



**HAL**  
open science

# Étude des propriétés de surface du bactériophage MS2 et du norovirus murin au cours de différents traitements d'inactivation

Adrien Brié

## ► To cite this version:

Adrien Brié. Étude des propriétés de surface du bactériophage MS2 et du norovirus murin au cours de différents traitements d'inactivation. Virologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0001 . tel-01673797v1

**HAL Id: tel-01673797**

**<https://theses.hal.science/tel-01673797v1>**

Submitted on 1 Jan 2018 (v1), last revised 1 Jan 2018 (v2)

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

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

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Ecole Doctoral 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 Adrien BRIÉ

## **Etude des propriétés de surface du bactériophage MS2 et du norovirus murin au cours de différents traitements d'inactivation.**

Le 25 janvier 2017

### **Membres du jury :**

<u>Rapporteurs :</u>	<b>Pr Francisco Lucena</b>	Département de microbiologie, Université de Barcelone, Espagne
	<b>Pr Annalaura Carducci</b>	Département de biologie, Université de Pise, Italie
<u>Examineurs :</u>	<b>Dr Anna Charlotte Schultz</b>	Institut national de l'alimentation, Université technique du Danemark, Danemark
	<b>Pr Christophe Gantzer</b>	LCPME, UMR 7564 CNRS, Université de Lorraine, directeur de thèse
	<b>Dr Isabelle Bertrand</b>	LCPME, UMR 7564 CNRS, Université de Lorraine, co-directrice de thèse
<u>Membres invités :</u>	<b>Dr Nicolas Boudaud</b>	Responsable de projets virologie, ACTALIA, Saint-Lô

LCPME, UMR 7564 CNRS / Université de Lorraine, Nancy

Equipe Microbiologie Environnementale

---

---

---

---

## **Remerciements**

*Je souhaiterais tout d'abord remercier Alain Walcarius pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire LCPME et m'avoir permis d'y réaliser ma thèse.*

*Je voudrais ensuite remercier tous les membres du jury qui ont accepté de lire avec attention cette thèse, en particulier le Pr. Annalaura Carducci et le Pr. Francisco Lucena, les deux rapporteurs, pour leurs commentaires constructifs et pertinents. J'adresse également mes remerciements au Dr. Anna Charlotte Schultz de me faire l'honneur d'être examinatrice de ma thèse.*

*Il est également primordial pour moi de remercier Christophe Gantzer et Isabelle Bertrand, respectivement, mon directeur et ma co-directrice de thèse de m'avoir encadré pendant ces trois années. Merci d'avoir toujours été disponibles, à l'écoute de mes questions et impliqués dans l'avancée de mes travaux de recherche.*

*Je tiens à vivement remercier Nicolas Boudaud, responsables du service virologie au sein d'ACTALIA (Saint-Lô, France), de m'avoir accepté et accompagné au cours de cette thèse CIFRE avec mes deux encadrants de thèse.*

*Cette étude n'aurait pas été possible sans les financements du projet CapsiVir, du Conseil Régional de Basse Normandie et du Syndicat des Fabricants des Produits Frais Prêts à l'Emploi (Florette, Bonduelle, Crudettes and Rosée des Champs) ainsi que d'ACTALIA et du LCPME.*

*J'aimerais remercier vivement toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont eu un rôle dans ce projet avec un grand merci à Sylvie Migot pour les images de microscopie électronique à transmission, à Céline Caillet pour les mesures de taille et de mobilité électrophorétique et à Pauline Loison pour les expérimentations avec la sonde SYPRO.*

*J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'équipe « Microbiologie Environnementale » pour leur accueil, leur soutien et leur bonne humeur en particulier lors des différentes réunions. Merci à David pour son aide technique et logistique au sein du laboratoire et à Sandrine Lemoine pour sa disponibilité et sa gentillesse.*

*Je remercie également les trois stagiaires, Marie Meo, Rémi Besançon et Ravo Razafimahefa, que j'ai eu le plaisir d'encadrer au cours de ma thèse et qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux. Merci à eux pour tout le travail accompli.*

---

---

*Bien évidemment, je remercie infiniment toute ma famille, en particulier mes parents, mes frères et mes grands-parents pour leur encouragement et leur soutien précieux au cours de ses trois années.*

*Finalement, je termine ses remerciements pour une personne importante dans ma vie et qui n'est pas présente dans ce manuscrit. Merci Emilie pour tout ce que tu m'apportes.*

