 10^{11} PFU/mL. All phage stocks were stored at 4 °C until use.

2.2.4. Bacteriophage genogroup quantification using a two-step RT-qPCR

First, RNA extraction was done by the addition of the NucleiSENS® Lysis buffer (BioMerieux, France) (sample/lysis buffer ratio = 0.5). The RNA extraction was performed using the NucleiSENS® Magnetic Extraction kit (BioMerieux, France). The elution step was carried out in 100 μ L of elution buffer and extracted nucleic acids were stored at -80 °C until detection by RT-qPCR.

Then, genogroup quantification was performed by the RT-qPCR method developed by Ogorzaly and Gantzer (2006) on a ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, France). Two modifications were brought to this method with the use of the TaqMan® Environmental MasterMix 2.0 (Applied Biosystems®) in a final volume of 25 μ L. Construction of standard curves with target genomic sequences of each genogroup was developed to determine RNA genomic concentrations (Fauvel et al., 2016). A detection limit of 10 genome copies per

Table 1

Physical parameters and F-specific RNA bacteriophage (FRNAPH) concentration of the four surface water samples collected under different hydro-climatological conditions.

	Sample #1	Sample #2	Sample #3	Sample #4
Sampling date	02/29/2016	10/07/2014	03/02/2015	03/03/2015
Flow rate (m ³ /s)	4.0	4.9	19.5	6.0
Hydrological phases	Low flow	Rising phase	Peak of rainfall-runoff event	Recession phase
Total rainfall ^a (mm)	0	59.8	16.1	16.1
Antecedent rainfall ^b (mm)	0	3.8	15.2	20.5
Turbidity (NTU)	11.2	93.6	457	56.7
FRNAPH concentration (log ₁₀ PFU/100 mL)	3.4	3.2	3.8	3.2

^a On the total duration of the event.

^b 5 days prior the event.

RT-qPCR reaction was determined for the four genogroups. A negative extraction control as well as negative and positive RT-qPCR controls were incorporated into each analysis.

2.3. Partitioning behavior of FRNAPHs in surface water

Surface water samples were collected on four occasions under different water flow rates and turbidities. Each sample represented a particular hydro-climatological condition (Table 1). Daily rainfall data were provided by the "Administration des Services Techniques de l'Agriculture" (ASTA, <http://www.agrimeteo.lu>) whereas the water flow rate of the Alzette River was provided by the "Administration de la Gestion de l'Eau". The low flow condition corresponded to a 5-days period where the water flow rate was stable. The rising and recession phases were respectively the increase and decrease of the water flow rate during an event while the peak of rainfall-runoff event was the highest point of the water discharge. These various conditions were used to study the degree to which bacteriophages in the water column are associated with settling particles. Turbidity was measured in nephelometric units (NTU) with a portable turbidimeter (HACH 2100Q). The fraction of phages associated with settling particles in water was estimated through the use of a centrifugation technique. Three successive centrifugations were performed. A first centrifugation at 3000g (Centrifuge 5810R, Eppendorf) for 10 min at 4 °C was carried out on raw surface water; a second was done at 10,000g (Centrifuge 5810R, Eppendorf) for 10 min at 4 °C on the supernatant resulting from the 3000g centrifugation. An ultracentrifugation of 235,000g for 90 min at 4 °C (L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Optima™) was finally performed on the supernatant from the 10,000g centrifugation. At each step, the entire pellet was resuspended in PBS (0.01 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich), and part of the supernatant was stored at 4 °C in view of infectivity assays. Results were expressed in PFU per 100 mL.

2.4. Attachment of bacteriophages to solid matter in batch experiments

Batch experiments were performed in two distinct media i.e. phosphate buffered saline (PBS 0.01 M, pH 7.4, Sigma-Aldrich) and raw river water, using laboratory and/or environmental phage strains. Experiments in river water were performed for studying attachment and inactivation behavior whereas experiments in PBS were carried out for comparing behavior of distinct phage strains belonging to the same genogroup. Phage suspensions were added to sterile glass bottles of 100 mL containing 5 g of sediment collected during low flow condition and 10 mL of liquid media (solution/solid ratio = 2.0) to obtain a final concentration of 2×10^4 PFU/mL. This concentration was chosen high enough to neglect phages naturally occurred in surface water and sediment but not too high to avoid overloading the system. At the beginning of the experiment ($t = 0$), the theoretical concentration of each infectious phage suspension was evaluated by quantification of the phage stocks. The experiment starting point was set immediately after the contact of phages with sediment (corresponding to $t = 1$ min). Solid matter was constituted of fresh sediment and was a complex environmental matrix. The four phage stocks were used independently. Sediment-phages suspension was shaken at 250 rpm at 4 °C (orbital shaker, KS 260 basic IKA®) for different time intervals (1, 30, 60, 120 and 180 min). Mixed suspensions were centrifuged at 10,000g for 10 min for removing solid particles. The supernatant was then analyzed to determine remaining FRNAPH concentrations using infectivity and/or molecular biology assays. In parallel, a control batch receiving phage suspensions without sediment was submitted to the same procedure in order to monitor bacteriophage inactivation and sorption to the container surface.

RT-qPCR inhibition was evaluated on negative controls by spiking a known amount of transcribed MS2 plasmids into extracted samples. No

inhibition was observed for tested controls except for two samples which presented an inhibition of 2.5% and 69.7%.

3. Results

3.1. Partitioning of F-specific RNA bacteriophages in surface water

Surface water was collected under different hydro-climatological conditions including low flow period as well as rainfall-runoff events at the selected sampling point in the Alzette River. Environmental conditions and water quality parameters of each sample are presented in Table 1. Besides the rising and the recession phases, two extreme situations were sampled: the prolonged low flow period and the peak of a heavy rainfall-runoff event. Between both situations, turbidity and flow rate increased about 40 and 5 times, respectively, and phage concentration increased by 0.4 log₁₀.

Each of the four samples was analyzed by successive centrifugations at varying rotational speeds in order to determine the partitioning of infectious FRNAPHs in the water column. Fig. 1 represents the percentage of viral and suspended particles removed from the water phase (supernatant) after each centrifugation step. Despite water samples with different initial turbidities, the loss of suspended particles was equivalent. The major particle removal (from 86.7% to 96.9%) occurred at the first centrifugation step (3000g). In contrast, the dynamics of phage particle settlement varied depending on the hydro-climatologic conditions. Huge differences were especially noticed for the two extreme conditions (low flow period vs peak of rainfall). After the first centrifugation at 3000g, 54.9% of phages were removed from the supernatant for the peak of rainfall compared to 15.5% for the low flow condition. This difference was even higher after a centrifugation at 10,000g (approx. 80% vs about 20%), while the settlement of suspended solids reaching $97.7 \pm 2.5\%$ for both conditions. Concerning the two other conditions, the results obtained for the rising phase were similar to those of the low flow condition, whereas withdrawal of phages from the supernatant was observed for the water level recession phase. Concerning the third step, i.e. ultracentrifugation, no difference was observed with an equivalent loss of phages in the supernatant. The concentration of infectious FRNAPHs determined in the pellets supported all these results (data not shown). This difference of sedimentation behavior in relation to hydro-climatological conditions suggests that the status of infectious FRNAPHs (free or associated with settling particles) varies in the water column.

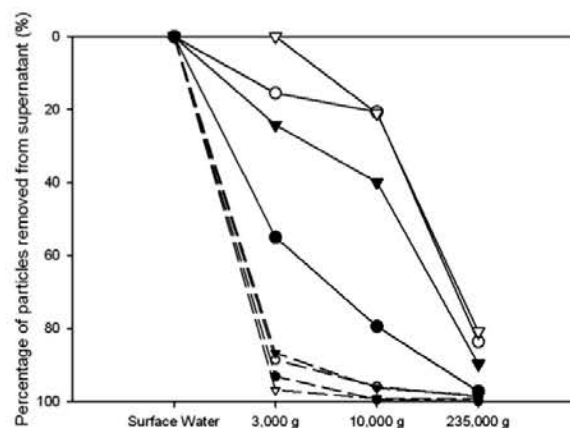


Fig. 1. Percentage of infectious F-specific RNA bacteriophages (solid line) and suspended particles (dashed line) removed from surface water after successive centrifugation steps (from surface water at 3000g, supernatant from 3000g at 10,000g and supernatant from 10,000g at 235,000g) according to the four distinct hydro-climatological conditions (○ low flow, △ rising phase, ● peak of rainfall-runoff event, ▼ recession phase).

3.2. Influence of viral genogroup on the attachment of FRNAPH to sediment in river water

Fig. 2 presents results of batch experiment where environmental FRNAPH strains were put in contact in river water with or without sediment. Infectious FRNAPHs and total phage particles were quantified during the whole experiment through both an infectivity assay (PFU) and molecular tool quantification (genome copies). Inactivation (loss of PFU only) and/or attachment (loss of both PFU and genome copies) were the main causes of variation of the FRNAPH concentration. The inactivation level was estimated as the loss of PFU in absence of sediment whereas the attachment rate was calculated by comparing total phage numbers (genome copies) in the absence and presence of sediment at a same time point.

Strain DL16 (GGI) underwent neither inactivation nor attachment in reason of a stable concentration of infectious and total particles during the whole stirring period (180 min) in absence or presence of sediment. The observations were contrasting for the others tested strains from GGs II, III and IV.

In absence of sediment, the persistence of strain DL20 (GGII) was demonstrated with a constant concentration of infectious particles and genome copies during the whole experiment. In presence of sediment, the behavior of this strain was modified with a rapid reduction of $1.3 \log_{10}$ of total particles after 30 min and $1.4 \log_{10}$ of infectious phages at the end of the experiment. The stability of strain DL20 in absence of sediment supports the hypothesis that, in presence of solids,

the reduction of total phage particle concentration was due to attachment to sediment (attachment rate of $1.3 \log_{10}$ at 30 min). Moreover, reduction kinetics in presence of sediment seems to be different between the total and infectious particles (Spearman correlation test, $r = 0.714$, p -value = 0.136). A fast reduction was observed for total particles compared to a slower reduction over the entire time of the experiment for the infectious DL20 particles.

For GGIII, a decrease of 0.9 and $1.8 \log_{10}$ was measured at the end of the experiment for total and infectious strain HL4-9 particles, respectively, in absence of sediment. Attachment of phages to the glass container inner surfaces, degradation of viral RNA and inactivation of infectious particles could explain these reductions. In presence of sediment, an instantaneous reduction of $2.1 \log_{10}$ and $1.6 \log_{10}$ occurred for total and infectious phages and continued to reach a maximal reduction of $2.8 \log_{10}$ for both. The higher reduction of total phage particle concentration in presence of sediment than in absence of sediment at a same time ($2.7 \log_{10}$ compared to $0.8 \log_{10}$ at 30 min, respectively) confirmed the attachment of strain HL4-9 to sediment (attachment rate of $1.9 \log_{10}$ at 30 min). Furthermore, reduction kinetics in presence of sediment again appears to be faster for total particles with a maximum reduction after 30 min whereas reduction continued up to 120 min for infectious phages (Spearman correlation test, $r = 0.429$, p -value = 0.419).

For the GGIV strain, a decrease of total and infectious particles was shown in the absence and in presence of sediment. As for the GGIII strain, viral RNA degradation and/or attachment to the container were

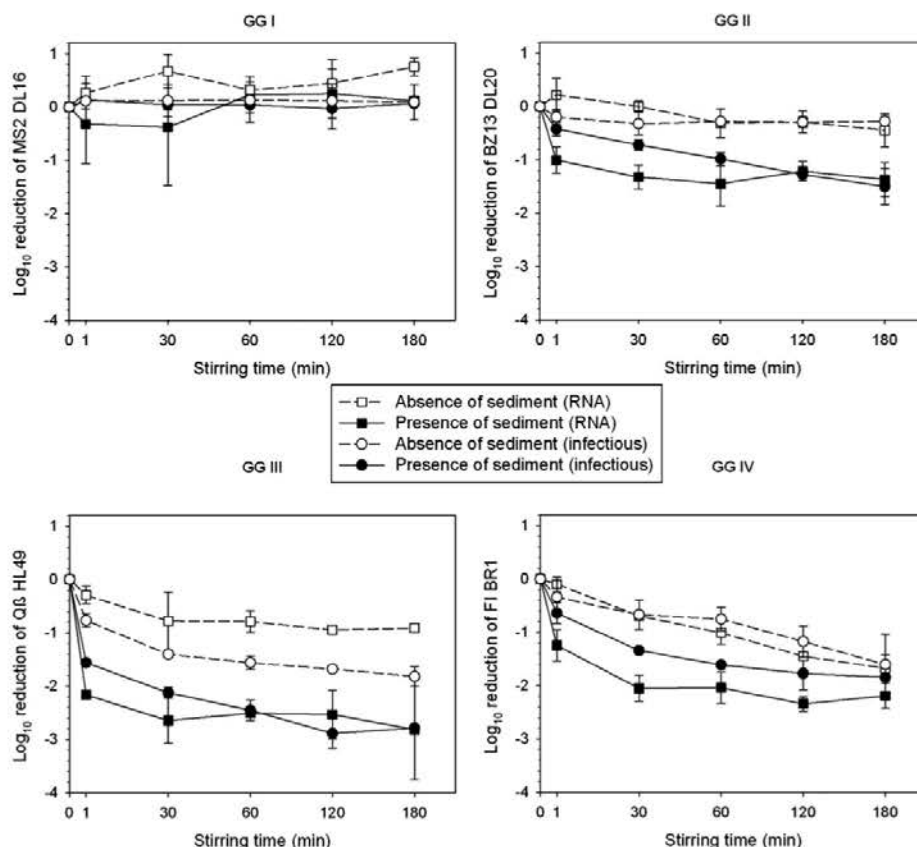


Fig. 2. $\log_{10}$ reduction of infectious particles (circle symbol) and genome (square symbol) of F-specific RNA bacteriophage strains in surface water upon stirring in absence (white symbol) or presence (black symbol) of sediment. The starting concentration of 2.0×10^4 PFU/mL was the same whatever the infectious strain genogroup whereas this one varied for total phage particles (4.3×10^8 gc/mL for MS2 DL16, 2.4×10^6 gc/mL for BZ13 DL20, 4.6×10^4 gc/mL for Qβ HL4-9 and 6.8×10^5 for FI BR1). Vertical bars indicate standard deviation from triplicate experiments.

challenged in absence of solid whereas attachment to solid matter occurred in presence of sediment (reduction of $2.0 \log_{10}$ of total particles after 30 min in presence of sediment compared to $0.7 \log_{10}$ in absence of sediment: $1.3 \log_{10}$ attachment rate at 30 min). Nevertheless, the difference of reduction between total and infectious BR1 particles seems to be less obvious (Spearman correlation test, $r = 0.886$, p -value = 0.033).

To conclude, a distinct behavior of the four FRNAPH strains was demonstrated with no attachment effect for the strain belonging to GGI, whereas attachment and/or inactivation were for the other ones. A difference of attachment kinetics was also suspected between total and infectious particles for the GGII and GGIII strains with reduction kinetics slower for infectious phages than total viral particles.

3.3. Influence of FRNAPH viral strain further to contact to sediment

In order to complete the investigation on the attachment of FRNAPH to sediment, the dynamic of two strains belonging to the same genogroup was compared in PBS in presence and absence of sediment, using only infectivity assay (Fig. S1).

No reduction occurred for both strains belonging to GGI and GGII, displaying therefore a similar behavior, whereas a decrease of infectious FRNAPH concentration was measured for both strains of GGIII and GGIV. For GGIII, higher reduction rates were consistently observed for the environmental strain compared to the lab strain (Wilcoxon signed rank test, $p < 0.001$), with a final reduction rate differences at 180 min of $0.5 \log_{10}$ (without sediment) and $0.9 \log_{10}$ (with sediment). For GGIV, a difference of reduction between the environmental strain and the lab strain occurred exclusively in absence of sediment (Wilcoxon signed rank test, $p = 0.007$), with a final reduction rate differences at 180 min of $1.8 \log_{10}$. In presence of sediment, both strains of GGIV present a similar behavior (Wilcoxon signed rank test, $p = 0.135$). Then, despite different intensity of reduction in absence or presence of sediment for strains of GGIII and GGIV, a similar dynamic was observed for strains within a same genogroup. It was however not possible to clearly distinct the inactivation to attachment dynamics since only infectivity was performed during the PBS experiment.

A variation in the BZ13 DL20 (environmental GGII strain) strain behavior was observed between experiments performed in PBS and in river water, reflecting a media effect on the strain dynamic. In presence of sediment, no reduction of infectious strain BZ13 DL20 was observed in PBS (Fig. S1) whereas $1.4 \log_{10}$ of reduction was measured in surface water (Fig. 2). To confirm the media-dependent behavior for GG II strains, the fate of the GA strain was investigated in river water with and without sediment (Fig. S2). Once again, BZ13 and GA strains exhibited similar persistence and reduction profiles in a given media.

3.4. F-specific RNA bacteriophage diversity and distribution in surface water and sediment

Infectious FRNAPHs were quantified from river water and sediment samples collected every month. The mean concentration was estimated to be $2.8 \pm 0.7 \log_{10}$ PFU/100 mL of surface water ($n = 19$) and $1.4 \pm 0.7 \log_{10}$ PFU/g of dry sediment ($n = 15$). One hundred sixty-six individual plaques of infectious FRNAPHs were characterized from surface water and sediment samples. Fig. 3 shows the distribution of the four genogroups in both compartments. The distribution of infectious FRNAPH genogroups in water was different to that observed in sediment, especially for GGII (Pearson's chi-squared test, p -value = 0.013) and GGIII (Pearson's chi-squared test, p -value = 0.005).

4. Discussion

The objective of this study was to provide new elements in the understanding of viral particle distribution in a dynamic river system. To this purpose, detection and distribution of infectious FRNAPHs were assessed in surface water and in sediments of the Alzette River. In parallel, two distinct laboratory experiments were carried out to clarify the solid-viral particle interactions and to forecast transfer of phages from the water column to sediment.

The environmental spread of infectious FRNAPH particles was confirmed by their presence in surface water and in sediment compartments of the study area. Detection of infectious FRNAPHs in both compartments was comparable to the results of previous studies (Lucena et al., 2003; Ogorzaly et al., 2009; Skrabber et al., 2009). In the present work, genogroup determination was carried out by whole genome sequencing directly from individual infectious phage plaques. Among the 166 plaques isolated, GGII isolates were proportionally the most abundant in both surface water and sediment compartments. FRNAPHs are often proposed as microbial source tracking tracers to distinguish human (GGII and GGIII) from non-human (GGI and GGIV) fecal contamination sources (Lee et al., 2011; Lee et al., 2009). Abundance of GGII in both compartments confirms the anthropogenic character of the fecal pollution sources found in the Alzette River, with a WWTP at <2 km upstream from the sampling site. This is also confirmed by direct analysis of water samples by RT-qPCR (Fauvel et al., 2016). The repartition of GGs was differed in both, water and sediment compartments, especially for GGII and GGIII. Infectious FRNAPHs belonging to GGII were more present in sediment than in surface water, which was the opposite for GGIII phages. This difference of distribution might be elucidated based on the results obtained from the laboratory batch experiments discussed hereafter.

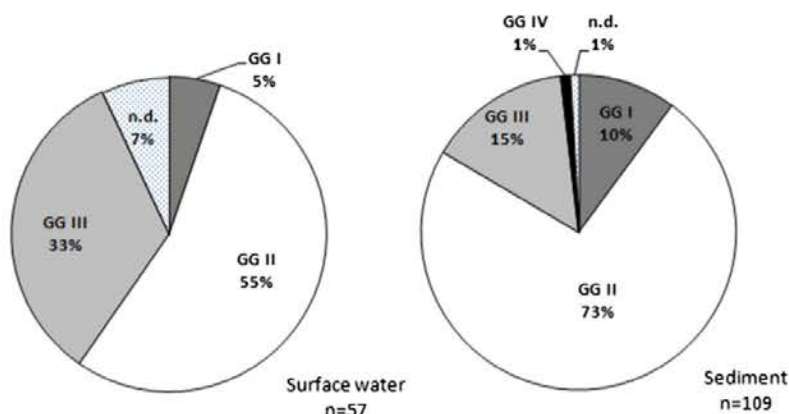


Fig. 3. Distribution of the four genogroups (GGs) of F-specific RNA bacteriophages in surface water and sediment samples. n.d., not detected (viral particle not assigned to a FRNAPH or failure of genome sequencing).

The interactions of FRNAPHs with their direct environment are mainly controlled by their surface properties. In order to detect any variation of behavior of different viral particles, four strains of FRNAPHs, directly isolated from sediment, were used in batch experiments. Results obtained suggest a difference of behavior for the four strains tested in terms of inactivation and attachment under experimental conditions (surface water at 4 °C and shaking at 250 rpm). On the one hand, inactivation of bacteriophage strain DL16 (GGI) and strain DL20 (GGII) were much less important than strain HL4-9 (GGIII) and strain BR1 (GGIV) in absence of sediment. The greater survival of GGI and GGII compared to GGIII and GGIV was previously reported (Muniesa et al., 2009; Schaper et al., 2002). A variability in the survival of strains within a same genogroup still remains in debate with some contradictory data reported (Brion et al., 2002; Long and Sobsey, 2004). Results of batch experiments performed in PBS with prototypic laboratory and environmental phages present a similar persistence for strains belonging to GGI and GGII, whereas higher inactivation rates were suspected for the GGIII and GGIV environmental strains. Even if results obtained by infectivity assay did not allow us to clearly conclude in favor of phage inactivation, the reduction rates observed were always stronger for environmental strains of GGIII and GGIV than for laboratory strains. All these results confirm the difficulty to establish original proportions of infectious FRNAPH genogroups in environment by reason of their survival difference, hindering accurate conclusions in a microbial source tracking framework.

On the other hand, the variation of the attachment behavior of infectious FRNAPHs to a surface was also documented (Armanious et al., 2015; Dika et al., 2013; Hébrant et al., 2014). In our batch experiments performed in river water, sorption to complex environmental solid matrix was detectable for strains belonging to GGII, GGIII and GGIV (BZ13 DL20 and GA, Q8 HL4-9 and FI BR1, respectively). Thus, despite the attachment properties of infectious HL4-9 and BR1 strains (GGIII and GGIV, respectively) highlighted, their instability and low environmental persistence can explain their sparse presence in sediment. Furthermore, the predominance of GGII in sediment can be explained by (i) the inhomogeneous distribution of the four genogroups in surface water in favor of GGII, (ii) the persistence of infectious DL20 strain (GGII) observed in the batch experiment, and (iii) its capability to adsorb to solid matter.

Results of batch experiments also inform on the attachment kinetics of strains able to sorb to sediment. For all of them (DL20 (GGII), HL4-9 (GGIII) and BR1 (GGIV) strains), attachment occurred mainly in the early stages of the stirring time with a rate of $1.3 \log_{10}$, $1.9 \log_{10}$ and $1.3 \log_{10}$ from the first 30 min, respectively. The major part of reduction was observed in the first minute of experiment. This fast attachment of viral particles to a surface was already underlined elsewhere (Gantzer et al., 1994). Furthermore, some discrepancies between the three strains tested were observed with a variation in the attachment rates. This difference of attachment rate pointed out surface properties of FRNAPHs as one of the factors responsible for distinct behaviors in their attachment to solid matter. According to our results, the variability in attachment capacities seems to be mainly influenced by the viral genogroup than by the strains. Hébrant et al. (2014) reported also a difference of attachment rate for two FRNAPH strains belonging to GGII and GGIII. In contrast to our results, the authors present an attachment rate of bacteriophage Q β (GGIII) less effective than bacteriophage GA (GGII) on biofilms under hydrostatic conditions and a same attachment rate under hydrodynamic conditions. These results highlighted that, besides the surface properties of viral particles, sorbent matrix plays an important role in the phage attachment dynamic. Moreover, the difference of attachment profile observed in our study for GGII strains in surface water and in PBS demonstrated also the influence of surrounding conditions in phage-solid interactions.

In parallel, different kinetic of reduction was observed in presence of sediment between infectious and total phage particles from a same strain. This was particularly the case for GGII where the reduction kinetics of infectious strain DL20 was much lower than total phage particles.

Assuming that this reduction was not due to inactivation of infectious DL20 particles upon contact with the sediment, this difference of reduction, for a same sorbent, under the same conditions, revealed a possible variation of surface properties between infectious and non-infectious phages leading to a different kinetic attachment. The major role of the outer capsid surface (amino-acids) in virus-solid interactions was demonstrated by the use of virus-like particles (Armanious et al., 2015), but no study has already explored surface properties of non-infectious FRNAPH in attachment profiles. Recently, Brié et al. highlighted different surface properties of non-infectious and infectious MS2 phages (GGI) further to exposition to high temperatures (Brié et al., 2016).

The main hypothesis about presence of viruses in sediment was a viral particle settling controlled by their association with solid particles (Rao et al., 1986). Previous studies indicate that viral particles appeared to be mainly free or associated with particles $<0.25 \mu\text{m}$ in diameter in the surface water (Payment et al., 1988). Results obtained from our centrifugation experiments suggest that the status of viral particles (free or associated with settling particles) varied according to hydro-climatological conditions. In periods of low flow and at the rising phase of a rainfall-runoff event, results indicated that viral particles in surface water are free or associated with small particles remaining in suspension in the water column. Under these conditions, the transfer of viral particles to sediment appears as improbable. Nevertheless, at the peak of a rainfall-runoff event but also to a certain extent during the recession limb, infectious FRNAPHs appear to be associated with or included in solid particles with $>50\%$ and 24% of infectious FRNAPH lost in supernatant after the first centrifugation, respectively. From these results, association of FRNAPHs with settling particles during last stages of rainfall-runoff events could facilitate the transfer of viral particles from the water column to sediment. The concept of variations in partitioning under the influence of hydro-climatological conditions was broached in other studies (Characklis et al., 2005). Krometis et al. (2007) demonstrated that settling concentrations of microorganisms, such as enterococci or *Clostridium perfringens*, were generally highest in the period briefly after start of the storm. An exception occurred for total coliphages (merging of FRNAPHs and somatic coliphages), which exhibited a lower and constant rate of association regardless of hydro-climatological events. This last result is not directly comparable to the results in the present study because of the difference of phages studied. Nevertheless, it appears that most microorganisms seem to be more favorably associated with solid particles during a rainfall-runoff event than during low flow conditions.

The spatio-temporal dynamics of FRNAPHs during rainfall-runoff events were previously investigated in the studied area (Fauvel et al., 2016). It was demonstrated that the resuspension of sediment was one of the possible origins of viral pollution during rainfall-runoff events. A high input of infectious GGII bacteriophages was linked to the release of phages from the riverbed. In the present study, the presence and abundance of GGII in sediment was confirmed, and the persistence and attachment capacity of a field-collected GGII strain was also demonstrated. From all these results, sediment of the studied area constitutes a reservoir of GGII, which can be released into the water column through the action of rainfall.

In order to explain the partitioning variation of infectious FRNAPHs in collected samples, the origin of suspended particles in the water column was determined by the use of a hydrological approach. If the origin is different, we can suppose that the nature of the suspended particles would also differ, favoring or avoiding infectious FRNAPH attachment. Resuspension of sediment and/or surface runoff are both main possible origins of suspended particles in the water column. The analysis of antecedent rainfall five days prior to the rainfall-runoff event allowed us to make this distinction. For the sample collected during the rising phase of the rainfall-runoff event, the suspended particles could come from available sediment in the bottom of the riverbed. Its accumulation was possible due to low precipitation (only 3.8 mm) prior to the event. On the contrary, the surface runoff is the preferential origin of suspended

particles present for the samples collected at the peak and at the last phase of a rainfall-runoff event. The frequency of antecedent precipitation (15.2 mm and 20.5 mm, respectively) induced a saturation of the catchment in water. The distinct origins of suspended solids in the analyzed samples (sediment resuspension or surface runoff) represent one possible explanation of the variation of partitioning of infectious FRNAPHs.

This study was conducted in a river mainly polluted by human fecal pollution (abundance of GGII). It will be interesting to study the dynamics of FRNAPHs in a river with less anthropogenic pollution in order to confirm the behavior of genogroups in the water cycle and the environment. For example, the absence of GGI in sediment and the input of GGI from resuspended sediment during rainfall-runoff events could be tested in a river where GGI is the major genogroup.

5. Conclusions

Interactions of F-specific RNA bacteriophages with solid particles were demonstrated in both freshwater and sediment compartments. In contrast to data previously published, viral particles are not systematically free or associated with small solid particles in surface water. The results reported in this work underline a variation of the free or bound status of infectious FRNAPHs depending on the hydro-climatological conditions. The distinct origins of suspended solid particles (sediment or surface runoff) and consequently the nature of solid particles in the water column can be one explanation of the partitioning variation of infectious phages. The transfer of viral particles from the water column to sediment could be facilitated after a rainfall-runoff event, while the water flow rate is returning to normal conditions. Association of infectious FRNAPHs with sediment was also demonstrated as well as the influence of viral surface properties and surrounding conditions on their attachment to sediment. In addition, a difference in the attachment kinetics to sediment between infectious and total viral particles was highlighted. These laboratory results match the *in situ* observations in water and sediment compartments, and bring new elements towards the understanding of the distribution of FRNAPHs in a river system under the influence of varying hydrological fluxes.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.115>.

Funding information

This work was funded by an AFR grant from the National Research Fund (AFR code 6035344), Luxembourg. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Acknowledgements

The authors would like to thank Delphine Collard and Cécile Walczak from the LIST for their excellent technical assistance in sampling campaigns and lab experiments. We also thank Dr. Christian Penny (LIST) for the proficient proofreading of the final manuscript.

References

- Amanious, A., Aeppli, M., Jacak, R., Refardt, D., Sigstam, T., Kohn, T., Sander, M., 2015. Viruses at solid-water interfaces: a systematic assessment of interactions driving adsorption. *Environ. Sci. Technol.* 50, 732–743. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b04644>.
- Bellou, M.I., Syngouna, V.J., Tselepi, M.A., Kokkinos, P.A., Paparrodopoulos, S.C., Vantarakis, A., Chrysikopoulos, C.V., 2015. Interaction of human adenoviruses and coliphages with kaolinite and bentonite. *Sci. Total Environ.* 517, 86–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.036>.
- Bitton, G., 1975. Adsorption of viruses onto surfaces in soil and water. *Water Res.* 9, 473–484. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(75\)90071-8](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(75)90071-8).
- Bosch, A., Pintó, R.M., Abad, F.X., 2003. Survival and transport of enteric viruses in the environment. *Viruses in Foods*, pp. 151–188. http://dx.doi.org/10.1007/0-387-29251-9_6.
- Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C., 2012. Removal of MS2, Q β and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Res.* 46, 2651–2664. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.020>.
- Brié, A., Bertrand, I., Meo, M., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. The effect of heat on the physicochemical properties of bacteriophage MS2. *Food and Environ. Virol.* <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-016-9248-2>.
- Brion, G.M., Meschke, J.S., Sobsey, M.D., 2002. F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Res.* 36, 2419–2425. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00547-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00547-4).
- Characklis, G.W., Dilts, M.J., Simmons, O.D., Likirdopulos, C.A., Krometis, L.A.H., Sobsey, M.D., 2005. Microbial partitioning to settleable particles in stormwater. *Water Res.* 39, 1773–1782. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.004>.
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Trucco, A., Serresi, M., Vanucci, S., 2001. Determination of virus abundance in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1384–1387. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.3.1384-1387.2001>.
- De Flora, S., De Renzi, G.P., Badolati, G., 1975. Detection of animal viruses in coastal seawater and sediments. *Appl. Microbiol.* 30, 472–475.
- Deboosere, N., Pinon, A., Caudrelier, Y., Delobel, A., Merle, G., Perelle, S., Temmam, S., Loutreuil, J., Morin, T., Estienne, M., Belliot, G., Pothier, P., Gantzer, C., Viallet, M., 2012. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiol.* 32, 48–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.007>.
- Dika, C., Ly-Chatain, M.H., Francius, G., Duval, J.F.L., Gantzer, C., 2013. Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 435, 178–187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.045>.
- Fauvel, B., Cauchie, H.-M., Gantzer, C., Ogorzal, L., 2016. Contribution of hydrological data to the understanding of the spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events. *Water Res.* 94, 328–340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.057>.
- Gantzer, C., Quignon, F., Schwartzbrod, L., 1994. Poliovirus-1 adsorption onto and desorption from montmorillonite in seawater. *Survival of the adsorbed virus. Environ. Technol.* 15, 271–278. <http://dx.doi.org/10.1080/09593399409385428>.
- Gerba, C.P., Stagg, C.H., Abadie, M.G., 1978. Characterization of sewage solid-associated viruses and behavior in natural waters. *Water Res.* 12, 805–812. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90031-3](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(78)90031-3).
- Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M., 2015. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 520, 32–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.034>.
- Hargreaves, K.R., Anderson, N.J., Clokie, M.R.J., 2013. Recovery of viable cyanophages from the sediments of a eutrophic lake at decadal timescales. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 450–456. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12005>.
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., Gantzer, C., 2015. Occurrence of and sequence variation among F-specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6505–6515. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01905-15>.
- Hébrant, M., Pelleieux, S., Mathieu, L., Skali-Lami, S., Gantzer, C., Bertrand, I., Block, J.-C., 2014. Distinct adsorption kinetics of Q β and GA bacteriophages on drinking water biofilms. *Adsorption* 20, 823–828. <http://dx.doi.org/10.1007/s10450-014-9624-x>.
- Hejkal, T.W., Wellings, F.M., Lewis, A.L., LaRock, P.A., 1981. Distribution of viruses associated with particles in wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 628–634.
- Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M., Andréoletti, L., 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res.* 37, 4703–4710. [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00439-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00439-1).
- Jakubowska-Deredas, M., Jurczak-Kurek, A., Richert, M., Łoś, M., Narajczyk, M., Wróbel, B., 2012. Diversity of tailed phages in Baltic Sea sediment: large number of siphoviruses with extremely long tails. *Res. Microbiol.* 163, 292–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2012.02.002>.
- Krometis, L.A.H., Characklis, G.W., Simmons, O.D., Dilts, M.J., Likirdopulos, C.A., Sobsey, M.D., 2007. Intra-storm variability in microbial partitioning and microbial loading rates. *Water Res.* 41, 506–516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.029>.
- 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, 2769–2777. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.007>.
- Lee, J.E., Lim, M.Y., Kim, S.Y., Lee, S., Lee, H., Oh, H.-M., Hur, H.-G., Ko, G., 2009. Molecular characterization of bacteriophages for microbial source tracking in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7107–7114. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00464-09>.
- Lee, J.E., Lee, H., Cho, Y.-H., Hur, H.-G., Ko, G., 2011. F + RNA coliphage-based microbial source tracking in water resources of South Korea. *Sci. Total Environ.* 412–413, 127–131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.061>.
- Leroy, M., Prigent, M., Dutertre, M., Confalonieri, F., Dubow, M., 2008. Bacteriophage morphotype and genome diversity in Seine River sediment. *Freshw. Biol.* 53, 1176–1185. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.01985.x>.
- Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M., 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1453–1461. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.3.1453-1461.2005>.
- Long, S.C., Sobsey, M.D., 2004. A comparison of the survival of F + RNA and F + DNA coliphages in lake water microcosms. *J. Water Health* 2, 15–22.
- Lucena, F., Méndez, X., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Guerrero, A., Cárdenas, M., Gantzer, C., Schwartzbrod, L., Skrabar, S., Jofre, J., 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1748–1752. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x>.

- Maranger, R., Bird, D.F., 1996. High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Québec. *Microb. Ecol.* 31, 141–151. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00167860>.
- Metcalf, T.G., Rao, V.C., Melnick, J.L., 1984. Solid-associated viruses in a polluted estuary, enteric viruses in water. Karger, Basel <http://dx.doi.org/10.1159/000409125>.
- Moore, B.E.E., Sagik, B.P.P., Jr., J.F., M., J.F.M., 1975. Viral association with suspended solids. *Water Res.* 9, 197–203. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(75\)90009-3](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(75)90009-3).
- Muniesa, M., Payan, A., Moce-Llivina, L., Blanch, A.R., Jofre, J., 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Res.* 43, 1559–1564. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.038>.
- Ogorzal, L., Gantzer, C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *J. Virol. Methods* 138, 131–139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004>.
- Ogorzal, 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, 1257–1264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.011>.
- Payment, P., Morin, E., Trudel, M., 1988. Coliphages and enteric viruses in the particulate phase of river water. *Can. J. Microbiol.* 34, 907–910.
- Pusch, D., Oh, D.-Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., Röske, I., Schreier, E., 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol.* 150, 929–947. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-004-0467-8>.
- Rao, V.C., Seidel, K.M., Goyal, S.M., Metcalf, T.G., Melnick, J.L., 1984. Isolation of enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 404–409.
- Rao, V.C., Metcalf, T.G., Melnick, J.L., 1986. Human viruses in sediments, sludges, and soils. *Bull. World Health Organ.* 64, 1–14.
- Schaper, M., Duran, A.E., Jofre, J., 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, 3702–3707. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.8.3702-3707.2002>.
- Skraber, S., Schijven, J., Italiaander, R., Husman, A.M.d.R., 2009. Accumulation of enteric bacteriophage in fresh water sediments. *J. Water Health* 7, 372–379. <http://dx.doi.org/10.2166/wh.2009.098>.
- Smith, E.M., Gerba, C.P., Melnick, J.L., 1978. Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 685–689.
- Syngouna, V.I., Chrysikopoulos, C.V., 2013. Cotransport of clay colloids and viruses in water saturated porous media. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 416, 56–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.10.018>.
- Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Höller, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., López-Pila, J., Muscillo, M., Nascimento, M.S.J., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szezyk, R., Wyer, M., 2011. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res.* 45, 1025–1038. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.015>.

En résumé, les interactions des bactériophages ARN F-spécifiques avec les particules solides de l'environnement ont été démontrés à la fois dans l'eau de surface et dans le sédiment. Les résultats rapportés dans ce chapitre soulignent premièrement, une variation du statut libres ou associés des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux vis-à-vis des particules pouvant potentiellement sédimenter, en fonction des conditions hydro-climatologiques. Le transfert des particules virales de la colonne d'eau au sédiment pourrait donc avoir lieu après une crue lorsque les bactériophages ARN F-spécifiques semblent être associés aux particules solides et que le débit de la rivière permet une sédimentation. L'association des bactériophages des génogroupes II, III et IV avec le sédiment a également été démontrée dans une seconde partie de l'étude. Ces résultats de laboratoire coïncident avec la distribution in situ des génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques détectés dans l'eau de surface et le sédiment. L'ensemble de ces analyses permettent donc d'apporter de nouvelles informations concernant la distribution des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'Alzette.

Jusqu'à présent l'analyse distincte des quatre génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière a permis de souligner l'influence des propriétés de surface de ces particules virales dans leur dynamique environnementale. A présent, il semble pertinent d'analyser plus particulièrement le sédiment, principal support pour l'association des particules virales dans la rivière. Le sixième et dernier chapitre traitera donc l'influence du sédiment comme autre principale variable pouvant affecter la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques dans le système hydrique.

*Chapitre 6 : Dynamique des
bactériophages ARN F-spécifiques
infectieux en fonction des propriétés et
caractéristiques du sédiment*

1 Introduction

Dans la littérature, de nombreuses études ont montré la présence de virus entériques dans du sédiment de rivière (Leroy et al., 2008; Skraber et al., 2009; Staggemeier et al., 2015). Cependant, la matrice environnementale analysée est potentiellement différente de celle collectée dans notre étude puisque selon les articles, le mode de prélèvement du sédiment est différent. Par exemple, l'utilisation d'une drague Ekman permet de collecter du sédiment plus en profondeur (jusqu'à plusieurs mètres) (LaBelle and Gerba, 1979; Skraber et al., 2009), alors que nous nous sommes intéressés qu'aux premiers centimètres de sédiment. Il apparaît donc indispensable, avant d'entamer ce dernier chapitre, de rappeler ce que représente le terme « sédiment » dans cette étude.

De manière générale, le sédiment constitue un dépôt qui provient de l'altération et la désagrégation de roches préexistantes. Ces dépôts sont ensuite transportés par les cours d'eau et finissent par se déposer sous l'effet gravitationnel. Dans cette étude, nous ne nous sommes uniquement intéressés qu'aux sédiments récents déposés au fond du lit de la rivière, fraction considérée ici comme facilement remobilisable lors d'événements hydro-climatologiques. Pour ce faire, un système d'aspiration a été développé pour collecter spécifiquement les premiers centimètres du fond du lit de la rivière (cf chapitre 2).

Le sédiment collecté constitue une matrice environnementale complexe pouvant avoir deux origines distinctes :

- une origine endogène qui provient de la production autochtone du milieu, *i.e.* l'altération du fond du lit de la rivière et l'apport supplémentaire de débris de macrophytes, microphytes ou autres micro-organismes.
- Une origine exogène qui provient du ruissellement des surfaces, des effluents ou de l'atmosphère. Cette origine peut être naturelle (érosion des sols, décomposition de la matière végétale, perturbations climatiques) ou anthropique (apport de matière en suspension ou de matière organique en raison des rejets agricoles et des stations d'épuration).

Dans la littérature, l'attachement des particules virales au sédiment a été évalué en fonction des conditions du milieu (force ionique, ions bivalents, pH) ainsi que des caractéristiques virales (différents types de virus étudiés) (Dowd et al., 1998; Wait and Sobsey, 1983). Plus spécifiquement, différents supports homogènes tels que la silice (Bales et al., 1993), les argiles (montmorillonite, kaolinite) (Lipson and Stotzky, 1983; Tong et al., 2012) ou le sable (Knappett et al., 2008) ont été étudiés. Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune étude n'a exploré l'attachement des particules virales en fonction des propriétés du sédiment naturel, matrice environnementale complexe, hétérogène, contenant à la fois du sable, des graviers, de l'argile, de la matière organique et d'autres composés.

Ainsi, l'objectif de ce dernier chapitre est d'apporter de nouvelles informations concernant la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques en fonction des propriétés et caractéristiques du sédiment.

Un article scientifique sera prochainement rédigé avec l'ensemble des résultats obtenus.

2 Matériels et méthodes

2.1 Echantillonnage du sédiment

Le prélèvement du sédiment s'est effectué au site 4 du tronçon de la rivière étudiée (Figure 21B) par l'intermédiaire d'un système de pompe à vide. Un quadrillage constitué de 9 points d'échantillonnage a été défini (Figure 38) et a permis le prélèvement de différents échantillons de sédiment à quatre dates différentes (Tableau 12). Une fois prélevés, les échantillons de sédiment ont été stockés une nuit à 4°C de manière à retirer l'excédent eau suite à la sédimentation de la matière. Des analyses ont ensuite été réalisées sur chaque échantillon de sédiment.

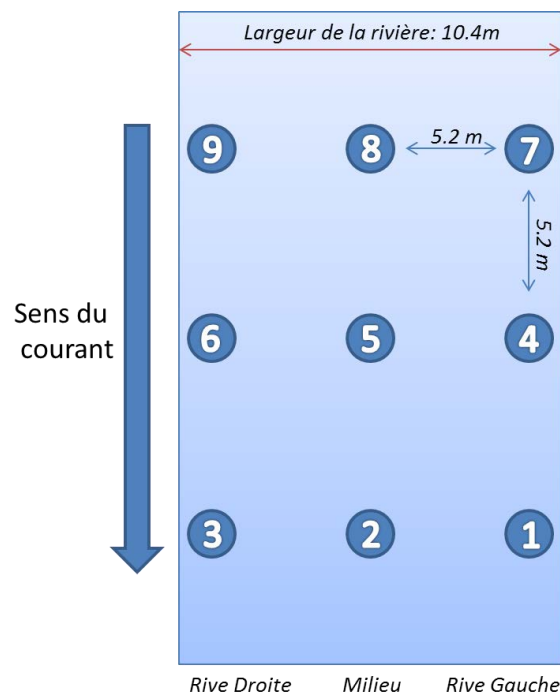


Figure 38 Schématisation du quadrillage constitué de neuf points d'échantillonnage collectés au site 4 du tronçon de la rivière étudiée.

Tableau 12 Conditions hydro-climatologiques lors des prélèvements de sédiment.