---

---

## Liste des abréviations

<b>Å</b>	Ångström
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>AFM</b>	Microscope à Force Atomique
<b>C.t</b>	Concentration (mg/L) x temps de contact (min)
<b>cg</b>	Copies de génome
<b>CsCl</b>	Chlorure de césium
<b>Ct</b>	Cycle seuil (cycle threshold)
<b>Da</b>	Poids moléculaire en Dalton (g/mol)
<b>db</b>	Double brin
<b>DLS</b>	Diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)
<b>ECP</b>	Effet CytoPathique
<b>EMA</b>	Ethidium MonoAzide
<b>ET</b>	Ecart-Type
<b>HuNoV</b>	NoroVirus Humain
<b>ICC-PCR</b>	Culture Cellulaire Intégré à la Réaction en Chaîne par Polymérase
<b>ICC-RT-PCR</b>	Culture Cellulaire Intégré à la Transcription inverse suivie Réaction en Chaîne par Polymérase
<b>ISO</b>	Organisation Internationale de Normalisation (international organization for standardization)
<b>kb</b>	Kilo base
<b>kbp</b>	Kilo paire de base
<b>MATH</b>	Adhésion de microorganismes à des hydrocarbures (Microbial Adhesion To Hydrocarbons)
<b>MATS</b>	Adhésion de microorganismes à des solvants (Microbial Adhesion To Solvents)
<b>MET</b>	Microscopie Électronique à Transmission
<b>MNV</b>	NoroVirus Murin
<b>ORF</b>	Cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame)
<b><i>pI</i></b>	Point Isoélectrique
<b>PBS</b>	Tampon phosphate (phosphate-buffered saline)
<b>PCR</b>	Réaction en Chaîne par Polymérase (Polymerase Chain Reaction)
<b>PEG</b>	PolyÉthylène Glycol
<b>PMA</b>	Propidium MonoAzide
<b>ppm</b>	Partie par Million
<b>RT-PCR</b>	Transcription inverse suivie d'une Réaction en Chaîne par Polymérase
<b>RT-qPCR</b>	Transcription inverse suivie d'une Réaction en Chaîne par Polymérase quantitative
<b>S</b>	Taux de sédimentation en Svedberg
<b>sb</b>	simple brin
<b>SDS-PAGE</b>	Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
<b>TCID<sub>50</sub></b>	Dose infectieuse 50% en culture tissulaire (50% tissue culture infective dose)
<b>T<sub>m</sub></b>	Température de fusion
<b>UA</b>	Unité Arbitraire
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>UFP</b>	Unité Formant Plage
<b>UV</b>	Rayonnement Ultraviolet
<b>VLPs</b>	Particules pseudo-virales (virus-like particles)
<b>VP</b>	Protéine Virale
<b>VPg</b>	Protéine Virale liée au Génome viral (viral genome-linked protein)
<b>μ</b>	Mobilité Électrophorétique

---

***Table des matières***



<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Objectifs.....</b>	<b>4</b>
<b>Partie I : Etude Bibliographique .....</b>	<b>6</b>
I. Les virus et le milieu hydrique.....	7
I.1. Généralités .....	7
I.2. Epidémiologie .....	9
I.3. Les norovirus humains.....	13
I.4. Le virus de l'hépatite A .....	15
I.5. Méthodes de détection .....	18
II. Les modèles viraux des virus entériques pathogènes.....	24
II.1. Les bactériophages ARN F-spécifiques .....	24
II.2. Le norovirus murin .....	33
III. Les mécanismes d'inactivation des particules virales .....	43
III.1. Chaleur .....	43
III.2. Chlore .....	47
III.3. Ozone.....	53
IV. Propriétés de surface des particules virales .....	58
IV.1. Charge électrostatique globale .....	58
IV.2. Hydrophobie .....	64
IV.3. Les différents facteurs influençant les propriétés de surface.....	67
<b>Partie 2 : Matériels et méthodes .....</b>	<b>70</b>
I. Les virus modèles et leurs cultures .....	71
I.1. Bactériophage MS2 et <i>E. coli</i> K12 Hfr .....	71
I.2. MNV et lignées cellulaire RAW 264.7 .....	72
I.3. Production et purification virale .....	73
II. Détermination du titre infectieux viral.....	74
II.1. Méthode des plages de lyse pour le bactériophage MS2 .....	74
II.2. Méthode de Kärber pour le norovirus murin .....	75
III. Extraction et quantification du génome viral.....	76
III.1. Extraction du génome .....	76