Date d'échantillonnage	Quadrillage	Hauteur d'eau de la rivière (cm)	Pluies antécédentes 5 jours (mm)
16/09/2014	# 1	42	0,5
20/07/2015	# 2	46	13,6
24/08/2015	# 3	46	2,8
04/07/2016	# 4	55	1

2.2 Détermination du rapport sédiment humide/sédiment sec

Une portion de sédiment humide a été pesée. Cette même portion a ensuite été soumise à une température de 105°C de manière à retirer l'eau résiduelle de l'échantillon. Le temps de séchage a été adapté en fonction de l'échantillon (2-3 jours) jusqu'à ce que le poids sec en sédiment ne varie plus. Le rapport massique de sédiment humide *versus* sédiment sec a ensuite pu être déterminé pour chaque échantillon.

2.3 Détermination du pourcentage de matière organique

Une fois le rapport masse humide *versus* masse sèche déterminé, la portion de sédiment séchée à 105°C a ensuite été soumise à une température de 375°C pendant 16 heures. A cette température, l'ensemble des matières organiques présentes dans l'échantillon sont calcinées et donc éliminées. Le pourcentage de matière organique est obtenu suite au rapport entre le poids du résidu calciné à 375°C et celui séché à 105°C

2.4 Identification granulométrique

L'essai consiste à séparer par lavage les grains agglomérés d'un échantillon de masse connue, puis à les fractionner au moyen d'une série de tamis. Le poids de refus (partie du matériau retenu sur le tamis) est déterminé après un séchage à 105°C jusqu'à l'évaporation complète de l'eau utilisée pour la séparation des grains. Cette identification granulométrique s'est faite à partir de la portion de sédiment préalablement calcinée à 375°C de manière à séparer uniquement les minéraux et pour éviter que les branchages et feuillages perturbent le fractionnement lors du tamisage. Les tailles de maillage des différents tamis utilisés pour fractionner l'échantillon de sédiment sec sont: 2 mm, 1 mm, 0,5 mm, 0,2 mm, 0,125 mm et 0,063 mm.

2.5 Quantification des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux

Une seconde portion de sédiment humide a été isolée pour l'analyse des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux. La quantification des bactériophages infectieux (norme ISO 10705-1) a été réalisée à partir de l'éluat obtenu après l'élution du sédiment (cf protocole chapitre 2). Les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux ont été exprimées en UFP/g de sédiment sec par l'intermédiaire des rapports massiques de sédiment humide *versus* sec préalablement déterminés pour chaque échantillon.

2.6 Détermination de la surface spécifique et microporosités

La surface spécifique et la microporosité ont été déterminées à partir des neuf points d'échantillonnage de sédiment frais du quadrillage #4.

La surface spécifique a été estimée par la méthode normalisée BET (Norme AFNOR NF 11-621). Celle-ci consiste à mesurer la quantité de diazote adsorbée à la surface du matériau testé. La fin de l'adsorption de la première couche de gaz sur le matériau est ensuite modélisée selon une isotherme théorique d'adsorption multicouche proposée par Brunauer, Emmett et Teller (Brunauer et al., 1938). Les valeurs représentant le volume de gaz adsorbé en monocouche permettent ensuite la détermination de la surface spécifique tout en tenant compte de l'affinité de l'azote pour les échantillons testés.

La microporosité (pores de taille inférieure à 0,2 nm) a été estimée par la méthode du t-plot. La comparaison des isothermes expérimentales avec une isotherme obtenue sur un échantillon de référence non poreux permet d'identifier les micropores. En effet, la méthode d'adsorption par l'azote permet non seulement de mesurer la surface géométrique liée à la taille et à la forme des grains mais aussi de rendre compte de l'irrégularité et des tortuosités de la surface.

2.7 Détermination des principaux minéraux du sédiment par diffraction aux rayons X

L'analyse par diffraction aux rayons X a été effectuée sur les sédiments frais collectés lors du quadrillage #4. Les échantillons suivants ont été analysés :

- 1) Echantillon représentatif de la rive gauche (regroupement des points d'échantillonnage 1, 4 et 7 à poids égal)
- 2) Echantillon représentatif du milieu de la rivière (regroupement des points d'échantillonnage 2, 5 et 8 à poids égal)
- 3) Echantillon représentatif de la rive droite (regroupement des points d'échantillonnage 3, 6 et 9 à poids égal)
- 4) Echantillon représentatif de la fraction < 0,063 mm du sédiment de la rivière (regroupement des points d'échantillonnage 1, 2 et 3 à poids égal avant granulométrie)

Des traitements supplémentaires à la diffraction aux rayons X ont été réalisés pour l'échantillon représentatif de la fraction < 0,063 mm de sédiment afin d'analyser spécifiquement les différentes phases argileuses. L'échantillon a été déposé sur trois lames et chacune de ces lames ont subi un traitement : la première lame a été analysée après séchage à l'air, la seconde après saturation à l'éthylène glycol et la troisième après passage au four à 550°C.

3 Résultats

3.1 Analyse des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux

Une différence de distribution latérale en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a été observée dans la rivière pour l'ensemble des quadrillages analysés (Figure 39). En effet, les concentrations mesurées en rive droite sont en moyenne cinq fois plus élevées que celles mesurées au milieu de la rivière ou en rive gauche.

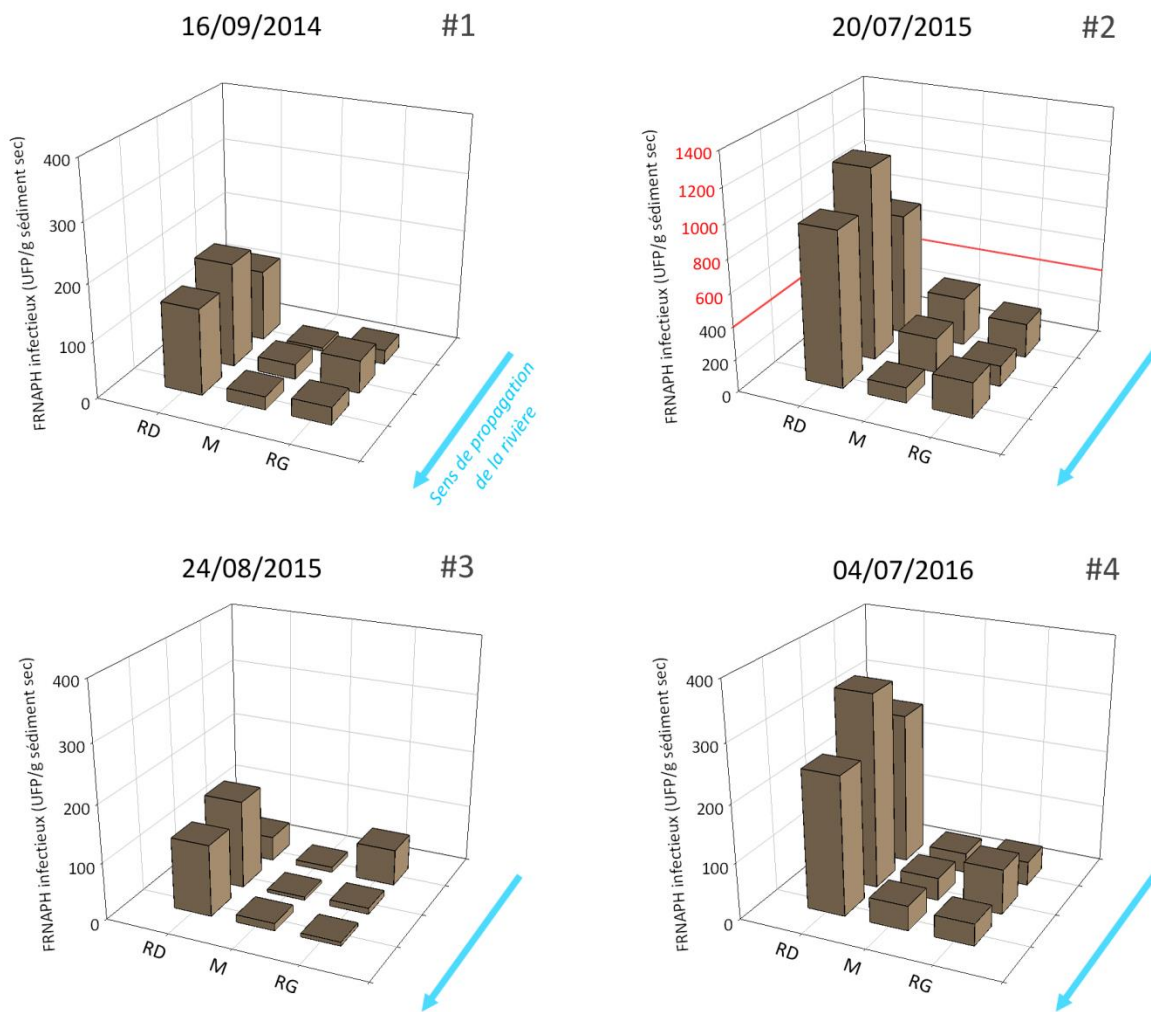


Figure 39 Quantification des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans les sédiments en fonction de la situation spatiale (RD : rive droite, M : milieu et RG : rive gauche) dans la rivière lors de quatre prélèvements différents (#1, #2, #3 et #4).

De plus, le quadrillage #2 se démarque par rapport aux autres quadrillages avec des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux en moyenne 7 fois plus élevées. Ce quadrillage est le seul à avoir été réalisé suite à des précipitations importantes (pluies antécédentes de 13,6 mm, Tableau 12) dans les 5 jours précédents le prélèvement. Afin de compléter ces observations, les

débits de la rivière antécédents au jour de prélèvement ont été analysés pour le quadrillage #2 (Figure 40).

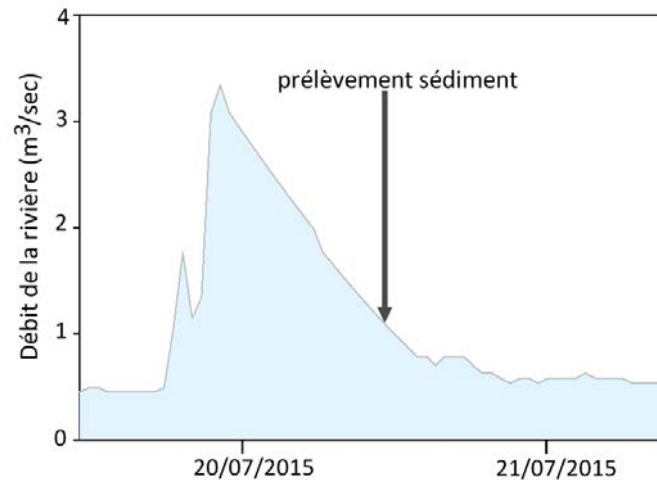


Figure 40 Analyse du débit de la rivière en fonction de la date de prélèvement du sédiment.

D'une part, ces premiers résultats confirment les analyses des précédents chapitres concernant l'impact des perturbations hydro-climatologiques sur la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux. D'autre part, la différence de distribution spatiale des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux pour les quatre quadrillages suscitent l'intérêt d'étudier plus en détail les propriétés du sédiment pour expliquer de telle variation de concentrations à seulement quelques mètres d'écart.

3.2 Analyse des caractéristiques du sédiment

3.2.1 Analyse de la matière organique

Le pourcentage de matière organique est de $5,1 \pm 0,9$ % pour l'ensemble des échantillons de sédiment analysés. Malgré la faible variabilité de ce pourcentage, une dispersion plus importante est néanmoins observée en rive droite de la rivière (Figure 41). Une comparaison statistique entre les concentrations de bactériophages ARN F-spécifiques obtenues en rive droite et les pourcentages respectifs de matière organique ne montre cependant aucune relation entre ces deux paramètres (Test de Wilcoxon, $p < 0,001$).

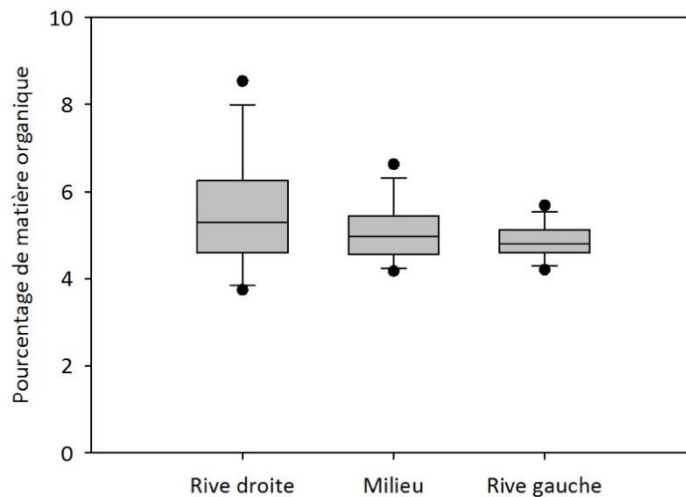


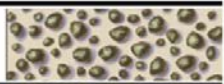
Figure 41 Dispersion du pourcentage de matière organique en rive droite, milieu et rive gauche de la rivière sur l'ensemble des données des quatre quadrillages (n=12 pour chaque boîte à moustaches). Boîtes : 1^{er} et 3^{ème} quartiles coupés par la médiane ; moustaches : 10^{ème} et 90^{ème} percentiles, points noirs : valeurs maximales et minimales.

Ainsi, le pourcentage de matière organique présent dans les échantillons de sédiments joue peut-être un rôle minime dans la distribution latérale des bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière mais malgré tout pas suffisant pour être significativement responsable des variations en concentrations.

3.2.2 Analyse de l'identification granulométrique

L'identification granulométrique a été réalisée sur l'ensemble des échantillons de sédiment des quatre quadrillages. Les tailles de grains analysées pour chaque échantillon sont représentées dans le tableau 13.

Tableau 13 Classification des grains fractionnés selon leur taille.

Taille des grains (mm)	Classification selon Grabau*	Classification selon l'échelle de Wentworth**	
>2	Rudite	Graviers	
2 – 0,5		Sable grossier	
0,5 – 0,2	Arénite	Sable moyen	
0,2 -0,063		Sable fin à très fin	
< 0,063	Lutite	Silt ; argile	

*Grabau, A.W. (1904) On the classification of sedimentary rocks. American Geologist. Vol. 33, p. 228-247

**Wentworth C.K. (1922) A scale of grade and class terms for clastic sediments, Journal Geology. Vol. 30, p. 377-392

Pour chaque échantillon de sédiment, le pourcentage massique de refus a été calculé. Il est défini comme le rapport entre la masse de sédiment sec retenu par un tamis d'ouverture d et la masse totale initiale du sédiment utilisé pour l'analyse. Les résultats sont présentés figure 42.

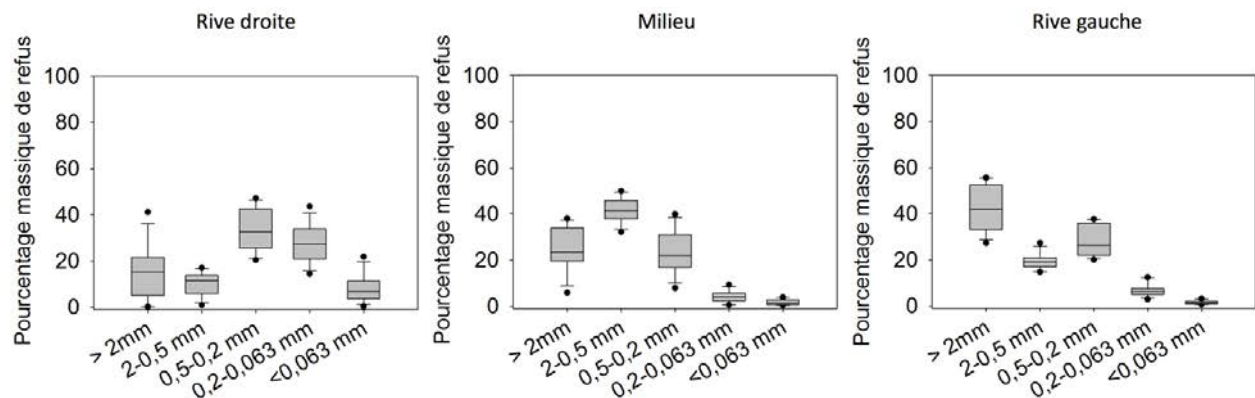


Figure 42 Dispersion des pourcentages massiques de refus calculés en rive droite, au milieu et en rive gauche en fonction des différents tamisages réalisés ($n=12$ pour chaque boîte à moustaches). Boîtes : 1^{er} et 3^{ème} quartiles coupés par la médiane ; moustaches : 10^{ème} et 90^{ème} percentiles, points noirs : valeurs maximales et minimales.

Un pourcentage important (plus de 30 %) de sable fin et argiles (grains $<0,2$ mm) ont été retenus par tamisage pour les échantillons de sédiment collectés en rive droite. A l'inverse, en rive gauche et milieu de rivière, plus de 40% du refus massique est constitué respectivement de graviers (grains > 2 mm) et de sable grossier (grains compris entre 2 et 0,5 mm). L'analyse granulométrique des quadrillages met donc en évidence une distribution latérale du sédiment avec des grains fins à très fins en rive droite et plus grossiers au milieu et en rive gauche de la rivière.

Afin d'établir un possible lien entre les concentrations élevées en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et les sédiments composés de grains fins à très fins en rive droite, une analyse en composantes principales a été réalisée sur l'ensemble des données (Figure 43). Des corrélations positives ont été observées entre les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et les grains inférieurs à 0,2 mm. En effet, une forte corrélation est constatée pour les sables fins à très fins ($r=0,638$, $p<0,001$) et une plus faible corrélation pour les argiles ($r=0,451$, $p=0,006$). A l'inverse, une corrélation négative est observée entre les concentrations en bactériophages infectieux et les sables grossiers ($r=-0,644$, $p<0,001$).

Ainsi, la distribution latérale des bactériophages ARN F-spécifiques est étroitement liée à la dimension des grains qui composent les sédiments. Deux hypothèses peuvent expliquer la présence majoritaire de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans les sédiments fins collectés en rive droite de la rivière : (i) les grains inférieurs à 0,2 mm offrent une surface disponible plus importante pour l'attachement des particules virales que les grains supérieurs à 0,2 mm ou (ii) la nature même des grains inférieurs à 0,2 mm facilite l'attachement des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux.

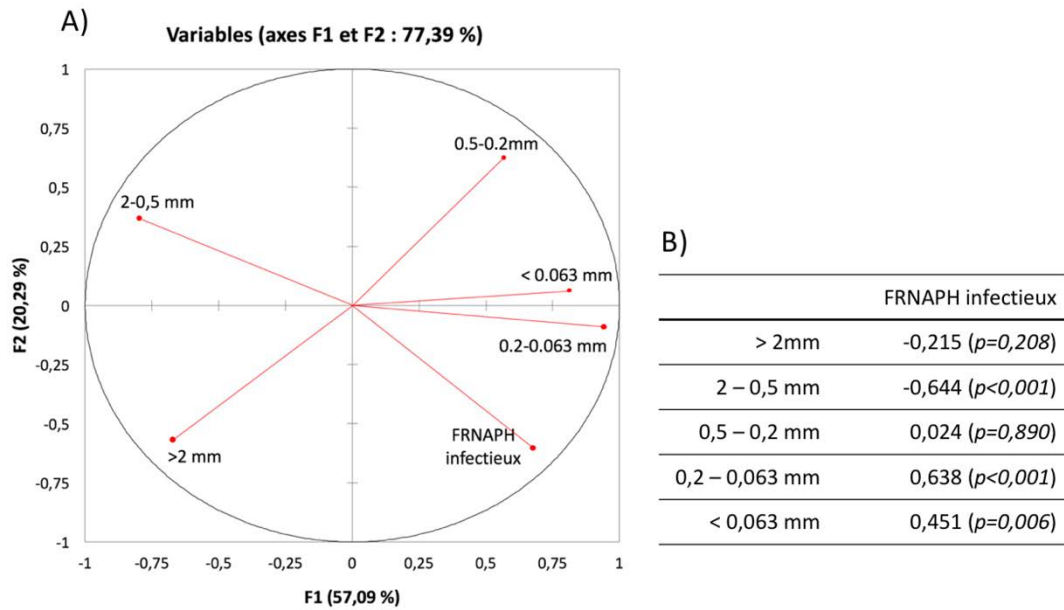


Figure 43 (A) Analyse en composantes principales et (B) matrice des corrélations de Spearman obtenues entre les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et les différentes tailles de grains.

3.3 Analyse des surfaces spécifiques et de la nature des sédiments

Afin de comprendre aux mieux la distribution latérale des bactériophages ARN F-spécifiques en fonction de la dimension des grains, la surface spécifique, la microporosité ainsi que les principaux minéraux présents ont été déterminés à partir des échantillons du quadrillage #4. Ces analyses ont été réalisées pour nous au Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux à Nancy.

L'analyse granulométrique détaillée du quadrillage #4 présente les mêmes observations que précédemment, avec une distribution latérale des grains fins à très fins préférentiellement en rive droite et des grains plus grossiers au milieu et en rive gauche de la rivière (Figure 44).

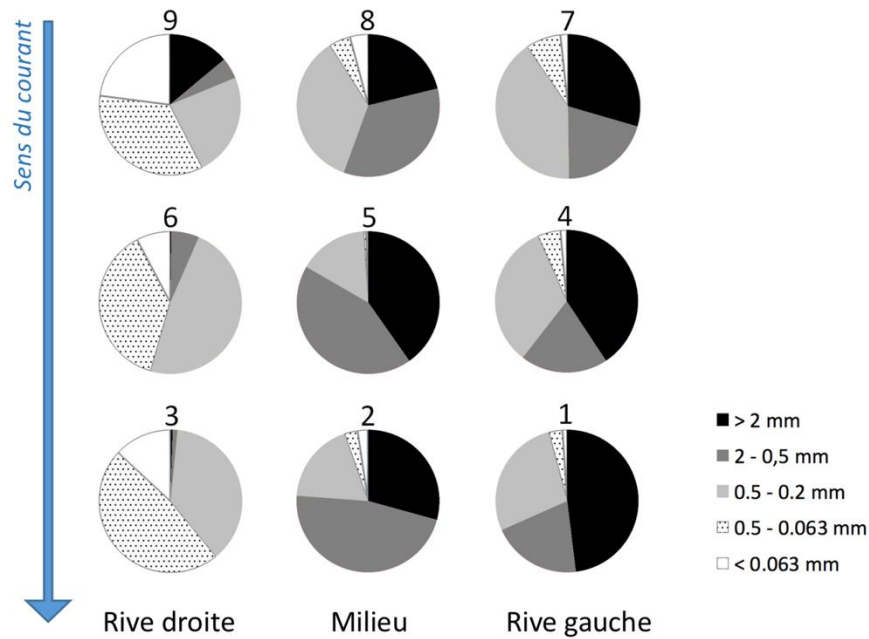


Figure 44 Identification granulométrique du quadrillage #4.