III.2. Quantification de l'ARN viral .....	76
IV. Traitement à la RNase .....	78
V. Etude de l'adhésion virale sur cellule hôte .....	78
V.1. Etude de l'adhésion du bactériophage MS2 sur la bactérie <i>E. coli</i> K12 Hfr .....	78
V.2. Etude de l'adhésion du virus MNV aux cellules hôtes RAW 264.7 .....	79
VI. Etude de l'adhésion du bactériophage MS2 et de MNV sur des supports hydrophobes ou chargés .....	79
VI.1. Etude de l'adhésion sur des supports hydrophobes.....	79
VI.2. Etude de l'adhésion sur des supports chargés.....	80
VII. Observations des bactériophages MS2 au Microscope Electronique à Transmission.....	81
VIII. Mesures de taille et de mobilité électrophorétique au Zetasizer Nano ZS .....	81
IX. Etude de l'hydrophobie en fonction des changements conformationnels via la sonde SYPRO ..	83
X. Traitements appliqués pour l'inactivation virale .....	83
X.1. Chaleur .....	84
X.2. Hypochlorite de sodium .....	84
X.3. Ozone .....	84
<b>Partie 3 : Résultats .....</b>	<b>85</b>
I. Inactivation et évolution des propriétés de surface du bactériophage MS2 au cours des traitements thermiques .....	86
II. Inactivation et évolution des propriétés de surface du norovirus murin au cours de traitements par la chaleur ou la chloration.....	105
III. Inactivation et évolution des propriétés de surface du bactériophage MS2 lors de traitements par chloration seule ou par chloration suivie de la chaleur .....	125
IV Les effets de l'ozone gazeux sur le norovirus murin et le virus de l'hépatite A sur des framboises .....	147
<b>Partie 4 : Discussion – Perspectives .....</b>	<b>162</b>
Perspectives.....	175
<b>Références .....</b>	<b>177</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>207</b>

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Modes de contamination de l'homme par les virus entériques pathogènes.....	8
<b>Figure 2.</b> Structure du norovirus humain.....	14
<b>Figure 3.</b> Structure du virus de l'hépatite A.....	16
<b>Figure 4.</b> Observation par microscopie électronique à transmission après coloration négative de bactériophages MS2 adsorbés sur des F-pili d' <i>Escherichia coli</i> .....	25
<b>Figure 5.</b> Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2 et Q $\beta$ .....	28
<b>Figure 6.</b> Structure secondaire « tige-boucle » au début du gène codant la réplicase des bactériophages MS2 (19 nucléotides) et Q $\beta$ (20 nucléotides).....	29
<b>Figure 7.</b> Symétrie d'un icosaèdre comprenant des axes de rotation d'ordre 2, 3 et 5.....	30
<b>Figure 8.</b> Structure tertiaire de la protéine de capsid du bactériophage MS2 avec l'ensemble de ces sept feuilletts $\beta$ (de A à G) et deux hélices $\alpha$ (de A à B) (PDB : 2MS2).....	31
<b>Figure 9.</b> Composants et structure de la capsid du bactériophage MS2.....	32
<b>Figure 10.</b> Organisation génétique de l'ARN du norovirus murin.....	35
<b>Figure 11.</b> Structure tertiaire des résidus 11 à 85 du domaine central de la protéine VPg du MNV avec ces deux hélices $\alpha$ , $\alpha_1$ et $\alpha_2$ (PDB : 2M4G).....	36
<b>Figure 12.</b> Structure du norovirus murin.....	37
<b>Figure 13.</b> Images de microscopie électronique à transmission de différentes particules de calicivirus félin.....	38
<b>Figure 14.</b> Organisation de la protéine de capsid VP1 du norovirus murin.....	39
<b>Figure 15.</b> Représentation de la structure du domaine P du MNV.....	40
<b>Figure 16.</b> Représentation schématique du cycle de réplication du MNV.....	41
<b>Figure 17.</b> Distribution en pourcentage de l'acide hypochloreux (HOCl) et de sa base conjuguée (ClO $^-$ ) en solution aqueuse en fonction du pH à 25°C (pKa = 7,5).....	48
<b>Figure 18.</b> Les réactions de décomposition de l'ozone (adapté de Kim <i>et al.</i> , 2003).....	53
<b>Figure 19.</b> Impact de différents traitements sur la structure du bactériophage MS2.....	57
<b>Figure 20.</b> pKa et sites de protonation (en bleu) des quatre bases azotées, du ribose et du groupement phosphate.....	60

<b>Figure 21.</b> Mobilité électrophorétique du bactériophage MS2 et de VLPs de MS2 en fonction de la force ionique à pH 7. ....	63
<b>Figure 22.</b> Représentation des zones hydrophobes de douze trimères de protéines sur la surface externe de la capsid des bactériophages MS2, fr, GA et Q $\beta$ . ....	65
<b>Figure 23.</b> Schéma des gradients de densité. ....	74
<b>Figure 24.</b> Bille échangeuse d'anions. ....	80
<b>Figure 25.</b> Bille échangeuse de cations. ....	80
<b>Figure 26.</b> Représentation d'un bactériophage MS2 natif, plein (A) ou considéré comme vide (B) à un grossissement de x 66 000. ....	81
<b>Figure 27.</b> Représentation du Zetasizer Nano ZS et d'une cuve de mesure DTS1070. ....	82
<b>Figure 28.</b> Représentation schématique de la mobilité électrophorétique du bactériophage MS2. ...	82
<b>Figure 29.</b> Exemple d'un profil obtenu pour la mesure de la distribution de taille des bactériophages MS2 natifs (en nm) en fonction du nombre de particules virales mesurées. ....	83
<b>Figure 30.</b> Evaluation de l'hydrophobie des bactériophages natifs ou chauffés (A) par la réalisation de profils SYPRO ou (B) par adhésion sur des billes hydrophobes. ....	88
<b>Figure 31.</b> Evaluation de l'hydrophobie des MNV natifs ou chauffés (de 45°C à 60°C, 10 minutes) par adhésion sur des billes hydrophobes. ....	106
<b>Figure 32.</b> Evaluation de l'hydrophobie des bactériophages natifs ou chlorés par profils SYPRO. ....	126
<b>Figure 33.</b> Conséquences de l'hypochlorite de sodium et de la chaleur sur l'hydrophobie du bactériophage MS2. ....	127
<b>Figure 34.</b> Inactivation du MNV (A) et du VHA (B) sur des framboises fraîches par ozone gazeux à différentes concentration (ppm) et différents temps d'exposition. ....	148

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Principaux virus entériques pathogènes pour l'homme retrouvés dans le milieu hydrique et les aliments. ....	7
<b>Tableau 2.</b> Exemples d'épidémies à virus entériques d'origine hydrique dans le monde.....	10
<b>Tableau 3.</b> Exemples d'épidémies à virus entériques d'origine alimentaire dans le monde. ....	12
<b>Tableau 4.</b> Différentes méthodes de détection des virus entériques dans les échantillons environnementaux et alimentaires.....	19
<b>Tableau 5.</b> Différentes approches de discrimination entre des virus infectieux et non-infectieux en vue de l'analyse d'échantillons environnementaux et alimentaires.....	21
<b>Tableau 6.</b> Classification des <i>Leviviridae</i> .....	26
<b>Tableau 7.</b> Classification des <i>Caliciviridae</i> .....	34
<b>Tableau 8.</b> Relation entre la température et la solubilité de l'ozone dans l'eau.....	54
<b>Tableau 9.</b> Récapitulatif et description des 20 acides aminés retrouvés au sein des protéines de capsid virale.....	59
<b>Tableau 10.</b> Point isoélectrique expérimental de virus entériques pathogènes pour l'homme et de bactériophages.....	62
<b>Tableau 11.</b> Séquence et position des amorces de RT-qPCR sur le génome du bactériophage MS2 et de MNV.....	76

***Introduction***

Les micro-organismes sont des organismes vivants invisibles à l'œil nu, ils peuvent être de simples unicellulaires comme les bactéries et les archées ou des organismes plus complexes tels que les protozoaires, les champignons et certaines algues. Le terme « micro-organisme » peut, en outre, inclure les virus bien qu'ils ne soient pas d'un point de vue biologique des organismes vivants, car incapables de se répliquer indépendamment. En effet, ils nécessitent des cellules hôtes métaboliquement actives pour leur réplication. C'est ainsi que les virus pathogènes pour l'Homme ou les bactériophages, qui se répliquent aux dépens des bactéries du tractus intestinal, peuvent être considérés comme des particules inertes dans l'environnement mais globalement vivants dans leur cellule hôte (Jofre, 2009). La transmission des virus entériques à l'Homme s'effectue essentiellement par voie orale et ils sont retrouvés après réplication dans les selles.