3.3.1 Analyse de la surface spécifique des échantillons du quadrillage #4

Les résultats des surfaces spécifiques, déterminées par la méthode BET, sont donnés dans le tableau 14 et ceux concernant les microporosités, déterminées par la méthode du t-plot, sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 14 Surfaces spécifiques déterminées par la méthode BET.

Localisation	Point d'échantillonnage du quadrillage #4	Surface spécifique (m ² /g)
Rive gauche	1	16,7 ± 3,8
	4	16,0 ± 3,3
	7	12,9 ± 3,5
Milieu	2	21,1 ± 5,6
	5	21,2 ± 6,3
	8	18,2 ± 6,6
Rive droite	3	9,3 ± 2,1
	6	9,4 ± 3,7
	9	7,8 ± 1,2

Tableau 15 Valeurs estimées des surfaces micropores et hors micropores par la méthode t-plot.

Localisation	Point d'échantillonnage du quadrillage #4	Surface micropores (m ² /g)	Surface micropores (%)	Surface hors micropores (m ² /g)
Rive gauche	1	3,5	20,5	13,6
	4	3,0	18,4	13,3
	7	2,1	16,0	11,0
Milieu	2	4,4	20,3	17,3
	5	4,4	20,3	17,3
	8	3,5	18,8	15,1
Rive droite	3	0,9	9,8	8,3
	6	0,7	7,4	8,7
	9	0,6	7,8	7,1

Les surfaces spécifiques des échantillons diffèrent selon la zone de prélèvement du sédiment (rive droite, milieu, rive gauche). En effet, les surfaces spécifiques sont de l'ordre de 13 à 16 m²/g pour la rive gauche, de 18 à 22 m²/g au milieu et de 8 à 10 m²/g pour la rive droite. Quant à la microporosité, le traitement par la méthode du t-plot montre que les échantillons présentent 7,4% à 20,5% de micropores à leur surface. Comme pour les surfaces spécifiques, des différences sont observées entre chaque zone avec des microporosités plus importantes au milieu et en rive gauche (de 16,0 à 20,5%) qu'en rive droite (< 10%).

Les données de surfaces spécifiques des neuf points d'échantillonnage du quadrillage #4 ont été utilisées pour exprimer les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques par unité de surface (Figure 45).

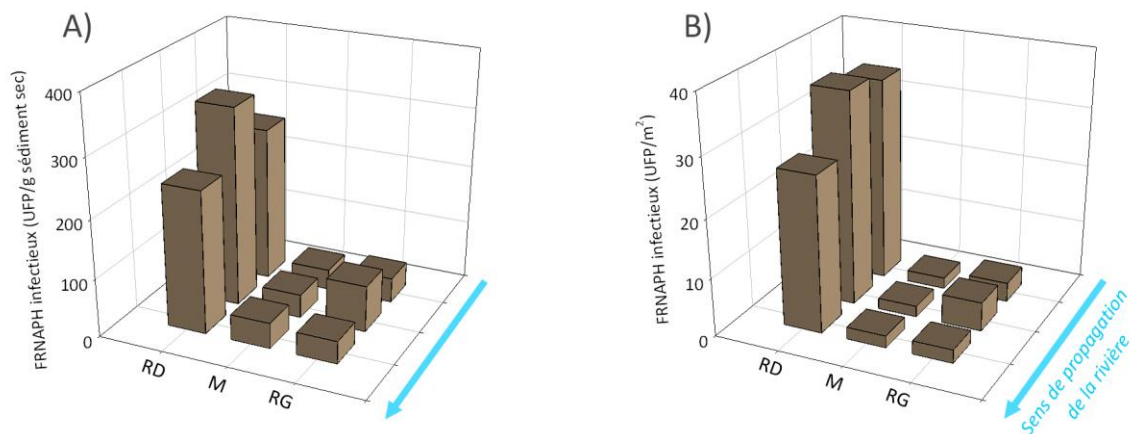


Figure 45 Quantifications des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux exprimées en UFP par gramme de sédiment sec (A) ou par unité de surface (B) pour le quadrillage #4.

La distribution des bactériophages ARN F-spécifiques par unité de surface demeure identique à celle obtenue par gramme de sédiment. L'hypothèse selon laquelle la présence majoritaire de

bactériophages ARN F-spécifiques serait due à une plus grande surface disponible en raison de la fine taille des grains est donc rejetée. En effet, contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre, les sédiments de la rive droite, composés préférentiellement de grains fins à très fins ($< 0,2$ mm), présentent des surfaces spécifiques faibles en comparaison des sédiments collectés en rive gauche ou milieu de la rivière. De plus, la microporosité des échantillons ne permet pas non plus d'expliquer l'absence de corrélation entre les surfaces spécifiques déterminées et la taille des grains. Les surfaces microporeuses demeurent supérieures et similaires pour les échantillons milieu/rive gauche et même les surfaces hors micropores restent élevées et ne suivent pas les données granulométriques. C'est donc essentiellement la nature des matériaux constitutifs qui peut expliquer ces différences. La deuxième hypothèse concernant la nature même des sédiments a donc été étudiée de manière plus approfondie.

3.3.2 Analyse de la nature minéralogique des échantillons du quadrillage #4

La nature minéralogique du sédiment collecté au quadrillage #4 a été déterminée par diffraction aux rayons X. La méthode consiste à analyser des diagrammes de diffraction obtenus suite à la rencontre des échantillons, préalablement broyés, avec le faisceau de rayons X. En effet, en heurtant des minéraux, le faisceau lumineux est diffracté dans des directions spécifiques. Les diffractogrammes enregistrés pour chaque échantillon sont ensuite comparés à des diffractogrammes de référence.

Quatre principales phases sont repérées sur les diffractogrammes des quatre échantillons :

- Quartz
- Calcite
- Goethite
- Carbonate de type dolomite ou ankérite

Malgré une composition minéralogique similaire, les quatre échantillons se distinguent par la quantité de phases porteuses de fer.

La figure 46 présente les quatre diffractogrammes enregistrés pour chaque échantillon analysé. Un décalage en intensité des quatre courbes est observé avec une hauteur du bruit de fond moyen variable d'un échantillon à l'autre. Cette hauteur de bruit de fond semble provenir de la fluorescence du fer et serait liée à la fois à la présence de goethite (oxy-hydroxyde de fer) et probablement d'autres phases porteuses de fer telles que des oxydes et hydroxydes peu ou mal cristallisés. L'analyse semi-quantitative du décalage de ces quatre courbes met en évidence que ces phases porteuses de fer sont plus importantes en rive gauche puis décroissent selon l'ordre suivant : rive gauche > milieu > rive droite. De plus, souvent associées à d'autres matériaux amorphes ou mal cristallisés (non détectable par diffraction aux rayons X), leur présence plus importante en rive gauche et milieu de la rivière peut expliquer les valeurs élevées de surface spécifique et microporosité.

Enfin, l'estimation importante de ces phases porteuses de fer peut s'expliquer par l'industrie sidérurgique qui a été intense dans la région.

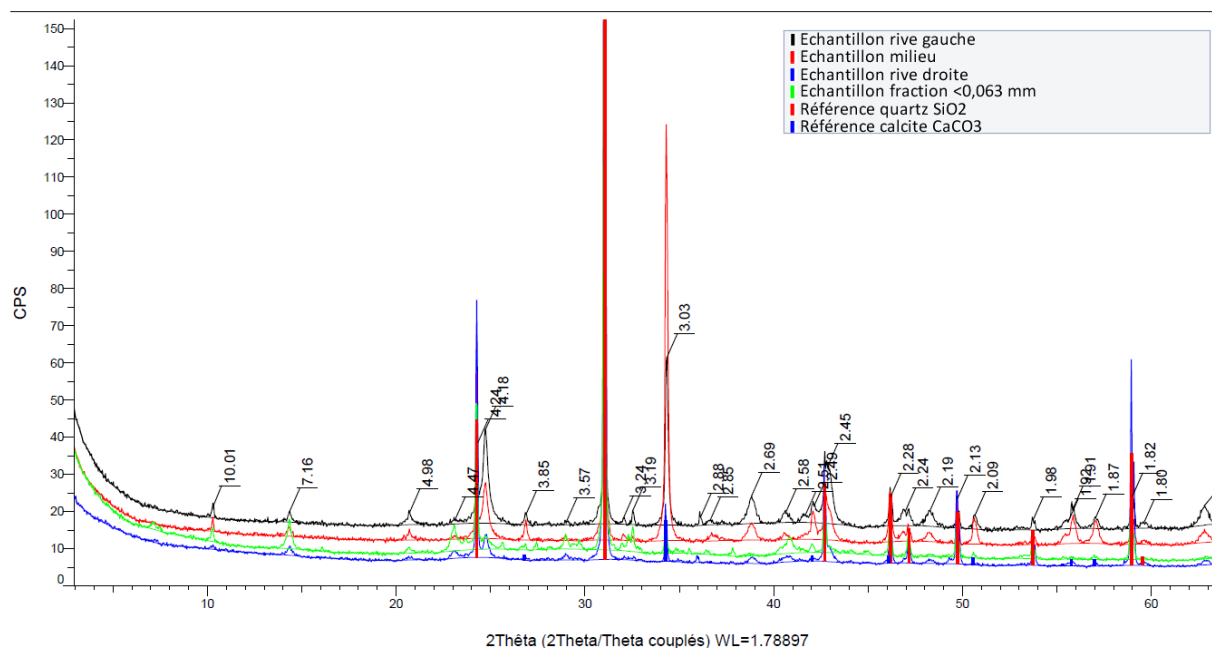


Figure 46 Superposition des diffractogrammes enregistrés suite à l'analyse de diffraction aux rayons X des échantillons représentatifs de la rive droite, du milieu, de la rive gauche et de la fraction inférieure à 0,063 mm du sédiment de la rivière.

Pour finir ces analyses, les phases argileuses de l'échantillon représentant la fraction fine inférieure à 0,063 mm ont été déterminées par l'intermédiaire de différents traitements supplémentaires. Les résultats de ces analyses mettent en évidence que les principales argiles identifiées sont la kaolinite, l'illite et la chlorite.

4 Discussion

L'objectif de ce dernier chapitre était de caractériser les sédiments de la rivière afin d'expliquer la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans ce compartiment. Pour ce faire, un quadrillage constitué de neuf points d'échantillonnage a été défini au fond du lit de la rivière.

Les bactériophages ARN F-spécifiques ont été détectés dans l'ensemble des échantillons de sédiments analysés. D'autres études ont également montré la présence de bactériophages ARN F-spécifiques dans les sédiments (Haramoto et al., 2009; Skrabber et al., 2009). En phase de crue, d'importantes concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux ont été observées dans les sédiments. Ces concentrations peuvent s'expliquer par l'apport de matière en suspension et de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux pendant une crue (Fauvel et al., 2016a), ainsi que le possible transfert de ces particules virales de la colonne d'eau au sédiment (Fauvel et al., 2017). Par contre, quel que soit les conditions hydro-climatologiques antécédentes, une distribution spatiale des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a été mise en évidence avec des concentrations cinq fois plus élevées en rive droite qu'au milieu ou en rive gauche de la rivière. Les propriétés et

caractéristiques du sédiment ont été caractérisées afin d'apporter des éléments de réponse à cette distribution spatiale.

L'analyse granulométrique du sédiment a permis de montrer des corrélations positives entre les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et des tailles de grains inférieures à 0,2 mm. Selon l'échelle de Wentworth permettant la classification des particules selon leur taille (Wentworth, 1922), ces grains correspondraient à des sables fins à très fins et/ou des argiles. L'attachement des particules virales à du sable a été mis en évidence à de nombreuses reprises puisque ce matériel est notamment utilisé dans des colonnes permettant la rétention des particules virales (Jin et al., 1997; Knappett et al., 2008). Les minéraux argileux sont également très réputés comme support pour l'attachement des particules virales (Bellou et al., 2015; Chattopadhyay and Puls, 1999; Syngouna and Chrysikopoulos, 2015). Ainsi, la présence accrue de sable fin et d'argile en rive droite pourrait être une première explication de la distribution latérale des bactériophages ARN F-spécifiques au niveau des sédiments dans la rivière.

La mesure de la surface spécifique des différents types de sédiment (rive droite, milieu et rive gauche) a permis d'exprimer, pour la première fois, le nombre de particules virales par unité de surface. Les quantités en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux déterminées sont comprises entre 1,9 à 36,3 UFP/m². Ce résultat peut paraître faible mais rappelons que 1 g de sédiment peut présenter une surface spécifique de plusieurs m² en raison de l'irrégularité et des tortuosités de la surface. Qui plus est, le nombre de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux détectés est très certainement sous-estimé en raison du protocole d'élution présentant un rendement maximum de 45%. Ces arguments peuvent donc justifier les concentrations obtenues. La mesure de la surface spécifique nous a également permis de confirmer l'importance de la nature du sédiment pour l'attachement des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux.

La caractérisation du sédiment par diffraction aux rayons X a permis de mettre en évidence la présence de quatre phases principales dans les sédiments de l'Alzette, à savoir le quartz, la calcite, la goethite et le carbonate. L'attachement des particules virales à ces minéraux a été précédemment décrit dans la littérature. Le quartz, en raison de l'hétérogénéité chimique microscopique de sa surface, présente des charges à la fois positives et négatives permettant l'attachement des particules virales (Foppen et al., 2006). À l'inverse, une étude a montré la mauvaise rétention du bactériophage MS2 dans une colonne composée à 63% de calcite (Stevenson et al., 2015). En ce qui concerne la goethite, ce minéral est défini comme un oxy-hydroxyde de fer et a déjà été spécifiquement étudié dans les interactions avec les bactériophages. Attinti et al. (2010) et Foppen et al. (2006) ont rapporté l'attachement du bactériophage MS2 à des particules de silices recouvertes de goethite. Zhuang et Jin (2008) ont montré une affinité distincte du bactériophage MS2 pour la goethite en fonction du pH. En effet, ce minéral peut présenter des charges positives aux pH environnementaux puisqu'il présente un "pI" de 7,1. Attinti et al. (2010) ont également démontré l'importance des interactions électrostatiques entre les particules virales et la goethite. Néanmoins, Zhuang et Jin (2008) suggèrent que le bactériophage MS2 attaché à la goethite serait plus sensible à l'inactivation de son milieu. Ces auteurs expliquent également que la présence de carbonate augmenterait l'attachement du bactériophage MS2 à la goethite par la génération de sites d'attachement (réaction de protonation).

L'analyse des sédiments de l'Alzette par diffraction aux rayons X a également mis en lumière une distribution latérale préférentielle de la goethite (et d'autres phases porteuses de fer) au milieu et en rive gauche de la rivière. Ce résultat, combiné aux informations obtenues de la littérature, permet de mieux appréhender la présence plus importante de phages infectieux au niveau la rive droite. La nature du sédiment (sable + argile) ainsi que la présence importante de goethite au milieu et en rive gauche de la rivière serait à l'origine à la fois de l'attachement des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux mais aussi de leur inactivation. Ainsi, la méthode des plages de lyse employée seule n'est pas adéquate pour la détermination des phages inactivés. C'est pourquoi, les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux ont peut-être été préférentiellement observés en rive droite. Pour confirmer cette hypothèse, il serait très intéressant de déterminer la présence de bactériophages ARN F-spécifiques par des outils moléculaires en complément du test d'infectiosité. La combinaison de ces deux méthodes de détection permettrait de définir plus précisément la part de l'inactivation dans les sédiments.

En résumé, cette étude a permis d'apporter de nouvelles informations concernant la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques en fonction exclusivement des propriétés et caractéristiques du sédiment. La différence de distribution spatiale des bactériophages ARN F-spécifiques dans les sédiments de la rivière a suscité l'engagement de ces recherches. De multiples analyses ont été réalisées afin de caractériser au mieux les sédiments collectés. L'identification granulométrique a dans un premier temps montré des corrélations entre la taille des grains et les concentrations en particules virales éluées des sédiments. La présence majoritaire des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux en rive droite de la rivière et de particules inférieures à 0,2 mm soulignent l'affinité de ces particules phagiques pour les fractions argileuses telles que l'illite, la kaolinite et la chlorite. De plus, la caractérisation des principaux minéraux par diffraction aux rayons X a permis de définir une présence importante de phases porteuses de fer, ce qui coïncide avec le contexte général du bassin ferrifère de l'Alzette. La répartition spatiale de ces minéraux ferreux pourrait, elle aussi, être responsable de la distribution des bactériophages ARN F-spécifiques dans les sédiments de l'Alzette.

Discussion générale

L'objectif de la présente étude était de mieux comprendre le transport et le devenir des bactériophages ARN F-spécifiques dans une rivière en fonction de leurs caractéristiques propres et des conditions hydro-climatologiques spécifiques de l'environnement proche.

Le tableau 16 récapitule l'ensemble des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux mesurées dans l'Alzette. La présence des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans les eaux de surface et les sédiments de la rivière atteste de la dissémination de ces particules virales dans le milieu hydrique. De plus, les variations des concentrations observées dans les eaux de surface en période de débits de base et de crues laissent transparaître respectivement l'influence des variables environnementales et des perturbations hydro-climatologiques sur la dynamique et le comportement des bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière.

Afin d'explorer l'ensemble de ces observations plus en détails, les résultats obtenus seront discutés selon différents points fondamentaux. En prélude, il s'agit de définir la pollution fécale de la rivière Alzette *via* l'évaluation de la présence de bactériophage ARN F-spécifiques. La discussion sera ensuite menée par rapport à la dissémination de ces phages dans le compartiment eau d'une part et dans les sédiments d'autre part. Enfin, les conséquences des perturbations hydro-climatologiques sur l'ensemble de cette dynamique seront discutées dans une dernière partie.

Tableau 16 Synthèse des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH) infectieux et totaux (copies de génome) détectés dans l'Alzette.

	FRNAPH infectieux	Génogroupe I	Génogroupe II	Génogroupe III	Génogroupe IV	
	Concentration (UFP/100mL ou g sédiment sec) / Pourcentage d'échantillons positifs (n=nombre d'échantillon)	Concentration (cg/100mL) / Pourcentage d'échantillons positifs (n=nombre d'échantillon)				
Chapitre 3	Eau de surface (débit de base ^a)	3,0.10 ¹ à 3,3.10 ³ / 100% (n=54)	9,3.10 ² à 7,5.10 ³ / 67% (n=36)	4,7.10 ³ à 6,3.10 ⁴ / 100% (n=36)	3,2.10 ² à 6,0.10 ³ / 56% (n=36)	3,1.10 ² à 6,1.10 ² / 11% (n=36)
	Sédiment	3,0.10 ² à 2,7.10 ³ / 100% (n=42)				
Chapitre 4	débit de base ^a	1,8.10 ² à 5,1.10 ³ / 100% (n=44)	8,6.10 ² à 1,1.10 ³ / 12,5% (n=24)	3,0.10 ³ à 3,8.10 ⁴ / 100% (n=24)	1,3.10 ³ / 4,2% (n=24)	0% (n=24)
	Eau de surface crue	4,0.10 ¹ à 5,9.10 ³ / 100% (n=95)	6,9.10 ² à 2,6.10 ⁴ / 57% (n=88)	4,2.10 ² à 4,7.10 ⁴ / 96% (n=88)	6,3.10 ² à 6,8.10 ³ / 55% (n=88)	2,7.10 ² à 3,3.10 ³ / 10% (n=88)
Chapitre 5	Eau de surface (débit de base ^a)	1,0.10 ¹ à 2,7.10 ³ / 100% (n=26)	5% des FRNAPH infectieux (n=57)	55% des FRNAPH infectieux (n=57)	33% des FRNAPH infectieux (n=57)	0% des FRNAPH infectieux (n=57)
	Sédiment	1,6 à 3,5.10 ² / 100% (n=15)	10% des FRNAPH infectieux (n=109)	73% des FRNAPH infectieux (n=109)	15% des FRNAPH infectieux (n=109)	1% des FRNAPH infectieux (n=109)
Chapitre 6	Sédiment	5,7 à 1,2.10 ³ / 100% (n=36)				

^apartie du débit d'un cours d'eau qui provient essentiellement des nappes souterraines quand il ne se produit pas de précipitation

L'analyse des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques dans l'eau de surface de l'Alzette démontre la présence d'une pollution fécale. Au cours des neuf campagnes de prélèvements réalisées en conditions de débit de base de la rivière, les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux variaient de $3,0 \cdot 10^1$ à $3,3 \cdot 10^3$ UFP/100 mL. Ces concentrations sont comparables aux résultats d'autres études (Haramoto et al., 2009; Mauffret et al., 2012; Ogorzaly et al., 2009). La station d'épuration d'Hespérange, qui présente de faibles abattements pour l'élimination des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux, induit donc un apport de pollution virale d'origine fécale dans la rivière. L'Alzette est donc soumise à une pollution fécale avérée mais dans une gamme classiquement décrite dans la littérature. Par ailleurs, une analyse plus détaillée des bactériophages ARN F-spécifiques présents dans l'eau de rivière a souligné la présence majoritaire de phages appartenant au génogroupe II. Rappelons que les bactériophages ARN F-spécifiques sont proposés comme traceur de l'origine de la pollution fécale (Lee et al., 2011, 2009). La présence des génogroupes II et III est généralement associée à une contamination d'origine urbaine tandis que la présence des génogroupes I et IV est souvent associée à une contamination d'origine animale (Ogorzaly et al., 2009; Schaper et al., 2002b). Ainsi, l'abondance du génogroupe II dans l'eau de surface de l'Alzette, mis en évidence aussi bien *via* une détection directe (quantification du génome) qu'indirecte (génotypage des plages de lyse), confirme l'influence d'une pollution fécale majoritairement d'origine anthropique dans le tronçon étudié. La dynamique de ces phages peut donc être étudiée au niveau de ce site.

Une variabilité importante des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques a été observée dans le compartiment eau suggérant d'une part, des diminutions plus rapides sous certaines conditions environnementales et d'autre part, des apports parfois importants de pollution fécale dans d'autres conditions. Quels sont les facteurs environnementaux qui gouvernent ces variations ?