La maladie dénommée « jaunisse » déjà décrite en Grèce et Rome antique et dans la littérature chinoise, était probablement liée à des hépatites virales. Dès 1912, le postulat d'une étiologie virale pour certaines formes de jaunisse a été établi et le terme « hépatite infectieuse » a été utilisé car la maladie se produit souvent lors de fortes épidémies (Cockayne, 1912). Le terme « hépatite A » est introduit pour la première fois par Krugman *et al.* (1967). L'hépatite A est de nos jours connue pour être causée par une infection par le virus de l'hépatite A, dont le site principal de réplication est le foie. Le virus de l'hépatite A, comme de nombreux autres, est un virus entérique excrété dans les selles des personnes infectées qui, ensuite, contamine le milieu hydrique et les aliments.

Le virus de Norwalk a, quant à lui, été découvert en 1972 dans des échantillons conservés d'une épidémie de gastro-entérites survenue dans une école à Norwalk (Ohio, États-Unis) en 1968 (Kapikian, 2000). Depuis, de nombreux autres virus similaires ont été isolés. Ils ont été regroupés dans la famille des *Caliciviridae* avec comme genre majoritaire les *Norovirus*. Ces virus ont été les premiers virus responsables de gastro-entérites identifiées chez l'Homme et sont eux aussi des virus entériques.

En 2010, les virus entériques pathogènes ont été responsables de 20 à 25% des pathologies liées à l'alimentation, soit environ 140 millions d'individus touchés dans le monde selon l'organisation mondiale de la santé (Havelaar *et al.*, 2015). Les deux principaux virus entériques responsables sont les norovirus humains, pour la majorité des cas, puis le virus de l'hépatite A. Les principaux aliments et boissons contaminés par des virus sont l'eau, les mollusques bivalves, les légumes tels que les salades et les fruits rouges notamment les framboises (EFSA, 2009, 2016; EPI, 2011; Girones *et al.*, 2010). Des méthodes normalisées de détection du génome viral des norovirus humains et du virus de l'hépatite A dans différentes matrices alimentaires (salades, fruits rouges, mollusques bivalves, eaux embouteillées, surfaces) sont parues en 2013 (ISO/TS 15216 standard, 2013). Le principal point faible de ces normes reste l'absence d'information sur l'infectivité virale qui

est un élément clé dans l'estimation du danger viral. La persistance du génome a en effet été démontrée comme supérieure à celle du caractère infectieux dans plusieurs études (Bae et Schwab, 2008; Baert *et al.*, 2008a,b; de Roda Husman *et al.*, 2009; Duizer *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2008; Gassilloud *et al.*, 2003; Hewitt *et al.*, 2009; Hewitt et Greening, 2006; Kirs et Smith, 2007; Ogorzaly *et al.*, 2010). Améliorer la discrimination entre les virus infectieux et non infectieux reste donc un enjeu essentiel pour les méthodes actuelles de détection.

D'autres virus comme les bactériophages fécaux, qui ne sont pas pathogènes, sont également excrétés par voie fécale. Les plus connus sont les phages de *Bacteroides fragilis*, les coliphages somatiques et les bactériophages ARN F-spécifiques. Ils sont régulièrement proposés comme indicateurs de pollution fécale de l'eau (Cornax *et al.*, 1990; Hartard *et al.*, 2015; Lucena *et al.*, 2006; Schaper et Jofre, 2000). Seuls les bactériophages ARN F-spécifiques ont une structure voisine du virus de l'hépatite A et des norovirus humains avec une capsidie icosaédrique et un génome à ARN simple brin de polarité positive. A l'instar des virus entériques pathogènes, ils ne peuvent pas se répliquer en dehors de leur hôte (Jofre, 2009). Dans l'environnement, les virus entériques pathogènes ou les bactériophages fécaux, en tant que particules inertes, ne peuvent donc au mieux que maintenir leur caractère infectieux jusqu'à leur nouvel hôte mais en aucun cas se répliquer. Leurs propriétés de surface vont influencer leur comportement dans l'environnement. La surface de la capsidie sera ainsi le siège de réactions physico-chimiques liées au milieu qui peuvent altérer le caractère infectieux et en particulier la capacité du virus à reconnaître sa cellule hôte. Malgré le rôle clé des propriétés de surface des virus, les études centrées sur cet aspect sont encore rares. Il est ainsi très délicat de comprendre les mécanismes d'inactivation des virus dans divers environnements, tout comme les différents comportements de virus comparables du point de vue de leur structure. De plus, des différences de processus d'inactivation virale existent en fonction du facteur inactivant (Wigginton *et al.*, 2012). Très peu d'informations sur la charge électrostatique ou l'hydrophobie des virus entériques sont accessibles. L'évolution de ces paramètres au cours d'un processus d'inactivation virale définie comme étant la perte du caractère infectieux du virus est encore peu décrite dans la littérature.



***Objectifs***

Les objectifs de l'étude s'inscrivent dans une stratégie de compréhension des phénomènes d'inactivation et de survie des virus entériques dans l'environnement, et aussi vis-à-vis de traitements technologiques (chaleur, chloration, ozonation) applicables à l'eau ou aux aliments (salades, fruits rouges...). Il s'agit de définir l'évolution des propriétés de surface (charge électrostatique globale, hydrophobie) au cours de traitements inactivants afin de définir des caractéristiques propres aux particules infectieuses. Les expérimentations sont réalisées avec le bactériophage MS2, qui fait partie des bactériophages ARN F-spécifiques, et le norovirus murin reconnu comme le modèle cultivable le plus proche des norovirus humains. Ces deux virus sont donc utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes. Le bactériophage MS2 présente l'avantage de pouvoir être produit en très grande concentration. Certaines techniques d'étude des propriétés de surface très spécifiques (microscopie électronique à transmission, mesure de mobilité électrophorétique...) pourront ainsi être utilisées.

Des études récentes (Sano *et al.*, 2010; Wigginton *et al.*, 2012) soulignent que l'inactivation virale observée lors d'un traitement thermique ou par des oxydants (hypochlorite de sodium, ozone) serait liée à des modifications au niveau de la capsid des virus. C'est pourquoi nous avons étudié l'inactivation et l'évaluation des propriétés de surface de nos deux virus modèles au cours de ces traitements dans des matrices simples. Cette étude a pour but de mieux comprendre les processus de l'inactivation et de la dégradation des particules virales au cours d'un traitement technologique. L'inactivation virale sur des matrices plus complexes de type fruits rouges a été également évaluée avec un traitement innovant par de l'ozone gazeux encore très peu utilisé dans ce contexte. L'objectif plus appliqué de l'étude est de proposer des approches basées sur les propriétés de surface pour tenter de discriminer les virus infectieux des non-infectieux. L'interprétation de la détection de virus pathogènes via la norme ISO/TS 15216 (2013) en matière de danger viral serait ainsi améliorée. Il s'agit aussi de préciser l'apport de l'ozone gazeux en tant que traitement virucide de matrices fragiles comme la framboise.

Ce travail s'articule en quatre parties. La première présente, sous forme d'étude bibliographique, le contexte scientifique dont dépend la réalisation de ces travaux de thèse. La deuxième décrit l'ensemble des méthodes utilisées pour les différentes expérimentations de cette étude. Dans la troisième, les résultats sont exposés sous forme de publications parues et/ou soumises. Un résumé en français est fourni avant chacune des publications et décrit la problématique, les principaux résultats obtenus ainsi que les conclusions qui en découlent. Dans la quatrième et dernière partie, l'ensemble des résultats est discuté de manière générale. Des conclusions globales ainsi que des perspectives soulevées par ces travaux sont finalement formulées.