La diminution de la concentration en bactériophages ARN F-spécifiques dans le compartiment eau en conditions de débit de base peut être principalement attribuée à deux phénomènes, soit de l'inactivation virale, soit de la sédimentation. Le suivi du nombre de particules totales a permis de démontrer que c'est le premier phénomène qui prédomine dans notre étude, tout du moins dans des conditions standards (hors phénomènes pluvieux). En effet, si le nombre de phages infectieux diminue dans le temps et dans l'espace, les phages totaux mesurés par RT-qPCR, eux, restent stables ou ne diminuent que très légèrement. Les particules phagiques perdent donc leur caractère infectieux tout en restant présentes dans la phase eau. Par ailleurs, une corrélation négative a été démontrée entre les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et les températures de l'eau de surface. Pour des températures inférieures à 8°C, les concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux étaient stables et élevées en comparaison de celles mesurées lors de prélèvements réalisés à des températures supérieures à 11°C. Cette observation confirme parfaitement les données de la littérature puisque la température est connue depuis longtemps comme étant le paramètre environnemental majeur de l'inactivation des virus. Ainsi l'inactivation des bactériophages ARN F-spécifiques s'accroît avec la température (Bae and Schwab, 2008; Yang and Griffiths, 2013), ce qui abaisse leur concentration dans les eaux superficielles selon

les saisons (Durán et al., 2002; Hata et al., 2016). A partir de nos résultats, nous confirmons également que l'effet de la température est différent en fonction des génogroupes de phages. Globalement, comme d'autres études (Muniesa et al., 2009; Schaper et al., 2002a; Yang and Griffiths, 2013), nous observons que la survie des souches appartenant aux génogroupes I et II est supérieure à celles des génogroupes III et IV. Cette différence de survie constitue la principale limite de l'utilisation des phages infectieux comme outils de discrimination de l'origine de la pollution fécale. Le génome ayant une persistance très supérieure à celle du caractère infectieux (Gassilloud et al., 2003; Ogorzaly et al., 2010), sa recherche doit être privilégiée dans un contexte de « Microbial Source Tracking ».

Dans la littérature, les valeurs d'inactivation, généralement exprimées en T_{90} , ont été obtenues soit en laboratoire, soit *in situ* par l'intermédiaire de sacs à dialyses afin de favoriser un contact direct entre les bactériophages infectieux testés et les conditions extérieures (Tableau 17). Dans ces articles, la survie des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux est évaluée soit à partir de souches de référence, soit à partir de souches issues de l'environnement puis cultivées en laboratoire, soit à partir d'une dilution d'échantillons chargés en bactériophages infectieux collectés à l'entrée de stations d'épuration. Nos résultats présentent donc une originalité par rapport aux travaux de la littérature car ils décrivent pour la première fois la survie *in situ* des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux indigènes. Pour les campagnes où la température de l'eau était supérieure à 11°C et un débit de rivière inférieur à 1,45 m³/sec, une décroissance exponentielle des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux en fonction de la distance à la source de pollution (effluent de la station d'épuration d'Hespérange) a été observée. L'utilisation du temps de résidence de la masse d'eau ainsi que la modélisation des décroissances exponentielles observées pour chaque campagne de prélèvement a permis de calculer des valeurs *in situ* de T_{90} . Etant donné que la majorité des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux détectés dans l'Alzette appartiennent au génogroupe II, ces valeurs de T_{90} ont préférentiellement été comparées aux données de la littérature estimées pour les phages du génogroupe II. A l'inverse de ces études, les valeurs de T_{90} obtenues englobent principalement l'effet de la température mais aussi l'enchevêtrement de tous les autres paramètres environnementaux pouvant impacter la survie de ces phages indigènes. C'est sans doute pour cette raison que de légères disparités apparaissent entre nos résultats et ceux de la littérature, avec des valeurs de T_{90} souvent plus grandes dans ces études (Tableau 17).

Tableau 17 Valeurs de T_{90} estimées pour les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux (FRNAPHs) dans des eaux de surface de rivière.

Conditions	Génogroupes (GG)	Température ou saison	T_{90} (jours)	Références
<i>In situ</i> (sacs à dialyse) Dilution 1/50 d'eau usée	Tous GG confondus	Été Hiver	2,6 13,5	Durán et al., 2002
<i>In situ</i> (sacs à dialyse) Dilution 1/50 d'eau usée	GGI GGII GGIII/GGIV	20°C	> 3 ≈ 3 < 3	Muniesa et al., 2009
Test en laboratoire Souches de références	GGI/GGII/GGIII/GGIV	4°C 15°C 25°C	12-30 >4 <4	Yang and Griffiths, 2013
Test en laboratoire Souches environnementales isolées et cultivées en laboratoire	GGI GGII GGIII GGIV	25°C	0,9 1,6/ 0,6 0,5/ 0,6 0,4	Ravva and Sarreal, 2016
Suivi <i>in situ</i> de la propagation Souches indigènes à la rivière	Tous GG confondus (prédominance du GGII)	11°C 16°C 18°C 20°C	0,6 1,6 0,5/ 1,2 1,0	Fauvel et al., 2016b

L'approche expérimentale originale employée dans ce présent travail, a également permis de déterminer des valeurs de D_{90} . Un maximum de 9,5 km de distance de la station d'épuration d'Hespérange a été estimé pour réduire 90% de la population en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux. Ces valeurs de D_{90} ne peuvent pas être comparées aux données de la littérature étant donné qu'aucune étude n'a actuellement examiné le transport en temps réel de particules virales dans un cours d'eau. Les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux pouvant être considérés comme modèles adéquats des virus entériques (Havelaar et al., 1993), ces valeurs de D_{90} pourraient alors alimenter les modèles d'évaluation du risque sur le site d'étude.

Nous pouvons dès lors nous interroger sur le risque de la localisation d'une base de kayak 3 km en aval de la station d'épuration d'Hespérange. Dans l'hypothèse d'une dynamique similaire des virus entériques pathogènes, des kayakistes seraient exposés à un risque de contamination virale d'origine hydrique.

En résumé, une approche expérimentale originale utilisant le temps de résidence de la masse d'eau a été mise en place pour suivre précisément le transport *in situ* des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans les eaux de surface d'une rivière. L'application de cette approche pour le suivi de virus entériques pathogènes permettrait de répondre à la question énoncée dans l'introduction générale: à partir de combien de mètres, kilomètres, peut-on pratiquer une activité récréative ou prélever la ressource pour la production d'eau potable, dans un cours d'eau ayant été contaminé en amont par le rejet d'une station d'épuration ? Ce type d'approche pourrait donc être très utile pour estimer la qualité de l'eau et évaluer les risques viraux pour la santé humaine.

La dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques présents dans le compartiment sédiment a également constitué une part importante de notre travail.

Selon les méthodes de prélèvement employées, la matière déposée au fond du lit de la rivière peut être collectée à des profondeurs variées. Dans notre étude, seuls les premiers centimètres de sédiment aspirés à la surface du fond du lit de la rivière sont analysés. Cette fraction est considérée comme étant potentiellement remobilisable lors d'évènements de crues. De plus, rappelons qu'à l'heure actuelle, aucune méthode n'a été définie comme méthode de référence pour l'élution des particules virales à partir de sédiment. Un protocole d'élution des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a donc été préalablement mis en place pour leur détection. Les rendements de ce protocole, estimés entre 13% et 45% selon la matrice de sédiment, sont comparables aux efficacités de récupération des particules virales déterminées dans d'autres études (Bitton et al., 1982; Monpoeho et al., 2001). Malgré une concentration généralement faible et une variabilité accrue liée à l'utilisation d'une étape d'élution, nous avons pu définir des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques comprises entre 1,6 et $2,7 \cdot 10^3$ UFP/g de sédiment sec. Cette observation n'est pas un phénomène nouveau puisque d'autres études avaient déjà décrit la présence de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans du sédiment de rivière (Haramoto et al., 2009; Skrabber et al., 2009). Néanmoins, nous avons précisé le phénomène par une analyse différentielle des 4 génogroupes et par la caractérisation des sédiments. Le génotypage des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a permis de mettre en évidence une différence de distribution entre les quatre génogroupes. Comme dans l'eau de surface, les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux appartenant au génogroupe II sont majoritairement présents dans le sédiment suivis des phages appartenant aux génogroupes III et I. Les bactériophages infectieux appartenant au génogroupe IV n'ont que très rarement été détectés. A première vue, la distribution des différents génogroupes dans les sédiments semble donc être étroitement liée à celle de la phase eau. Cependant, des études ont souligné des différences de comportement des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux face à un support en fonction de leurs propriétés de surface et de leur génogroupe (Armanious et al., 2015; Dika et al., 2013; Hébrant et al., 2014). C'est surtout la différence du caractère hydrophile-hydrophobe plutôt que de la charge qui est actuellement avancée comme hypothèse pour expliquer cette dissemblance entre les génogroupes (Dika et al., 2013). Afin de comprendre la distribution *in situ* des génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques dans les sédiments, des expériences en batch ont été réalisées.

Les résultats mettent effectivement en évidence une capacité d'attachement très supérieure des souches appartenant au génogroupe II (BZ13 DL20 et GA), III (Qbeta HL4-9) et IV (FI BR1) par rapport à celle du génogroupe I (MS2 DL20) ; ce dernier étant justement décrit comme le moins hydrophobe. L'attachement au sédiment est aussi très rapide. Il a lieu dès les trente premières minutes de l'expérience. Gantzer et al. (1994) ont également montré un attachement rapide des particules virales à une surface avec plus de 99,9% de virus entériques attachés en moins de trente minutes. Dans notre cas, ce pourcentage avoisine les 95% pour les souches appartenant aux génogroupes II et IV et 99% pour les souches du génogroupe III. Ces résultats permettent donc une interprétation plus précise des distributions en phages retrouvées dans nos échantillons de sédiment. Ainsi, malgré les capacités d'attachement des souches appartenant aux génogroupes III et IV, leur moindre survie peut expliquer leur faible détection *in situ* dans le sédiment. À l'inverse, l'abondance des

bactériophages appartenant au génogroupe II dans la zone d'étude, leur persistance et leur capacité d'attachement au sédiment explique leur prédominance dans ce compartiment. Les phages du génogroupe I, quant à eux, sont très persistants mais leur faible capacité d'attachement explique leur faible occurrence dans les sédiments malgré une présence dans la colonne d'eau.

Au-delà de la distribution hétérogène des quatre génogroupes dans le sédiment, une autre partie des résultats de ce travail souligne une distribution spatiale asymétrique des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux en fonction de la nature minéralogique des sédiments de la rivière. En effet, une corrélation positive a été observée entre la concentration en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et la fraction granulométrique inférieure à 0,2 mm, correspondant aux sables fins et argiles (Wentworth, 1922). De précédentes études ont également démontré l'attachement des bactériophages et virus entériques à des minéraux tels les argiles (Bellou et al., 2015; Chattopadhyay and Puls, 1999; Syngouna and Chrysikopoulos, 2010). Néanmoins, c'est la première fois que cette observation est obtenue à partir de l'analyse de la répartition *in situ* des particules virales dans le sédiment. De plus, en raison des anciennes activités sidérurgiques de la région, d'importants minéraux porteurs de fer, telle la goethite, ont été identifiés dans les sédiments de la rivière par diffraction aux rayons X. Les capacités d'attachement des bactériophages ARN F-spécifiques à la goethite ont été démontrées (Attinti et al., 2010; Foppen et al., 2006). Néanmoins, certaines données de la littérature soulignent également une inactivation plus importante des particules virales lorsqu'elles sont attachées à ce minéral (Zhuang and Jin, 2008). Ainsi, la répartition hétérogène de ces minéraux porteurs de fer dans les sédiments de l'Alzette peut aussi expliquer la distribution inversement proportionnelle des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux. L'utilisation de la méthode de culture des bactériophages n'est pas adéquate pour la détermination des phages potentiellement inactivés par les minéraux ferriques. La quantification des bactériophages ARN F-spécifiques totaux par des techniques de biologie moléculaire, en supplément du test d'infectiosité, pourrait valider ou non cette hypothèse.

La détection directe du génome phagique dans le compartiment sédiment constitue l'une des perspectives majeures de ce travail de thèse. En effet, la détection des bactériophages ARN F-spécifiques totaux permettrait de visualiser la dynamique *in situ* des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et non-infectieux dans les sédiments. Une distribution différente des phages infectieux *versus* non-infectieux pourrait être observée en raison des différences de cinétique d'attachement au sédiment déterminées lors de nos expériences.

En résumé, les bactériophages ARN F-spécifiques infectieux sont présents dans les sédiments de l'Alzette. En raison de leur abondance dans l'eau de surface, de leur capacité d'attachement et de leur persistance, les bactériophages appartenant au génogroupe II sont également majoritaires dans ce compartiment. La présence hétérogène de potentiels adsorbants tels que les sables fins, les argiles et/ou les minéraux porteurs de fer (goethite) facilite l'attachement de ces bactériophages mais peut également entraîner leur inactivation. En plus des caractéristiques virales et de la nature du sédiment, les conditions environnementales (pH ou composition chimique du milieu) ont également été soulignées dans la littérature comme troisième variable influençant les interactions des particules virales avec leur environnement (Gerba, 1984; Zhuang and Jin, 2008, 2003b). Par exemple, Knappett et al. (2008) mettent en évidence un meilleur attachement du bactériophage

MS2 infectieux sur des grains de sable en présence de cations Ca^{2+} et Zhuang et Jin (2008) ont montré l'influence du pH pour l'attachement à la goethite. Il aurait donc été intéressant de continuer l'étude de la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques dans ce compartiment en caractérisant aussi le pH et la capacité d'échange cationique.

La détection de bactériophages ARN F-spécifiques dans les sédiments de l'Alzette soulève naturellement la question de leur transfert depuis la colonne d'eau. C'est globalement la capacité d'interaction entre les phages et les matières pouvant sédimenter qui définira leur présence et leur concentration dans ce compartiment.

Le suivi *in situ* des bactériophages ARN F-spécifiques dans l'Alzette en conditions de débit de base, par l'intermédiaire du temps de résidence de la masse d'eau, n'a pas permis de mettre en évidence la sédimentation des particules virales sur le tronçon étudié, considéré comme trop court. Les résultats obtenus soulignent cependant la lenteur du processus de sédimentation des particules dans la colonne d'eau. Il serait donc intéressant de reproduire ces expériences *in situ* sur un tronçon de rivière beaucoup plus long, en respectant les mêmes conditions expérimentales, c'est-à-dire sans apport de pollution fécale le long du trajet de l'eau. Néanmoins, des éléments de réponse concernant le transfert des particules virales de la colonne d'eau au sédiment ont été apportés grâce à l'analyse de l'état (libre ou associé à une particule solide) des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans le compartiment eau. Nos résultats démontrent une variation du statut de ces bactériophages infectieux en fonction des conditions hydro-climatologiques. En effet, nous avons montré l'association des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux à des particules potentiellement sédimentables au pic d'une crue et dans une certaine mesure pendant la phase de récession d'une crue. D'autres auteurs ont également observé un statut différent des micro-organismes en période de crue (Characklis et al., 2005; Krometis et al., 2007). Ainsi, le transfert des particules virales de la colonne d'eau au sédiment pourrait avoir lieu après une crue lorsque le débit de la rivière permet leur sédimentation. Qui plus est, des concentrations élevées de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans du sédiment collecté pendant la phase de récession d'une crue corrobore cette hypothèse.

Les événements hydro-climatologiques peuvent également causer la remise en suspension du sédiment et par la même occasion des bactériophages ARN F-spécifiques qui y étaient présents. Cet effet de perturbation naturelle des conditions hydro-dynamiques de la rivière a pu être observé à deux échelles.

Tout d'abord, lorsque le débit de la rivière dépasse $1,99 \text{ m}^3/\text{sec}$ (conditions de débits de base hivernales), des concentrations plus importantes en bactériophages infectieux sont mesurées dans la colonne d'eau. Ce phénomène a précédemment été observé par d'autres auteurs (Skraber et al., 2002; Wilkinson et al., 1995).

De la même manière, une plus forte charge virale a été observée lors d'événements pluvieux. Lors des deux pics de crues analysées, les débits de l'Alzette ont été plus de huit fois supérieurs aux débits de base de la rivière. En raison de ces fortes variations de débits, la conversion en flux (UFP ou cg/sec) des concentrations en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux (UFP/100 mL) et totaux (cg/100 mL) a été nécessaire pour pouvoir comparer les charges virales. De plus, l'analyse en flux permet de se faire une idée plus précise du nombre total de bactériophages par unité de temps présents dans la rivière. Les résultats obtenus mettent clairement en évidence une augmentation des flux en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux et totaux lors de ces deux crues. Des études précédentes ont également montré l'influence des perturbations hydro-climatologiques sur la charge virale dans les eaux de surface (Cole et al., 2003; Hata et al., 2014). Afin d'identifier l'origine de cette pollution virale, une approche pluridisciplinaire couplant des données microbiennes et hydrologiques a été développée.

En hydrologie, l'origine et le transport des particules en suspension dans l'eau de surface, lors d'événements de crue, sont caractérisés par l'analyse d'hystérèses (Karimae Tabarestani and Zarrati, 2014; Smith and Dragovich, 2009). Ces hystérèses, obtenues suite à la mise en relation de la turbidité et du débit de la rivière permettent d'identifier l'origine spatiale du sédiment (Williams, 1989). Appliquée aux bactériophages ARN F-spécifiques infectieux, cette approche hydrologique nous a permis de mettre en évidence deux vagues de pollutions virales au moment des crues (hystérèses en « forme de huit »). La première vague de pollution correspond à l'augmentation rapide du flux en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dès la montée des eaux. La remise en suspension du sédiment, disponible au fond du lit de la rivière, est l'hypothèse principale énoncée en hydrologie pour expliquer cette augmentation (Lawler et al., 2006; Smith and Dragovich, 2009). La présence de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux dans les sédiments de l'Alzette confirme cette hypothèse. Une seconde augmentation du flux en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a été observée en léger décalage après les pics de crue. Etant donné que les particules virales se déplacent à la même vitesse que le débit de la rivière, ce léger décalage signifie que ces bactériophages ARN F-spécifiques ont été importés dans l'Alzette. L'apport des stations d'épuration (Lawler et al., 2006) et/ou le lessivage des surfaces (Williamson et al., 2014) peuvent être à l'origine de cette seconde arrivée de pollution virale dans la rivière. De plus, cet apport exogène de particules en suspension solides, de nature potentiellement différente des particules endogènes à la rivière, peut expliquer l'association préférentielle des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux durant le pic et la phase de récession d'une crue. L'analyse des deux crues à des saisons différentes a également permis de mettre en évidence l'influence des capacités de stockage en eau du bassin versant et des pluies antécédentes agissant respectivement sur l'intensité du lessivage des surfaces et sur la disponibilité de sédiment potentiellement resuspendable.

Dans un second temps, la nature de la pollution fécale apportée pendant les événements de crues a été caractérisée grâce à la quantification et l'identification des génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques totaux (Ogorzaly et al., 2009). Dès la montée des eaux, une augmentation du flux des phages appartenant au génogroupe II a été observée. Cet apport, parallèle à l'augmentation de la turbidité, a donc pu être associé à la remise en suspension du sédiment. La présence majoritaire de bactériophages appartenant au génogroupe II dans les sédiments de l'Alzette corrobore cette hypothèse. Ainsi, la première vague de bactériophages ARN F-spécifiques infectieux observés lors de

ces deux crues serait associée à une contamination fécale d'origine urbaine, suite à l'accumulation de particules virales d'origine anthropique dans le fond du lit de la rivière. L'augmentation plus tardive de la présence du génogroupe I coïncide avec l'arrivée de la seconde vague de pollution virale. La présence de bactériophages ARN F-spécifiques appartenant au génogroupe I étant souvent associée à une contamination d'origine animale (Schaper et al., 2002b), le lessivage des surfaces est donc l'hypothèse majeure de cet apport dans la rivière. Néanmoins, cette distinction entre génogroupes et types de pollution n'est pas absolue puisque d'autres études ont décrit la présence de phages appartenant au génogroupe I dans des eaux usées urbaines (Hartard et al., 2015; Lee et al., 2009). La station d'épuration située au début de notre zone d'étude possède une mauvaise capacité d'épuration du génogroupe I et par conséquent la présence de ces phages dans ces effluents. C'est pourquoi, l'apport de particules virales par la station d'épuration comme autre source possible de cette deuxième vague de pollution, n'est pas à exclure.

Ces apports de pollution virale pendant de telles perturbations hydro-climatologiques peuvent comporter des risques pour la santé humaine. Cette notion de risque a été évaluée dans certaines études par la mise en évidence d'une augmentation de la quantité en génome de virus entériques dans les eaux pendant des crues (Ngaosuwanikul et al., 2013; Sidhu et al., 2012). Cependant, en raison d'une persistance du génome viral plus importante que celle des particules infectieuses (Bertrand et al., 2012; Gassilloud et al., 2003), cette observation ne peut pas être traduite en termes de risque. Dans nos travaux, une importante contribution en particules infectieuses a été observée lors de ces deux crues. Cela peut aisément s'expliquer au vue des sources de pollution fécale identifiées (remise en suspension du sédiment, lessivage des surfaces et station d'épuration). En effet, des études antérieures ont décrit une survie plus longue des particules virales infectieuses dans le sédiment (Nazir et al., 2011; Skrabber et al., 2009). D'autre part, en raison d'un traitement épuratoire inadapté pour l'élimination des virus, les stations d'épuration demeurent des émettrices de particules virales infectieuses. Autre fait marquant de nos résultats, les flux en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux post-crue sont restés élevés malgré la remise à niveau du débit de la rivière. La contribution continue des particules virales infectieuses en post-crue constitue une information primordiale à prendre en compte dans les analyses de risques. En effet, si une dynamique similaire était observée pour des virus entériques pathogènes, les risques encourus par l'Homme suite à un contact direct ou indirect avec de l'eau de surface seraient accrus pendant la crue mais également après.

En somme, grâce à la mise en place d'un échantillonnage à haute fréquence, la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques lors d'événements de crues a pu être mieux appréhendée, avec notamment la compréhension des origines et de la nature de la pollution virale observée. L'arrivée chronologique des bactériophages dans la colonne d'eau suite aux variations hydrologiques corrobore les observations *in situ* obtenues dans des conditions de débit de base de la rivière. Les transferts des bactériophages ARN F-spécifiques de la colonne d'eau au sédiment et sa réciproque ont pu être déterminés et sont étroitement liés aux conditions hydro-climatologiques. De plus, les résultats obtenus au cours de la présente étude offrent de nouvelles informations essentielles concernant l'apport continu de particules virales infectieuses pendant et après une crue, données à considérer dans les études d'évaluation de risque.