***Partie I : Etude Bibliographique***

## I. Les virus et le milieu hydrique

### I.1. Généralités

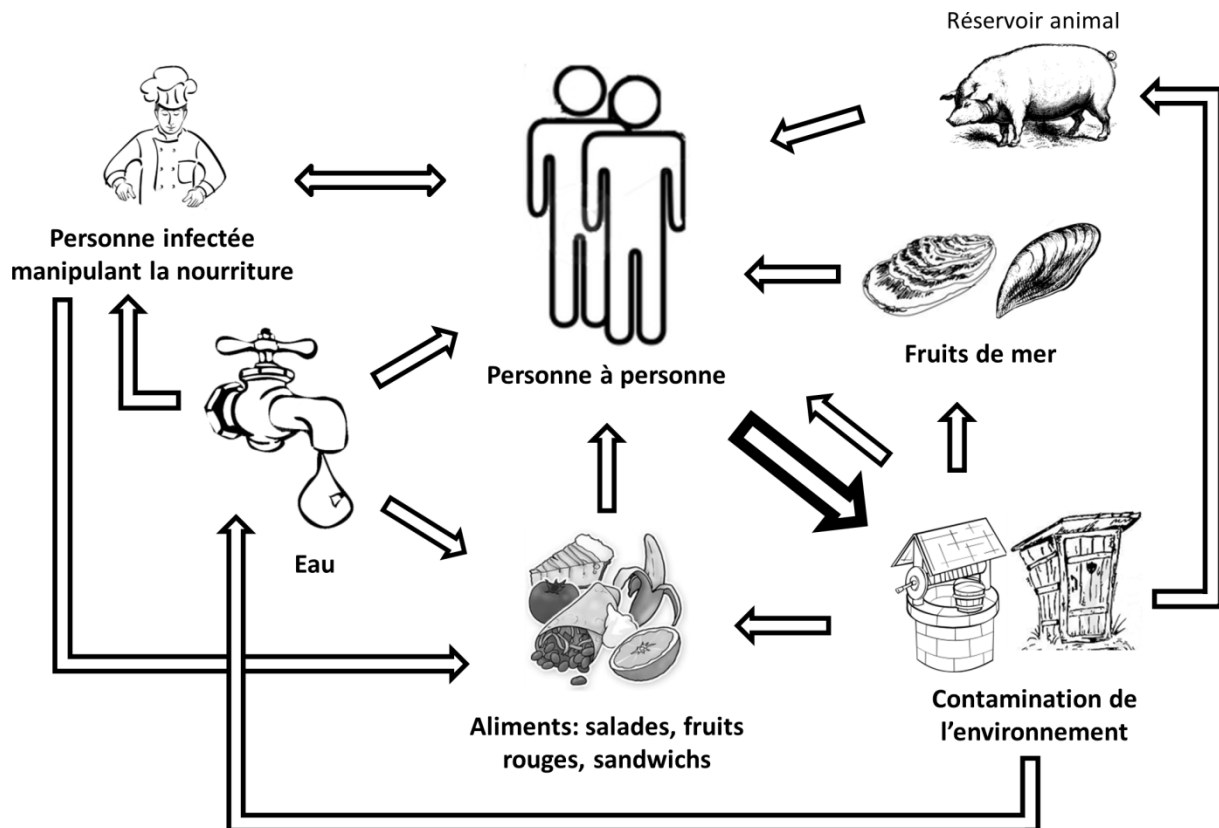
Les virus entériques pathogènes sont des virus nus uniquement constitués d'un génome et d'une capsidie protéique. Ils peuvent être classés en fonction de la nature et de l'organisation de leur génome et des pathologies dont ils sont responsables. Trois groupes peuvent être distingués selon les pathologies provoquées, avec des virus responsables de gastro-entérites aiguës, d'hépatites virales et d'autres pathologies comme des méningites, encéphalites ou infections respiratoires (Koopmans et Duizer, 2004). Ces virus entériques pathogènes possèdent tous un génome à ARN simple brin de polarité positive à l'exception des adénovirus qui possèdent un ADN double brin et des *Reoviridae* qui ont, eux, un ARN double brin segmenté. Le diamètre de ces virus varie de 20 à 40 nm, sauf pour les adénovirus et les rotavirus dont le diamètre est compris entre 70 et 90 nm. Le **Tableau 1** présente les principaux virus entériques pathogènes pour l'homme.

**Tableau 1. Principaux virus entériques pathogènes pour l'homme retrouvés dans le milieu hydrique et les aliments (adapté de King *et al.*, 2012; Koopmans *et al.*, 2002; Schwartzbrod, 1991).**

Famille	Genre	Espèce	Taille (nm)	Nature/Taille du génome	Pathologies
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	Poliovirus	20 - 30	ARN sb 7,4 – 7,7kb	Paralysies, méningites, poliomyélites
		Entérovirus humains			Méningites, encéphalites, conjonctivites hémorragiques
		Echovirus			Méningites, diarrhées, infections respiratoires
	<i>Hepatovirus</i>	Virus de l'hépatite A			Hépatites
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	Norovirus	35 - 40	ARN sb 7,3 – 7,7 kb	Gastro-entérites
	<i>Sapovirus</i>	Sapporo virus			
<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	Astrovirus humains	25 - 30	ARN sb 6,8 – 7,9 kb	Gastro-entérites
<i>Hepeviridae</i>	<i>Hepevirus</i>	Virus de l'hépatite E	25 - 35	ARN sb 7 – 7,3 kb	Hépatites
<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus	80 - 85	ARN db Segmenté 16 – 23,7 kpb	Gastro-entérites infantiles
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus humains	70 - 90	ADN db 30 – 36 kbp	Infections respiratoires, gastro-entérites, conjonctivites

Les virus entériques pathogènes pour l'homme infectent des cellules qui peuvent être très différentes (cellules du tractus gastro-intestinal, hépatocytes...) mais ils sont tous excrétés par voie

fécale puis retrouvés dans l'eau ou les aliments. Des concentrations en particules virales jusqu'à  $10^{11}$  par gramme de selles peuvent être excrétées par un individu infecté (Atmar *et al.*, 2008; Koopmans et Duizer, 2004; Kotwal et Cannon, 2014; Schwartzbrod, 1991). Cette excrétion peut durer plusieurs semaines, jusqu'à huit pour les norovirus par exemple, et plus d'un an dans le cas de personnes immunodéprimées (Glass *et al.*, 2009). Les différents modes de contamination de l'homme par les virus entériques pathogènes sont schématisés sur la **Figure 1**.