En conclusion, grâce à l'approche pluridisciplinaire mise en place dans ce travail de thèse, la dynamique (transport, survie et devenir) des bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière Alzette (Luxembourg) a pu être explicitée aussi bien dans des conditions hydrologiques stables qu'instables. L'application de stratégies et méthodologies originales, tirées du domaine de l'hydrologie comme l'utilisation du temps de résidence de la masse d'eau ou l'échantillonnage automatique à haute fréquence, a permis d'étudier les comportements viraux *in situ*. L'influence des facteurs environnementaux, et plus particulièrement de la température de l'eau, sur la propagation et la survie *in situ* de ces particules infectieuses dans la colonne d'eau a été démontrée. Dans les sédiments, une distribution latérale des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a été mise à jour. Cette particularité a pu être déchiffrée grâce à la combinaison de la caractérisation du sédiment et de l'étude du comportement d'attachement des quatre génogroupes. Enfin, des transferts de particules virales entre la colonne d'eau et les sédiments ont pu être mis en exergue et s'avèrent être fortement dépendants des conditions hydro-climatologiques. Toute cette dynamique et ces processus ont été explicités dans une rivière sous forte influence anthropique. Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude en analysant le transport et le devenir de bactériophages ARN F-spécifiques dans d'autres bassins versants aux caractéristiques physiographiques et hydrologiques différentes, et subissant des pressions anthropiques différentes. Dans ce contexte, la distribution des génogroupes serait certainement toute autre, apportant ainsi de nouveaux éléments de compréhension en relation avec les caractéristiques virales des différents génogroupes. Même s'il est difficile de passer d'études de cas à une théorie générale, l'obtention de ces données supplémentaires permettrait de compléter le puzzle de la dynamique des particules virales dans l'environnement et ainsi aboutir à une meilleure évaluation des risques viraux pour la santé humaine liés à l'utilisation des ressources en eaux.

Références bibliographiques

Références hors publications des chapitres 3, 4 et 5

- Akin, E.W., Hill, W.F., Cline, G.B., Benton, W.H., 1976. The loss of poliovirus 1 infectivity in marine waters. *Water Research* 10, 59–63. doi:10.1016/0043-1354(76)90158-5
- Allwood, P.B., Malik, Y.S., Maherchandani, S., Hedberg, C.W., Goyal, S.M., 2005. Effect of temperature on the survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and *Escherichia coli* in chlorinated water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2, 442–446. doi:10.1128/AEM.69.9.5707-5710.2003
- Armanious, A., Aeppli, M., Jacak, R., Refardt, D., Sigstam, T., Kohn, T., Sander, M., 2015. Viruses at solid-water interfaces: a systematic assessment of interactions driving adsorption. *Environmental Science & Technology* 50, 732–743. doi:10.1021/acs.est.5b04644
- Arnold, J.G., Fohrer, N., 2005. SWAT2000: current capabilities and research opportunities in applied watershed modelling. *Hydrological Processes* 19, 563–572. doi:10.1002/hyp.5611
- Arnold, J.G., Srinivasan, R., Muttiah, R.S., Williams, J.R., 1998. Large area hydrologic modeling and assessment. Part I: Model development. *Journal of the American Water Resources Association* 34, 73–89. doi:10.1111/j.1752-1688.1998.tb05961.x
- Ashbolt, N.J., 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* 198, 229–238. doi:10.1016/j.tox.2004.01.030
- Attinti, R., Wei, J., Kniel, K., Sims, J.T., Jin, Y., 2010. Virus' (MS2, phi X174, and Aichi) attachment on sand measured by atomic force microscopy and their transport through sand columns. *Environmental Science & Technology* 44, 2426–2432. doi:10.1021/es903221p
- Bae, J., Schwab, K.J., 2008. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 477–484. doi:10.1128/AEM.02095-06
- Baffaut, C., Sadeghi, A., C. Baffaut, C., A. Sadeghi, A., 2010. Bacteria modeling with SWAT for assessment and remediation studies: a review. *Transactions of the ASABE* 53, 1585–1594. doi:10.13031/2013.34907
- Baggi, F., Demarta, A., Peduzzi, R., 2001. Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: lack of correlation with indicator bacteria. *Research in Microbiology* 152, 743–751. doi:10.1016/S0923-2508(01)01255-4
- Bai, S., Lung, W.-S.S., 2005. Modeling sediment impact on the transport of fecal bacteria. *Water Research* 39, 5232–5240. doi:10.1016/j.watres.2005.10.013
- Bales, R.C., Li, S., Maguire, K.M., Yahya, M.T., Gerba, C.P., 1993. MS-2 and poliovirus transport in porous media: hydrophobic effects and chemical perturbations. *Water Resources Research* 29, 957–963. doi:10.1029/92WR02986
- Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Margolin, A.B., 2005. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. *Journal of Water and Health* 3, 59–68.
- Barwal, A., Chaudhary, R., 2014. To study the performance of biocarriers in moving bed biofilm reactor (MBBR) technology and kinetics of biofilm for retrofitting the existing aerobic treatment systems: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 13, 285–299. doi:10.1007/s11157-014-9333-7

- Beer, K.D., Gargano, J.W., Roberts, V.A., Hil, V.R. I, Garrison, L.E., Preeta K. Kutty, Elizabeth D. Hilborn, Wade, T.J., Fullerton, K.E., Yoder, J.S., 2015. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water — United States, 2011–2012. *Morbidity and mortality weekly report* 64, 842–848.
- Bellou, M.I., Syngouna, V.I., Tselepi, M.A., Kokkinos, P.A., Paparrodopoulos, S.C., Vantarakis, A., Chrysikopoulos, C. V, 2015. Interaction of human adenoviruses and coliphages with kaolinite and bentonite. *Science of the Total Environment* 517, 86–95. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.036
- Bertrand, I., Schijven, J.F., Sanchez, 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, 1059–1074. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x
- Bitton, G., Chou, Y.-J., Farrah, S.R., 1982. Techniques for virus detection in aquatic sediments. *Journal of Virological Methods* 4, 1–8. doi:10.1016/0166-0934(82)90048-9
- Bollback, J.P., Huelsenbeck, J.P., 2001. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae). *Journal of Molecular Evolution* 52, 117–28. doi:10.1007/s002390010140
- Borrel, G., Colombet, J., Robin, A., Lehours, A.-C., Prangishvili, D., Sime-Ngando, T., 2012. Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater habitat. *The ISME Journal* 6, 2119–2127. doi:10.1038/ismej.2012.49
- Bosch, A., 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *International Microbiology*. doi:10.2436/im.v1i3.39
- Bosch, A., Pintó, R.M., Abad, F.X., 2003. Survival and transport of enteric viruses in the environment, in: *Viruses in Foods*. pp. 151–188. doi:10.1007/0-387-29251-9_6
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 1325–1332. doi:10.1128/AEM.03457-12
- Botero, L., Montiel, M., Porto, L., 1992. Recovery of enteroviruses from water and sediments of lake Maracaibo, Venezuela. *Journal of Environmental Science and Health A27*, 2213–2226.
- Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C., 2012. Removal of MS2, Q β and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Research* 46, 2651–2664. doi:10.1016/j.watres.2012.02.020
- 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*. doi:10.1007/s12560-016-9248-2
- Brion, G.M., Meschke, J.S., Sobsey, M.D., 2002. F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. *Water Research* 36, 2419–2425. doi:10.1016/S0043-1354(01)00547-4
- Bruggink, L.D., Marshall, J.A., 2010. The incidence of norovirus-associated gastroenteritis outbreaks in Victoria, Australia (2002–2007) and their relationship with rainfall. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7, 2822–2827. doi:10.3390/ijerph7072822

- Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society* 60, 309–319. doi:10.1021/ja01269a023
- Brussaard, C.P.D., 2004. Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1506–13. doi:10.1128/AEM.70.3.1506-1513.2004
- Brutschy, B., Hobza, P., 2000. Van der Waals molecules III: introduction. *Chemical Reviews* 100, 3861–3862. doi:10.1021/cr990074x
- Cao, H., Tsai, F.T.-C., Rusch, K.A., 2010. Salinity and soluble organic matter on virus sorption in sand and soil columns. *Ground Water* 48, 42–52. doi:10.1111/j.1745-6584.2009.00645.x
- Carducci, A., Morici, P., Pizzi, F., Battistini, R., Rovini, E., Verani, M., 2008. Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 58, 893–7. doi:10.2166/wst.2008.437
- Carlton, E.J., Eisenberg, J.N.S., Goldstick, J., Cevallos, W., Trostle, J., Levy, K., 2014. Heavy rainfall events and diarrhea incidence: the role of social and environmental factors. *American Journal of Epidemiology* 179, 344–352. doi:10.1093/aje/kwt279
- Carratalà, A., Rodríguez-Manzano, J., Hundesa, A., Rusiñol, M., Fresno, S., Cook, N., Girones, R., 2013. Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces. *International Journal of Food Microbiology* 164, 128–134. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.007
- Cashdollar, J.L., Wymer, L., 2013. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. *Journal of Applied Microbiology* 115, 1–11. doi:10.1111/jam.12143
- Characklis, G.W., Dilts, M.J., Simmons, O.D., Likirdopulos, C.A., Krometis, L.A.H., Sobsey, M.D., 2005. Microbial partitioning to settleable particles in stormwater. *Water Research* 39, 1773–1782. doi:10.1016/j.watres.2005.03.004
- Chattopadhyay, S., Puls, R.W., 1999. Adsorption of bacteriophages on clay minerals. *Environmental Science & Technology* 33, 3609–3614. doi:10.1021/es9811492
- Chigor, V.N., Sibanda, T., Okoh, A.I., 2014. Assessment of the risks for human health of adenoviruses, hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and three source water dams in the Eastern Cape. *Food and Environmental Virology* 6, 87–98. doi:10.1007/s12560-014-9138-4
- Chu, Y., Jin, Y., Yates, M. V., 2000. Virus transport through saturated sand columns as affected by different buffer solutions. *Journal of Environment Quality* 29, 1103. doi:10.2134/jeq2000.00472425002900040010x
- Chung, H., Sobsey, M.D., 1993. Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Water Science and Technology* 27, 425–428.
- Cliver, D., Herrmann, J., 1972. Proteolytic and microbial inactivation of enteroviruses. *Water Research* 6, 797–805. doi:10.1016/0043-1354(72)90032-2
- Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6507–6514. doi:10.1128/AEM.69.11.6507

- Corsi, S.R., Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Hughes, P.E., Baldwin, A.K., 2014. Human and bovine viruses in the Milwaukee River watershed: Hydrologically relevant representation and relations with environmental variables. *Science of the Total Environment* 490, 849–860. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.072
- Crittenden, J.C., Trussell, R.R., Hand, D.W., Howe, K.J., 2005. *MWH's Water Treatment: Principles and Design*. John Wiley and Sons, Inc.
- Crowther, J., Kay, D., Wyer, M.D., 2002. Faecal-indicator concentrations in waters draining lowland pastoral catchments in the UK: Relationships with land use and farming practices. *Water Research* 36, 1725–1734. doi:10.1016/S0043-1354(01)00394-3
- Curriero, F., Patz, J., Rose, J., Lele, S., 2001. Analysis of the association between extreme precipitation and waterborne disease outbreaks in the United States, 1948-1994. *American Journal of Public Health* 91, 1194–1199. doi:10.2105/AJPH.91.8.1194
- Curtis, T.P., Mara, D.D., Silva, S.A., 1992. Influence of pH, oxygen, and humic substances on ability of sunlight to damage fecal coliforms in waste stabilization pond water. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1335–43.
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Trucco, A., Serresi, M., Vanucci, S., 2001. Determination of virus abundance in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1384–1387. doi:10.1128/AEM.67.3.1384-1387.2001
- Davies-Colley, R.J., Donnison, A.M., Speed, D.J., Ross, C.M., Nagels, J.W., 1999. Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilisation ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Research* 33, 1220–1230.
- De Flora, S., De Renzi, G.P., Badolati, G., 1975. Detection of animal viruses in coastal seawater and sediments. *Applied Microbiology* 30, 472–475.
- De Man, H., Van Den Berg, H.H.J.L., Leenen, E.J.T.M., Schijven, J.F., Schets, F.M., Van Der Vliet, J.C., Van Knapen, F., De Roda Husman, A.M., 2014. Quantitative assessment of infection risk from exposure to waterborne pathogens in urban floodwater. *Water Research* 48, 90–99. doi:10.1016/j.watres.2013.09.022
- Deboosere, N., Pinon, A., Caudrelier, Y., Delobel, A., Merle, G., Perelle, S., Temmam, S., Loutreul, J., Morin, T., Estienney, M., Belliot, G., Pothier, P., Gantzer, C., Vialette, M., 2012. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiology* 32, 48–56. doi:10.1016/j.fm.2012.04.007
- Dent, K.C., Thompson, R., Barker, A.M., Hiscox, J.A., Barr, J.N., Stockley, P.G., Ranson, N.A., 2013. The asymmetric structure of an icosahedral virus bound to its receptor suggests a mechanism for genome release. *Structure* 21, 1225–1234. doi:10.1016/j.str.2013.05.012
- Dika, C., Duval, J.F.L., Ly-Chatain, H.M., Merlin, C., Gantzer, C., 2011. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4939–4948. doi:10.1128/AEM.00407-11
- Dika, C., Ly-Chatain, M.H., Francius, G., Duval, J.F.L., Gantzer, C., 2013. Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 435, 178–187. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.02.045

- Dorner, S.M., Anderson, W.B., Slawson, R.M., Kouwen, N., Huck, P.M., 2006. Hydrologic modeling of pathogen fate and transport. *Environmental Science & Technology* 40, 4746–4753. doi:10.1021/es060426z
- Dowd, S.E., Pillai, S.D., Wang, S., Corapcioglu, M.Y., 1998. Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 405–10.
- Droppo, I.G., 2003. A new definition of suspended sediment: implications for the measurement and prediction of sediment transport. *Erosion and Sediment Transport Measurement in Rivers: Technological and Methodological Advances* 283, 3–12.
- Droppo, I.G., King, K., Tirado, S.M., Sousa, A., Wolfaardt, G., Liss, S.N., Warren, L.A., 2010. Assessing riverine sediment - pathogen dynamics: implications for the management of aquatic and human health risk. *Sediment Dynamics for a Changing Future* 337, 245–250.
- Duhamel, S., Jacquet, S., 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods* 64, 316–332. doi:10.1016/j.mimet.2005.05.008
- Durán, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., Jofre, J., 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. *Journal of Applied Microbiology* 92, 338–347. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01536.x
- Ebdon, J., Muniesa, M., Taylor, H., 2007. The application of a recently isolated strain of *Bacteroides* (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. *Water Research* 41, 3683–3690. doi:10.1016/j.watres.2006.12.020
- Eischeid, A.C., Thurston, J.A., Linden, K.G., 2011. UV disinfection of adenovirus: present state of the research and future directions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41, 1375–1396. doi:10.1080/10643381003608268
- Farrah, S.R., Shah, D.O., Ingram, L.O., 1981. Effects of chaotropic and antichaotropic agents on elution of poliovirus adsorbed on membrane filters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 1229–32.
- Fauvel, B., Cauchie, H.-M., Gantzer, C., Ogorzaly, L., 2016a. Contribution of hydrological data to the understanding of the spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events. *Water Research* 94, 328–340. doi:10.1016/j.watres.2016.02.057
- Fauvel, B., Gantzer, C., Cauchie, H.-M., Ogorzaly, L., 2016b. In situ of F-specific RNA bacteriophages in a small river: new way to assess viral propagation in water quality studies. *Food and Environmental Virology* In press, 1–14. doi:10.1007/s12560-016-9266-0
- Fauvel, B., Ogorzaly, L., Cauchie, H.-M., Gantzer, C., 2017. Interactions of infectious F-specific RNA bacteriophages with suspended matter and sediment: towards an understanding of FRNAPH distribution in a river water system. *The Science of the total environment* 574, 960–968. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.115
- 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 Q β . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30, 549–552.
- Fergusson, C., Husman, A.M. de R., Altavilla, N., Deere, D., Ashbolt, N., 2003. Fate and transport of surface water pathogens in watersheds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33, 299–361.

- Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G., Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F., Raeymaeckers, A., Van de Berghe, A., Volckaert, G., Ysebaert, M., 1976. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 260, 643–645.
- Fisher, M.B., Love, D.C., Schuech, R., Nelson, K.L., 2011. Simulated sunlight action spectra for inactivation of MS2 and PRD1 bacteriophages in clear water. *Environmental Science & Technology* 45, 9249–9255. doi:10.1021/es201875x
- Fong, T.-T., Lipp, E.K., 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiology and molecular biology reviews* 69, 357–371. doi:10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005
- Foppen, J.W.A., Okletey, S., Schijven, J.F., 2006. Effect of goethite coating and humic acid on the transport of bacteriophage PRD1 in columns of saturated sand. *Journal of Contaminant Hydrology* 85, 287–301. doi:10.1016/j.jconhyd.2006.02.004
- Frey, S.K., Gottschall, N., Wilkes, G., Grégoire, D.S., Topp, E., Pintar, K.D.M., Sunohara, M., Marti, R., Lapen, D.R., 2015. Rainfall-induced runoff from exposed streambed sediments: an important source of water pollution. *Journal of Environment Quality* 44, 236. doi:10.2134/jeq2014.03.0122
- Friedman, S.D., Snellgrove, W.C., Genthner, F.J., 2012. Genomic sequences of two novel Levivirus single-stranded RNA coliphages (family Leviviridae): evidence for recombination in environmental strains. *Viruses* 4, 1548–1568. doi:10.3390/v4091548
- Fujioka, R.S., Loh, P.C., Lau, L.S., 1980. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 1105–10.
- Fujioka, R.S., Yoneyama, B.S., 2002. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. *Water Science and Technology* 46, 291–295.
- Gall, A.M., Mariñas, B.J., Lu, Y., Shisler, J.L., 2015. Waterborne viruses: a barrier to safe drinking water. *PLOS Pathogens* 11, e1004867. doi:10.1371/journal.ppat.1004867
- Gantzer, C., Quignon, F., Schwartzbrod, L., 1994. Poliovirus 1 adsorption onto and desorption from montmorillonite in seawater. Survival of the adsorbed virus. *Environmental Technology* 15, 271–278. doi:10.1080/09593339409385428
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of viral genomes in mineral water : a sufficient condition to assume infectious risk ? *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3965–69. doi:10.1128/AEM.69.7.3965
- Geldenhuis, J.C., Pretorius, P.D., 1989. The occurrence of enteric viruses in polluted water, correlation to indicator organisms and factors influencing their numbers. *Water Science and Technology* 21, 105–109.
- Gerba, C.P., 2007. Virus occurrence and survival in the environmental waters. *Perspectives in Medical Virology* 17, 91–108.
- Gerba, C.P., 2005. Survival of Viruses in the Marine Environment, in: *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. Springer US, Boston, MA, pp. 133–142. doi:10.1007/0-387-23709-7_6

- Gerba, C.P., 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Advances in Applied microbiology* 30, 133–168.
- Gerba, C.P., Goyal, S.M., 1982. *Methods in environmental virology*. M. Dekker.
- Gerba, C.P., Goyal, S.M., Hurst, C.J., Labelle, R.L., 1980. Type and strain dependence of enterovirus adsorption to activated sludge, soils and estuarine sediments. *Water Research* 14, 1197–1198. doi:10.1016/0043-1354(80)90176-1
- Gerba, C.P., Gramos, D.M., Nwachuku, N., 2002. Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5167–5169. doi:10.1128/AEM.68.10.5167-5169.2002
- Gerba, C.P., Schaiberger, G.E., 1975. Effect of particulates on virus survival in seawater. *Journal - Water Pollution Control Federation* 47, 93–103.
- Gerba, C.P., Smith, E.M., Melnick, J.L., 1977. Development of a quantitative method for detecting enteroviruses in development of a quantitative method for detecting enteroviruses in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 34, 158–163.
- Ghimire, B., Deng, Z., 2013. Hydrograph-based approach to modeling bacterial fate and transport in rivers. *Water Research* 47, 1329–1343. doi:10.1016/j.watres.2012.11.051
- Gibson, K.E., 2014. Viral pathogens in water: occurrence, public health impact, and available control strategies. *Current Opinion in Virology* 4, 50–57. doi:10.1016/j.coviro.2013.12.005
- Golmohammadi, R., Fridborg, K., Bundule, M., Valegård, K., Liljas, L., 1996. The crystal structure of bacteriophage Qbeta at 3.5 Å resolution. *Structure* 4, 543–554. doi:10.1006/jmbi.2001.5077
- Grabow, W.O.K., 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA* 27, 251–268. doi:10.4314/wsa.v27i2.4999
- Grant, S., List, E., Lidstrom, M., 1993. Kinetic analysis of virus adsorption and inactivation in batch experiments. *Water Resources Research* 29, 2067–2085. doi:10.1029/93WR00757
- Green, D.H., Lewis, G.D., 1999. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture. *Water Research* 33, 1195–1200. doi:10.1016/S0043-1354(98)00313-3
- Grøndahl-Rosado, R.C., Yarovitsyna, E., Trettenes, E., Myrmel, M., Robertson, L.J., 2014. A one year study on the concentrations of norovirus and enteric adenoviruses in wastewater and a surface drinking water source in Norway. *Food and Environmental Virology* 6, 232–245. doi:10.1007/s12560-014-9161-5
- Gutierrez, L., Mylon, S.E., Nash, B., Nguyen, T.H., 2010. Deposition and aggregation kinetics of rotavirus in divalent cation solutions. *Environmental Science & Technology* 44, 4552–4557. doi:10.1021/es100120k
- Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2007. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *Journal of Virological Methods* 144, 41–48. doi:10.1016/j.jviromet.2007.03.017
- Hall, A., 2012. Noroviruses: the perfect human pathogens? *The Journal of Infectious Diseases* 11, 1622–1624. doi:doi: 10.1093/infdis/jis251
- Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M., 2015. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage

- genogroups at a wastewater treatment plant. *Science of the Total Environment* 520, 32–38. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.034
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., Kunikane, S., 2009. Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan. *Water Research* 43, 3759–3764. doi:10.1016/j.watres.2009.05.043
- Haramoto, E., Otagiri, M., Morita, H., Kitajima, M., 2012. Genogroup distribution of F-specific coliphages in wastewater and river water in the Kofu basin in Japan. *Letters in Applied Microbiology* 54, 367–373. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03221.x
- Hargreaves, K.R., Anderson, N.J., Clokie, M.R.J., 2013. Recovery of viable cyanophages from the sediments of a eutrophic lake at decadal timescales. *FEMS Microbiology Ecology* 83, 450–456. doi:10.1111/1574-6941.12005
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., Gantzer, C., 2015. Occurrence of and sequence variation among F-specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 6505–6515. doi:10.1128/AEM.01905-15
- Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., 2016. Quantitative distribution of infectious F-specific RNA phage genotypes in surface waters. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 4244–4252. doi:10.1128/AEM.00621-16
- Hata, A., Katayama, H., Kojima, K., Sano, S., Kasuga, I., Kitajima, M., Furumai, H., 2014. Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows. *Science of the Total Environment* 468–469, 757–763. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.093
- Havelaar, A.H., Farrah, S.R., Jofre, J., Kettratanakul, A., Martins, M.T., Ohgaki, S., Sobsey, M.D., Zaiss, U., 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research* 25, 529–545. doi:10.1016/0043-1354(91)90126-B
- Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M., 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *Journal of Applied Bacteriology* 56, 439–447. doi:10.1111/j.1365-2672.1984.tb01372.x
- Havelaar, A.H., Van Olphen, M., Drost, Y.C., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2956–2962.
- He, X., Wei, Y., Cheng, L., Zhang, D., Wang, Z., 2012. Molecular detection of three gastroenteritis viruses in urban surface waters in Beijing and correlation with levels of fecal indicator bacteria. *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 5563–5570. doi:10.1007/s10661-011-2362-6
- Hébrant, M., Pelleïeux, S., Mathieu, L., Skali-Lami, S., Gantzer, C., Bertrand, I., Block, J.-C., 2014. Distinct adsorption kinetics of Q β and GA bacteriophages on drinking water biofilms. *Adsorption* 20, 823–828. doi:10.1007/s10450-014-9624-x
- Heisenberg, M., 1966. Formation of defective bacteriophage particles by fr amber mutants. *Journal of Molecular Biology* 17, 136–144. doi:10.1016/S0022-2836(66)80100-6
- Hejkal, T.W., Wellings, F.M., Lewis, A.L., LaRock, P.A., 1981. Distribution of viruses associated with particles in wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 628–634.
- Hofstra, N., 2011. Quantifying the impact of climate change on enteric waterborne pathogen

- concentrations in surface water. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3, 471–479. doi:10.1016/j.cosust.2011.10.006
- Huang, Z.-M., Hsu, B.-M., Kao, P.-M., Chang, T.-Y., Hsu, T.-K., Ho, Y.-N., Yang, Y.-C., Huang, Y.-L., 2015. Prevalence, quantification, and typing of human adenoviruses detected in river water in Taiwan. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 8359–8366. doi:10.1007/s11356-014-4000-7
- Hunter, P.R., 2003. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *Journal of Applied Microbiology* 94, 37S–46S. doi:10.1046/j.1365-2672.94.s1.5.x
- Hurst, C.J., Benton, W.H., McClellan, K.A., 1989. Thermal and water source effects upon the stability of enteroviruses in surface freshwaters. *Canadian Journal of Microbiology* 35, 474–80.
- Hurst, C.J., Gerba, C.P., Cech, I., 1980. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 1067–79.
- Ikner, L.A., Gerba, C.P., Bright, K.R., 2012. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food and Environmental Virology* 4, 41–67. doi:10.1007/s12560-012-9080-2
- Inoue, K., Motomura, K., Boonchan, M., Takeda, N., Ruchusatsawa, K., Guntapong, R., Tacharoenmuang, R., Sangkitporn, S., Chantaroj, S., 2016. Molecular detection and characterization of noroviruses in river water in Thailand. *Letters in Applied Microbiology* 62, 243–249. doi:10.1111/lam.12529
- Jakubowska-Deredas, M., Jurczak-Kurek, A., Richert, M., Łoś, M., Narajczyk, M., Wróbel, B., 2012. Diversity of tailed phages in Baltic Sea sediment: large number of siphoviruses with extremely long tails. *Research in Microbiology* 163, 292–6. doi:10.1016/j.resmic.2012.02.002
- Jamieson, R., Gordon, R., Joy, D., Lee, H., 2004. Assessing microbial pollution of rural surface waters: a review of current watershed scale modeling approaches. *Agricultural Water Management* 70, 1–17. doi:10.1016/j.agwat.2004.05.006
- Jamieson, R.C., Joy, D.M., Lee, H., Kostaschuk, R., Gordon, R.J., 2005. Resuspension of sediment-associated in a natural stream. *Journal of Environment Quality* 34, 581. doi:10.2134/jeq2005.0581
- Jiang, S., Noble, R., Chu, W., 2001. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of southern California. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 179–184. doi:10.1128/AEM.67.1.179-184.2001
- Jin, Y., Yates, M. V., Thompson, S.S., Jury, W.A., 1997. Sorption of viruses during flow through saturated sand columns. doi:10.1021/ES9604323
- Jofre, J., 2009. Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? *Journal of Applied Microbiology* 106, 1059–1069. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03957.x
- Jofre, J., 2007. Indicators of waterborne enteric viruses. *Perspectives in Medical Virology*, *Perspectives in Medical Virology* 17, 227–249. doi:10.1016/S0168-7069(07)17011-7
- Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2010. Water-borne infectious disease outbreaks associated with water scarcity and rainfall events. *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 147–159. doi:10.1007/698_2009_22

- Jofre, J., Blasi, M., Bosch, A., Lucena, F., 1989. Occurrence of bacteriophages infecting bacteroides fragilis and other viruses in polluted marine sediments. *Water Science and Technology* 21, 15–19.
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A., Muniesa, M., 2016. Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water* 8, 199. doi:10.3390/w8050199
- John, D.E., Rose, J.B., 2005. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environmental Science & Technology* 39, 7345–7356. doi:10.1021/es047995w
- Kapuscinski, R.B., Mitchell, R., 1980. Processes controlling virus inactivation in coastal waters. *Water Research* 14, 363–371. doi:10.1016/0043-1354(80)90084-6
- Karimae Tabarestani, M., Zarrati, A.R., 2014. Sediment transport during flood event: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12, 775–788. doi:10.1007/s13762-014-0689-6
- Katayama, H., Okuma, K., Furumai, H., Ohgaki, S., 2004. Series of surveys for enteric viruses and indicator organisms in Tokyo Bay after an event of combined sewer overflow. *Water Science and Technology* 50, 259–262.
- Kim, J.-W., Pachepsky, Y.A., Shelton, D.R., Coppock, C., 2010. Effect of streambed bacteria release on E. coli concentrations: monitoring and modeling with the modified SWAT. *Ecological Modelling* 221, 1592–1604. doi:10.1016/j.ecolmodel.2010.03.005
- Kim, J., Van Der Bruggen, B., 2010. The use of nanoparticles in polymeric and ceramic membrane structures: Review of manufacturing procedures and performance improvement for water treatment. *Environmental Pollution* 158, 2335–2349. doi:10.1016/j.envpol.2010.03.024
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), 2012. *Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*, Elsevier A. ed.
- Kirs, M., Smith, D.C., 2007. Multiplex quantitative real-time reverse transcriptase PCR for F-specific RNA coliphages: A method for use in microbial source tracking. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 808–814. doi:10.1128/AEM.00399-06
- Kishida, N., Morita, H., Haramoto, E., Asami, M., Akib, M., 2012. One-year weekly survey of noroviruses and enteric adenoviruses in the Tone River water in Tokyo metropolitan area, Japan. *Water Research* 46, 2905–2910.
- Kistemann, T., Classen, T., Koch, C., Dangendorf, F., Fischeder, R., Gebel, J., Vacata, V., Exner, M., 2002. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 2188–2197. doi:10.1128/AEM.68.5.2188-2197.2002
- Klovins, J., Overbeek, G.P., van den Worm, S.H.E., Ackermann, H.-W.W., van Duin, J., van den Worm, S.H.E., Overbeek, G.P., van Duin, J., 2002. Nucleotide sequence of a ssRNA phage from Acinetobacter: Kinship to coliphages. *Journal of General Virology* 83, 1523–1533. doi:10.1099/0022-1317-83-6-1523
- Knappett, P.S.K., Emelko, M.B., Zhuang, J., McKay, L.D., 2008. Transport and retention of a bacteriophage and microspheres in saturated, angular porous media: effects of ionic strength and grain size. *Water Research* 42, 4368–4378.
- Kohn, T., Grandbois, M., McNeill, K., Nelson, K.L., 2007. Association with natural organic matter

- enhances the sunlight-mediated inactivation of MS2 coliphage by singlet oxygen. *Environmental Science & Technology* 41, 4626–32.
- Kohn, T., Nelson, K.L., 2007. Sunlight-mediated inactivation of MS2 coliphage via exogenous singlet oxygen produced by sensitizers in natural waters. *Environmental Science & Technology* 41, 192–197. doi:10.1021/es061716i
- Koning, R., Van Den Worm, S., Plaisier, J.R., Van Duin, J., Abrahams, J.P., Koerten, H., 2003. Visualization by cryo-electron microscopy of genomic RNA that binds to the protein capsid inside bacteriophage MS2. *Journal of Molecular Biology* 332, 415–422. doi:10.1016/S0022-2836(03)00846-5
- Kozak, M., Nathans, D., 1971. Fate of maturation protein during infection by coliphage MS2. *Nature: New biology* 234, 209–211. doi:10.1038/10.1038/newbio234209a0
- Krometis, L.A.H., Characklis, G.W., Simmons, O.D., Dilts, M.J., Likirdopulos, C.A., Sobsey, M.D., 2007. Intra-storm variability in microbial partitioning and microbial loading rates. *Water Research* 41, 506–516. doi:10.1016/j.watres.2006.09.029
- Kutz, S.M., Gerba, C.P., 1988. Comparison of virus survival in freshwater sources. *Water Science and Technology* 20, 467–471.
- La Rosa, G., Pourshaban, M., Iaconelli, M., Muscillo, M., 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 46, 266–273. doi:10.1590/S0021-25712010000300007
- LaBelle, R.L., Gerba, C.P., 1982. Investigations into the protective effect of estuarine sediment on virus survival. *Water Research* 16, 469–478. doi:10.1016/0043-1354(82)90173-7
- LaBelle, R.L., Gerba, C.P., 1979. Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 93–101.
- LaBelle, R.L., Gerba, C.P., Goyal, S.M., Melnick, J.L., Bogdan, G.F., Cech, I., Bogdan, G.F., 1980. Occurrence of enteric viruses in estuarine sediments relationships between environmental factors, bacterial indicators, and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 588–596.
- Lance, J.C., Gerba, C.P., 1984. Effect of ionic composition of suspending solution on virus adsorption by a soil column. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 484–8.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J.F.L., Gantzer, C., 2008a. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes. *Water Research* 42, 2769–2777. doi:10.1016/j.watres.2008.02.007
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C., Duval, J.F.L., 2008b. Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophysical journal* 94, 3293–3312. doi:10.1529/biophysj.107.115477
- Langlet, J., Ogorzaly, L., Schrotter, J.-C., Machinal, C., Gaboriaud, F., Duval, J.F.L., Gantzer, C., 2009. Efficiency of MS2 phage and Q β phage removal by membrane filtration in water treatment: Applicability of real-time RT-PCR method. *Journal of Membrane Science* 326, 111–116. doi:10.1016/j.memsci.2008.09.044
- Larsson, C., Andersson, Y., Allestam, G., Lindqvist, A., Nenonen, N., Bergstedt, O., 2014. Epidemiology and estimated costs of a large waterborne outbreak of norovirus infection in Sweden.

- Epidemiology and Infection 142, 592–600. doi:10.1017/S0950268813001209
- Lawler, D.M., Petts, G.E., Foster, I.D.L., Harper, S., 2006. Turbidity dynamics during spring storm events in an urban headwater river system: The Upper Tame, West Midlands, UK. *Science of the Total Environment* 360, 109–126. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.08.032
- Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D., Pommepuy, M., 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3665–3671.
- Lee, J.E., Lee, H., Cho, Y.-H., Hur, H.-G., Ko, G., 2011. F+ RNA coliphage-based microbial source tracking in water resources of South Korea. *Science of the Total Environment* 412–413, 127–131. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.061
- Lee, J.E., Lim, M.Y., Kim, S.Y., Lee, S., Lee, H., Oh, H.-M., Hur, H.-G., Ko, G., 2009. Molecular characterization of bacteriophages for microbial source tracking in Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7107–7114. doi:10.1128/AEM.00464-09
- Leroy, M., Prigent, M., Dutertre, M., Confaloneri, F., Dubow, M., 2008. Bacteriophage morphotype and genome diversity in Seine River sediment. *Freshwater Biology* 53, 1176–1185. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.01985.x
- Liew, P.F., Gerba, C.P., 1980. Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 305–308.
- Liga, M. V., Bryant, E.L., Colvin, V.L., Li, Q., 2011. Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment. *Water Research* 45, 535–544. doi:10.1016/j.watres.2010.09.012
- Lipson, S.M., Stotzky, G., 1985. Specificity of virus adsorption to clay minerals. *Canadian Journal of Microbiology* 31, 50–53. doi:10.1139/m85-011
- Lipson, S.M., Stotzky, G., 1984. Effect of proteins on reovirus adsorption to clay minerals. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 525–30.
- Lipson, S.M., Stotzky, G., 1983. Adsorption of reovirus to clay minerals: effects of cation-exchange capacity, cation saturation, and surface area. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 673–82.
- Lo, S., Gilbert, J., Hetrick, F., 1976. Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. *Applied and Environmental Microbiology* 32, 245–9.
- Lodder, W.J., Van Den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S.A., De Roda Husman, A.M., 2010. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 5965–5971. doi:10.1128/AEM.00245-10
- Long, S.C., Sobsey, M.D., 2004. A comparison of the survival of F+RNA and F+DNA coliphages in lake water microcosms. *Journal of Water and Health* 2, 15–22.
- Lopman, B., Reacher, M., van Duynhoven, Y., Hanon, F., Brown, D., Koopmans, M., 2003. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000.
- Love, D.C., Vinjé, J., Khalil, S.M., Murphy, J., Lovelace, G.L., Sobsey, M.D., 2008. Evaluation of RT-PCR and reverse line blot hybridization for detection and genotyping F+ RNA coliphages from estuarine waters and molluscan shellfish. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1203–1212.

doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03646.x

- Lucena, F., Araujo, R., Jofre, J., 1996. Usefulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution. *Water Research* 30, 2812–2816. doi:10.1016/S0043-1354(96)00193-5
- Lucena, F., Méndez, X., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Guerrero, A., Cárdenas, M., Gantzer, C., Schwartzbrood, L., Skrabber, S., Jofre, J., 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 1748–1752. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x
- Lukasik, J., Scott, T.M., Andryshak, D., Farrah, S.R., 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2914–2920. doi:10.1128/AEM.66.7.2914-2920.2000
- Lytle, C.D., Routson, L.B., 1995. Minimized virus binding for tests of barrier materials. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 643–9.
- Maranger, R., Bird, D.F., 1996. High concentrations of viruses in the sediments of Lac Gilbert, Québec. *Microbial Ecology* 31, 141–151. doi:10.1007/BF00167860
- Marie, D., Brussaard, C.P.D., Thyraug, R., Bratbak, G., Vaulot, D., 1999. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 45–52.
- Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K., Herman, L., Coillie, E. Van, Uyttendaele, M., Thiry, E., 2012. A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. *Food and Environmental Virology* 4, 131–152. doi:10.1007/s12560-012-9091-z
- Mauffret, A., Caprais, M.P., Gourmelon, M., 2012. Relevance of Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophages for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5143–5152. doi:10.1128/AEM.00315-12
- McDonald, A., Kay, D., 1981. Enteric bacterial concentrations in reservoir feeder streams: baseflow characteristics and response to hydrograph events. *Water Research* 15, 961–968. doi:10.1016/0043-1354(81)90203-7
- Medema, G., Shaw, S., Waite, M., Snozzi, M., Morreau, A., Grabow, W., 2003. Catchment characterisation and source water quality. *Assessing Microbial Safety of Drinking Water World Heal*, 111–58.
- Melnick, J.L., Gerba, C.P., Berg, G., 1980. The ecology of enteroviruses in natural waters. *C.R.C. Critical Reviews in Environmental Control* 10, 65–93. doi:10.1080/10643388009381677
- Michen, B., Graule, T., 2010. Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology* 109, 388–397. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x
- Mix, T.W., 1974. The physical chemistry of membrane-virus interaction. *Dev. Ind. Microbiol.* 15, 136–142.
- Mocé-Llivina, L., Lucena, F., Jofre, J., 2005. Enteroviruses and bacteriophages in bathing waters. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6838–6844. doi:10.1128/AEM.71.11.6838-6844.2005

- Moce-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F., Jofre, J., 2003. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1452–1456. doi:10.1128/AEM.69.3.1452-1456.2003
- Monpoeho, S., Maul, A., Mignotte-Cadiergues, B., Schwartzbrod, L., Billaudel, S., Ferré, V., 2001. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2484–8. doi:10.1128/AEM.67.6.2484-2488.2001
- Moore, R.S., Taylor, D.H., Reddy, M.M., Sturman, L.S., 1982. Adsorption of reovirus by minerals and soils. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 852–9.
- Muniesa, M., Lucena, F., Blanch, A.R., Payán, A., Jofre, J., 2012. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Research* 46, 6410–6418. doi:10.1016/j.watres.2012.09.015
- Muniesa, M., Payan, A., Moce-Llivina, L., Blanch, A.R., Jofre, J., 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. *Water Research* 43, 1559–1564. doi:10.1016/j.watres.2008.12.038
- Mwanamoki, P.M., Devarajan, N., Thevenon, F., Atibu, E.K., Tshibanda, J.B., Ngelinkoto, P., Mpiana, P.T., Prabakar, K., Mubedi, J.I., Kabele, C.G., Wildi, W., Poté, J., 2014. Assessment of pathogenic bacteria in water and sediment from a water reservoir under tropical conditions (Lake Ma Vallée), Kinshasa Democratic Republic of Congo. *Environmental Monitoring and Assessment* 186, 6821–30. doi:10.1007/s10661-014-3891-6
- Nasser, A.M., Oman, S.D., 1999. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Research* 33, 1748–1752. doi:10.1016/S0043-1354(98)00380-7
- Nazir, J., Haumacher, R., Ike, A.C., Marschang, R.E., 2011. Persistence of avian influenza viruses in lake sediment, duck feces, and duck meat. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4981–4985. doi:10.1128/AEM.00415-11
- Ngaosuwankul, N., Thippornchai, N., Yamashita, A., Vargas, R.E.M., Tunyong, W., Mahakunkijchareon, Y., Ikuta, K., Singhasivanon, P., Okabayashi, T., Leaungwutiwong, P., 2013. Detection and characterization of enteric viruses in flood water from the 2011 Thai flood. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 66, 398–403. doi:10.7883/yoken.66.398
- Niazi, M., Obropta, C., Miskewitz, R., 2015. Pathogen transport and fate modeling in the Upper Salem River Watershed using SWAT model. *Journal of Environmental Management* 151, 167–177. doi:10.1016/j.jenvman.2014.12.042
- Nichols, G., Lane, C., Asgari, N., Verlander, N.Q., Charlett, A., 2009. Rainfall and outbreaks of drinking water related disease and in England and Wales. *Journal of Water and Health* 7, 1–8. doi:10.2166/wh.2009.143
- Nigel J. Dimmiok, 1967. Differences between the thermal inactivation of picornaviruses at “high” and “low” temperatures. *Virology* 31, 338–353.
- Nordgren, J., Matussek, A., Mattsson, A., Svensson, L., Lindgren, P.-E., 2009. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research* 43, 1117–1125. doi:10.1016/j.watres.2008.11.053
- O’Brien, R.T., Newman, J.S., 1977. Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water.

- Applied and Environmental Microbiology 33, 334–40.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 8019–8025. doi:10.1128/AEM.00917-10
- Ogorzaly, L., Gantzer, C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods* 138, 131–139. doi:10.1016/j.jviromet.2006.08.004
- 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, 1257–1264. doi:10.1016/j.watres.2008.12.011
- 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 and Environmental Virology* 7, 112–121. doi:10.1007/s12560-015-9194-4
- Panasiuk, O., Hedström, A., Marsalek, J., Ashley, R.M., Viklander, M., 2015. Contamination of stormwater by wastewater: a review of detection methods. *Journal of Environmental Management* 152, 241–250. doi:10.1016/j.jenvman.2015.01.050
- Payment, P., Morin, E., Trudel, M., 1988. Coliphages and enteric viruses in the particulate phase of river water. *Canadian Journal of Microbiology* 34, 907–910.
- Payment, P., Plante, R., Cejka, P., 2001. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Canadian Journal of Microbiology* 47, 188–193. doi:10.1139/w00-143
- Pepper, I.L., Gerba, C.P., Maier, R.M., 2009. *Environmental microbiology (Second Edition): Chapitre 8: Environmental sample collection and processing*, Elsevier I. ed.
- Pérez-Sautu, U., Sano, D., Guix, S., Kasimir, G., Pintó, R.M., Bosch, A., 2012. Human norovirus occurrence and diversity in the Llobregat river catchment, Spain. *Environmental Microbiology* 14, 494–502. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02642.x
- Petrinca, A.R., Donia, D., Pierangeli, A., Gabrieli, R., Degener, A.M., Bonanni, E., Diaco, L., Cecchini, G., Anastasi, P., Divizia, M., 2009. Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *Journal of applied microbiology* 106, 1608–17. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04128.x
- Pham, M., Mintz, E.A., Nguyen, T.H., 2009. Deposition kinetics of bacteriophage MS2 to natural organic matter: role of divalent cations. *Journal of colloid and interface science* 338, 1–9. doi:10.1016/j.jcis.2009.06.025
- Phanuwan, C., Takizawa, S., Oguma, K., Katayama, H., Yunika, A., Ohgaki, S., 2006. Monitoring of human enteric viruses and coliform bacteria in waters after urban flood in Jakarta, Indonesia. *Water Science and Technology* 54, 203. doi:10.2166/wst.2006.470
- Philippe, A., Schaumann, G.E., 2014. Interactions of dissolved organic matter with natural and engineered inorganic colloids: a review. *Environmental Science & Technology* 48, 8946–8962. doi:10.1021/es502342r
- Plattes, M., Henry, E., Schosseler, P.M., Weidenhaupt, A., 2006. Modelling and dynamic simulation of a moving bed bioreactor for the treatment of municipal wastewater. *Biochemical Engineering*

Journal 32, 61–68. doi:10.1016/j.bej.2006.07.009

- Prado, T., Silva, D.M., Guilayn, W.C., Rose, T.L., Gaspar, A.M.C., Miagostovich, M.P., 2011. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Research* 45, 1287–1297. doi:10.1016/j.watres.2010.10.012
- Prevost, B., Lucas, F.S., Ambert-Balay, K., Pothier, P., Moulin, L., Wurtzer, S., 2015a. Deciphering the diversities of astroviruses and noroviruses in wastewater treatment plant effluents by a high-throughput sequencing method. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 7215–7222. doi:10.1128/AEM.02076-15
- Prevost, B., Lucas, F.S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L., Wurtzer, S., 2015b. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment international* 79, 42–50. doi:10.1016/j.envint.2015.03.004
- Qu, X., Brame, J., Li, Q., Alvarez, P.J.J., 2013. Nanotechnology for a safe and sustainable water supply: enabling integrated water treatment and reuse. *Accounts of Chemical Research* 46, 834–843. doi:10.1021/ar300029v
- Rao, V.C., Metcalf, T.G., Melnick, J.L., 1986. Human viruses in sediments, sludges, and soils. *Bulletin of the World Health Organization* 64, 1–14.
- Rao, V.C., Seidel, K.M., Goyal, S.M., Metcalf, T.G., Melnick, J.L., 1984. Isolation of enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 48, 404–409.
- Ravva, S. V., Sarreal, C.Z., 2016. Persistence of F-specific RNA coliphages in surface waters from a produce production region along the central coast of California. *PloS one* 11. doi:10.1371/journal.pone.0146623
- Robert, R., 2010. *Les sciences revisitées. tome 1.*
- Roberts, J.W., Steitz, A.J.E., 1967. The reconstitution of infective bacteriophage R17. *Microbiology* 1416–1421.
- Rodríguez, R.A., Gundy, P.M., Rijal, G.K., Gerba, C.P., 2012. The impact of combined sewage overflows on the viral contamination of receiving waters. *Food and Environmental Virology* 4, 34–40. doi:10.1007/s12560-011-9076-3
- Romero, O.C., Straub, A.P., Kohn, T., Nguyen, T.H., 2011. Role of temperature and Suwannee River natural organic matter on inactivation kinetics of rotavirus and bacteriophage MS2 by solar irradiation. *Environmental Science & Technology* 45, 10385–10393.
- Sadeghi, G., Schijven, J.F., Behrends, T., Hassanizadeh, S.M., Gerritse, J., Kleingeld, P.J., 2011. Systematic study of effects of pH and ionic strength on attachment of phage PRD1. *Ground Water* 49, 12–19. doi:10.1111/j.1745-6584.2010.00767.x
- Schaldach, C.M., Bourcier, W.L., Shaw, H.F., Viani, B.E., Wilson, W.D., 2006. The influence of ionic strength on the interaction of viruses with charged surfaces under environmental conditions. *Journal of Colloid and Interface Science* 294, 1–10. doi:10.1016/j.jcis.2005.06.082
- Schaper, M., Duran, A.E., Jofre, J., Durán, A.E., Jofre, J., 2002a. Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3702–3707. doi:10.1128/AEM.68.8.3702-

3707.2002

- Schaper, M., Jofre, J., Uys, M., Grabow, W.O.K., 2002b. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *Journal of Applied Microbiology* 92, 657–667. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01600.x
- Schaub, S. a, Sagik, B.P., 1975. Association of enteroviruses with natural and artificially introduced colloidal solids in water and infectivity of solids-associated virions. *Applied Microbiology* 30, 212–222.
- Schijven, J.F., Hassanizadeh, S.M., 2000. Removal of viruses by soil passage: overview of modeling, processes, and parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30, 49–127. doi:10.1080/10643380091184174
- Schijven, J.F., Hassanizadeh, S.M., Dowd, S.E., Pillai, S.D., 2000. Modeling virus adsorption in batch and column experiments. *Quantitative Microbiology* 2, 5–20. doi:10.1023/A:1010062728286
- Senhorst, H.A.J., Zwolsman, J.J.G., 2005. Climate change and effects on water quality: a first impression. *Water Science and Technology* 51, 53–59.
- Servais, P., Garcia-Armisen, T., George, I., 2007. Fecal bacteria in the rivers of the Seine drainage network (France): sources, fate and modelling. *Science of the Total Environment* 375, 152–167. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.12.010
- Shannon, M.A., Bohn, P.W., Elimelech, M., Georgiadis, J.G., Mariñas, B.J., Mayes, A.M., 2008. Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature* 452, 301–310. doi:10.1038/nature06599
- Shiba, T., Miyake, T., 1975. New type of infectious complex of E.coli RNA phage. *Nature Publishing Group* 254.
- Shields, P.A., Farrah, S.R., 2002. Characterization of virus adsorption by using DEAE-sepharose and octyl-sepharose. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 3965–3968. doi:10.1128/AEM.68.8.3965-3968.2002
- Shields, P.A., Farrah, S.R., 1983. Influence of salts on electrostatic interactions between poliovirus and membrane filters. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 526–531.
- Sidhu, J.P.S., Hodgers, L., Ahmed, W., Chong, M.N., Toze, S., 2012. Prevalence of human pathogens and indicators in stormwater runoff in Brisbane, Australia. *Water Research* 46, 6652–6660. doi:10.1016/j.watres.2012.03.012
- Singer, B., Fraenkel-Conrat, H., 1961. Effects of bentonite on infectivity and stability of TMV-RNA. *Virology* 14, 59–65. doi:10.1016/0042-6822(61)90132-5
- Skraber, S., Gantzer, C., Maul, A., Schwartzbrod, L., 2002. Fates of bacteriophages and bacterial indicators in the Moselle river (France). *Water Research* 36, 3629–3637. doi:10.1016/S0043-1354(02)00063-5
- Skraber, S., Schijven, J., Italiaander, R., Husman, A.M. de R., 2009. Accumulation of enteric bacteriophage in fresh water sediments. *Journal of Water and Health* 7, 372–379. doi:10.2166/wh.2009.098
- Smith, H.G., Dragovich, D., 2009. Interpreting sediment delivery processes using suspended sediment-discharge hysteresis patterns from nested upland catchments, south-eastern

- Australia. *Hydrological Processes* 23, 2415–2426. doi:10.1002/hyp.7357
- Sobsey, M.D., Jones, B.L., 1979. Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 588–95.
- Stagg, C.H., Wallis, C., Ward, C.H., 1977. Inactivation of clay-associated bacteriophage MS-2 by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 385–91.
- Staggemeier, R., Bortoluzzi, M., da Silva Heck, T.M., da Silva, T., Spilki, F.R., de Matos Almeida, S.E., 2015. Molecular detection of human adenovirus in sediment using a direct detection method compared to the classical polyethylene glycol precipitation. *Journal of Virological Methods* 213, 65–67. doi:10.1016/j.jviromet.2014.11.019
- Staley, C., Reckhow, K.H., Lukasik, J., Harwood, V.J., 2012. Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in a Florida freshwater lake. *Water Research* 46, 5799–5812. doi:10.1016/j.watres.2012.08.012
- Stevenson, M.E., Sommer, R., Lindner, G., Farnleitner, A.H., Toze, S., Kirschner, A.K.T., Blaschke, A.P., Sidhu, J.P.S., 2015. Attachment and detachment behavior of human adenovirus and surrogates in fine granular limestone aquifer material. *Journal of Environment Quality* 44, 1392. doi:10.2134/jeq2015.01.0052
- Stewart-Pullaro, J., Daugomah, J.W., Chestnut, D.E., Graves, D.A., Sobsey, M.D., Scott, G.I., 2006. F+ RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1015–1026. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03011.x
- Sun, C.-X., Kitajima, M., Gin, K.Y.-H., 2016. Sunlight inactivation of somatic coliphage in the presence of natural organic matter. *Science of the Total Environment* 541, 1–7. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.08.136
- Sundram, A., Jumanlal, N., Ehlers, M., 2007. Genotyping of F-RNA coliphages isolated from wastewater and river water samples. *Water SA* 32, 65–70. doi:10.4314/wsa.v32i1.5241
- Syngouna, V.I., Chrysikopoulos, C. V., 2015. Experimental investigation of virus and clay particles cotransport in partially saturated columns packed with glass beads. *Journal of Colloid and Interface Science* 440, 140–150. doi:10.1016/j.jcis.2014.10.066
- Syngouna, V.I., Chrysikopoulos, C. V., 2010. Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. *Environmental Science & Technology* 44, 4539–4544. doi:10.1021/es100107a
- Tars, K., Bundule, M., Fridborg, K., Liljas, L., 1997. The crystal structure of bacteriophage GA and a comparison of bacteriophages belonging to the major groups of *Escherichia coli* leviruses. *Journal of Molecular Biology* 271, 759–773. doi:10.1006/jmbi.1997.1214
- Taylor, D.H., Moore, R.S., Sturman, L.S., 1981. Influence of pH and electrolyte composition on adsorption of poliovirus by soils and minerals. *Applied and Environmental Microbiology* 42, 976–84.
- Thurman, R.B., Gerba, C.P., 1988. Molecular mechanisms of viral inactivation by water disinfectants. *Advances in Applied Microbiology* 33, 75–105. doi:10.1016/S0065-2164(08)70205-3
- Tiefenthaler, L., Stein, E.D., Schiff, K.C., 2011. Levels and patterns of fecal indicator bacteria in stormwater runoff from homogenous land use sites and urban watersheds. *Journal of Water and Health* 9, 279–290. doi:10.2166/wh.2010.056

- Tong, M., Shen, Y., Yang, H., Kim, H., 2012. Deposition kinetics of MS2 bacteriophages on clay mineral surfaces. *Colloids and surfaces. B: Biointerfaces* 92, 340–7. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.017
- Toropova, K., Basnak, G., Twarock, R., Stockley, P.G., Ranson, N.A., 2008. The three-dimensional structure of genomic RNA in bacteriophage MS2: implications for assembly. *Journal of Molecular Biology* 375, 824–836. doi:10.1016/j.jmb.2007.08.067
- Tsai, S.C., Ellender, R.D., Johnson, R.A., Howell, F.G., 1983. Elution of viruses from coastal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 797–804.
- UNICEF, 2012. Pneumonia and diarrhoea: tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. New York.
- Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K., Unge, T., 1990. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* 345, 36–41. doi:10.1038/345036a0
- Valegård, K., Murray, J.B., Stockley, P.G., Stonehouse, N.J., Liljas, L., 1994. Crystal structure of an RNA bacteriophage coat protein-operator complex. *Nature*. doi:10.1038/371623a0
- Vergara, G.G.R.V., Rose, J.B., Gin, K.Y.H., 2016. Risk assessment of noroviruses and human adenoviruses in recreational surface waters. *Water Research* 103, 276–282. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.048
- Vinje, J., Oudejans, S.J.G., Stewart, J.R., Sobsey, M.D., Long, S.C., 2004. Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5996–6004. doi:10.1128/AEM.70.10.5996
- Wait, D.A., Sobsey, M.D., 1983. Method for recovery of enteric viruses from estuarine sediments with chaotropic agents. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 379–85.
- Ward, R.L., Knowlton, D.R., Winston, P.E., 1986. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh-water. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 450–459.
- Wentworth, C.K., 1922. A scale of grade and class terms for clastic sediments. *The Journal of Geology* 30, 377–392.
- WHO/UNICEF, 2014. Progress on drinking water and sanitation: 2014 Update. Geneva, Switzerland.
- Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., 2012. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental Science & Technology* 46, 12069–12078. doi:10.1021/es3029473
- Wilkinson, J., Jenkins, A., Wyer, M., Kay, D., 1995. Modelling faecal coliform dynamics in streams and rivers. *Water Research* 29, 847–855. doi:10.1016/0043-1354(94)00211-O
- Williams, G.P., 1989. Sediment concentration versus water discharge during single hydrologic events in rivers. *Journal of Hydrology* 111, 89–106. doi:10.1016/0022-1694(89)90254-0
- Williamson, K.E., Harris, J. V., Green, J.C., Rahman, F., Chambers, R.M., 2014. Stormwater runoff drives viral community composition changes in inland freshwaters. *Frontiers in Microbiology* 5, 105. doi:10.3389/fmicb.2014.00105
- Wolf, S., Hewitt, J., Greening, G.E., 2010. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 1388–94.

doi:10.1128/AEM.02249-09

- Wolf, S., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Greening, G.E., 2008. Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: Application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. *Journal of Virological Methods* 149, 123–128.
- Woody, M.A., Cliver, D.O., 1995. Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q beta. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1520–6.
- Yahya, M., Hmaied, F., Jebri, S., Jofre, J., Hamdi, M., 2015. Bacteriophages as indicators of human and animal faecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. *Journal of Applied Microbiology* 118, 1217–1225. doi:10.1111/jam.12774
- Yakirevich, A., Pachepsky, Y.A. a., Guber, A.K.K., Gish, T.J.J., Shelton, D.R.R., Cho, K.H.H., 2013. Modeling transport of *Escherichia coli* in a creek during and after artificial high-flow events: three-year study and analysis. *Water Research* 47, 2676–2688. doi:10.1016/j.watres.2013.02.011
- Yang, Y., Griffiths, M.W., 2013. Comparative persistence of subgroups of F-specific RNA phages in river water. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4564–4567. doi:10.1128/AEM.00612-13
- Yates, M. V., Gerba, C.P., Kelley, L.M., 1985. Virus persistence in groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 778–781.
- Zhang, C.-M., Xu, L.-M., Xu, P.-C., Wang, X.C., 2016. Elimination of viruses from domestic wastewater: requirements and technologies. *World journal of microbiology & biotechnology* 32, 69. doi:10.1007/s11274-016-2018-3
- Zhou, H., Smith, D.W., 2002. Advanced technologies in water and wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science* 1, 247–264. doi:10.1139/s02-020
- Zhuang, J., Jin, Y., 2008. Interactions between viruses and goethite during saturated flow: effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *Journal of Contaminant Hydrology* 98, 15–21. doi:10.1016/j.jconhyd.2008.02.002
- Zhuang, J., Jin, Y., 2003a. Virus retention and transport as influenced by different forms of soil organic matter. *Journal of Environment Quality* 32, 816. doi:10.2134/jeq2003.8160
- Zhuang, J., Jin, Y., 2003b. Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: effects of ionic strength and composition. *Journal of Contaminant Hydrology* 60, 193–209. doi:10.1016/S0169-7722(02)00087-6

Liste des publications

Fauvel B., Cauchie H.M., Gantzer C., Ogorzaly L.

Contribution of hydrological data to the understanding of the spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events. *Water Research* (2016), 94, 328–340. Impact factor (2015) : 5,99

Fauvel B., Ogorzaly L., Cauchie H.M., Gantzer C.

Interactions of infectious F-specific RNA bacteriophages with suspended matter and sediment: towards an understanding of FRNAPH distribution in a river water system. *The Science of the total environment* (2017), 574, 960–968. Impact factor (2015) : 3,98

Fauvel B., Gantzer C., Cauchie H.M., Ogorzaly L.

In situ of F-specific RNA bacteriophages in a small river: new way to assess viral propagation in water quality studies. *Food and Environmental Virology* (2016) In press. Impact factor (2015) : 2,34

Liste des communications orales

Fauvel B., Ogorzaly L., Cauchie H.M., Gantzer C.

Etude du transport et du devenir des particules virales dans un bassin hydrographique urbanisé : influence des caractéristiques virales et hydro- climatologiques. Journée de l'Ecole Doctorale BioSE, Novembre 2013, Nancy, France

Premier prix pour la meilleure présentation orale

Fauvel B.

Participation à “Ma thèse en 180 secondes”, Université de Lorraine, Mars 2015, Metz, France

Prix des lycéens

Fauvel B., Ogorzaly L., Cauchie H.M., Gantzer C.

Assessment of viral occurrence, transport and fate in an urbanized watershed: influence of viral and hydro-climatological characteristics. The 7th International Water & Health Seminar, Juin 2015, Cannes, France

Premier prix pour la meilleure présentation orale

Fauvel B., Cauchie H.M., Gantzer C., Ogorzaly L.

Spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events : new data for the water quality risk assessment. The Water Microbiology Conference, Mai 2016, University of North Carolina, NC, USA

Fauvel B., Cauchie H.M., Gantzer C., Ogorzaly L

Spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events: new data for the water quality risk assessment. The 5th Food and Environmental Virology Conference, Septembre 2016, Kusatsu, Japon

Liste des communications affichées

Fauvel B., Ogorzaly L., Cauchie H.M., Gantzer C.

Assessment of viral particle dynamics in an urbanized watershed : influence of viral and hydro-climatological characteristics. The 3rd Internal Water Association BeNeLux Young Water Professional regional conference, Octobre 2013, Belval, Luxembourg

Fauvel B.

Pollution des rivières par les virus. 13^{ème} édition des Doctoriales de Lorraine, Mai 2014, Ventron, France

Deuxième prix poster pour la vulgarisation du sujet de thèse

Fauvel B., Ogorzaly L., Cauchie H.M., Gantzer C.

Presence and adsorption of F-specific RNA bacteriophages in sediment: influence of viral and environmental characteristics. The 4th International Conference on Food and Environmental Virology, Septembre 2014, Corfu, Grèce

Fauvel B., Ogorzaly L., Cauchie H.M., Gantzer C.

Transfer of F-RNA phages between river water and sediment: impact of hydro-climatological conditions. The 2014 International Water Association World Water Congress Exhibition, Septembre 2014, Lisbonne, Portugal

Fauvel B., Cauchie H.M., Gantzer C., Ogorzaly L.

F-specific RNA bacteriophage loads during rainfall-runoff events in a luxembourgish river. The 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Septembre 2015, Lisbonne, Portugal

Fauvel B., Cauchie H.M., Gantzer C., Ogorzaly L.

Understanding of F-specific RNA bacteriophage repartition between surface water and sediment in a river system. The 5th Food and Environmental Virology conference, Septembre 2016, Kusatsu, Japon

Résumé

Introduits dans l'environnement par l'intermédiaire de sources ponctuelles et diffuses, les virus et les bactériophages entériques peuvent se propager dans les cours d'eau par l'intermédiaire de différentes voies de dissémination. Détectées à la fois dans les eaux de surface et les sédiments des rivières, ces particules virales demeurent inertes dans le milieu hydrique. Leur propagation dépend donc uniquement des nombreuses interactions qu'elles partagent avec leur environnement. Qui plus est, la contamination virale des ressources en eau semble étroitement liée aux variations hydro-climatologiques. Mais malgré les connaissances déjà acquises à ce sujet, de multiples zones d'ombre subsistent concernant les variables et facteurs contrôlant le comportement *in situ* des particules virales dans le milieu hydrique.

L'objectif de ce travail a donc été de définir, *in situ*, le transport et le devenir des bactériophages ARN F-spécifiques dans une rivière en fonction de leurs caractéristiques propres et des conditions hydro-climatologiques. L'application de stratégies et méthodologies originales, tirées du domaine de l'hydrologie comme l'utilisation du temps de résidence de la masse d'eau ou l'échantillonnage automatique à haute fréquence, a permis d'étudier les comportements des bactériophages ARN F-spécifiques *in situ*. L'influence des facteurs environnementaux et plus particulièrement de la température de l'eau et du débit de la rivière sur la propagation et la survie *in situ* de ces particules infectieuses dans la colonne d'eau a été démontrée. Dans les sédiments, une distribution spatiale des bactériophages ARN F-spécifiques infectieux a été mise à jour. Cette particularité a pu être comprise et déchiffrée grâce à la combinaison de la caractérisation du sédiment et de l'étude du comportement d'attachement des quatre génogroupes. Les transferts de particules virales entre la colonne d'eau et les sédiments ont également pu être mis en exergue et s'avèrent être fortement dépendants des conditions hydro-climatologiques. Ainsi, la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques a pu être mieux appréhendée, et de même, les origines et la nature de la pollution virale ont été mieux discernées lors d'événements de crues.

L'ensemble de ces résultats permet de compléter le puzzle de la dynamique des bactériophages ARN F-spécifiques dans la rivière. Les nouvelles approches expérimentales et méthodes d'analyse mises en place devraient permettre d'aboutir à une meilleure évaluation des risques viraux pour la santé humaine liés à l'utilisation des ressources en eau.

Summary

Introduced into the environment through point and diffuse sources, enteric viruses and bacteriophages can be spread in watercourses *via* various dissemination routes. Detected in both surface water and river sediment, these viral particles remain inert in environmental water. Their spread is governed by many interactions that they have with their direct environment. Moreover, viral contamination of water resources is closely related to hydro-climatological variations. Despite the important knowledge already reported on this subject, many grey areas remain about the variables and factors controlling the *in situ* behavior of viral particles in environmental water.

The aim of this study was therefore to define the transport and fate of F-specific RNA bacteriophages in a river according to their intrinsic characteristics and hydro-climatological conditions. The application of innovative strategies and methodologies from the hydrological sciences domain, such as the use of the residence time of the river water mass or high frequency automatic sampling, allowed studying the *in situ* behavior of F-specific RNA bacteriophages. The influence of environmental factors, especially water temperature and flow rate, has been demonstrated to have an impact on the *in situ* propagation and survival of infectious viral particles in the water column. Furthermore, the spatial distribution of infectious F-specific RNA bacteriophages was underlined in sediments. The accurate characterization of sediment and the study of the attachment capacity of the four genogroups explained this specific distribution. Finally, transfers of viral particles between the water column and sediment was highlighted and appeared to be highly dependent on hydro-climatological conditions. Besides the gained knowledge of the dynamics of F-specific RNA bacteriophages, the sources and origins of viral pollution of streams during rain and flood events were elucidated.

This work helps completing the jigsaw puzzle on presence and transmission of F-specific RNA bacteriophages in river systems. The novel experimental approach further enhances human health-dependent viral risk evaluation linked to water resource utilization and management.