**Figure 1. Modes de contamination de l'homme par les virus entériques pathogènes (adapté de Koopmans et Duizer, 2004; Schwartzbrod, 1991).**

La présence de cellules hôtes métaboliquement actives est nécessaire à la réplication des virus (Jofre, 2009). Ainsi, la multiplication des virus entériques est impossible dans l'environnement où ils sont considérés comme des particules inertes. L'élément clé pour la contamination d'un nouvel hôte est la capacité des virus à rester infectieux dans le milieu hydrique. Les virus entériques sont facilement transférés et persistent sur les mains, la nourriture, l'eau et les surfaces environnementales (Kotwal et Cannon, 2014; Lopman *et al.*, 2012). La persistance et le transfert de ces virus dépendent de nombreux paramètres dont le virus, de sa souche et du type de surface. Néanmoins, il est généralement admis que la température est un facteur primordial dans la survie des virus entériques (Schwartzbrod, 1991). Un autre élément à prendre en considération est le rôle

des propriétés de surface des virus dans leur diffusion et leur adhésion dans l'environnement. Ainsi, Pelleïeux *et al.* (2016) se sont intéressés à évaluer le rôle des biofilms d'eau potable présents sur des surfaces lors de la désinfection par le chlore de bactériophages. Une différence d'inactivation entre ces bactériophages de la même famille est observée et dépendraient de leurs localisations au sein du biofilm elles-mêmes liées à leurs propriétés de surfaces. De plus, au cours de l'élimination des particules en suspension par ultrafiltration, des différences d'éliminations de ces particules selon le bactériophage ont été constatées. Ces bactériophages étant de taille identique cette différence serait liée à leurs propriétés de surface respectives (Boudaud *et al.*, 2012).

## **I.2. Epidémiologie**

Les virus entériques sont la principale cause d'épidémies d'origine alimentaire en Europe (20,4 %) et aux Etats-Unis (36 %) (CDC, 2015a; EFSA, 2016). Parmi ces virus entériques, l'organisation mondiale de la santé considère les norovirus humain (HuNoV) et le virus de l'hépatite A (VHA) comme des dangers infectieux prioritaires. En 2010, les HuNoV et le VHA ont été responsables respectivement, de 125 et 14 millions de cas pour environ 35 000 et 30 000 décès au niveau mondial (Havelaar *et al.*, 2015). Aux États-Unis, les HuNoV sont à l'origine d'environ 20 millions de gastro-entérites aiguës par an, engendrant quelques 60 000 hospitalisations et 650 décès pour un coût estimé à plus ou moins 1 milliards de dollars (Hall *et al.*, 2013). En Europe, ces virus sont responsables de la majorité des cas de gastro-entérites virales (EFSA, 2016). Des exemples d'épidémies liées aux virus entériques d'origine hydrique sont présentés dans le **Tableau 2**. Les contaminations sont principalement dues à une consommation d'eau de distribution ou à un contact avec une eau récréative (lac, piscine, mer...). Les deux causes les plus fréquentes pour expliquer les épidémies liées à l'eau potable sont soit une ressource en eau contaminée, soit une défaillance du réseau d'assainissement ou du réseau de distribution des eaux.

Tableau 2. Exemples d'épidémies à virus entériques d'origine hydrique dans le monde.

Année	Pays	Source de contamination	Nombre de cas	Virus	Référence
2002	Albanie	Eau de distribution	2 924	Rotavirus, VHA, astrovirus, adénovirus et calicivirus	Divizia <i>et al.</i> , 2004
2002	Etats-Unis	Piscine	36	HuNoV	Yoder <i>et al.</i> , 2004
		Lac	99		Blackburn <i>et al.</i> , 2004
		Eau de distribution	727		
2004	Suède	Lac	163	HuNoV	Sartorius <i>et al.</i> , 2007
	Mexique	Eau de mer	21	Échovirus et coxsackievirus	Begier <i>et al.</i> , 2008
2005	Inde	Eau de distribution	429	Virus de l'hépatite E	Sarguna <i>et al.</i> , 2007
	Iraq		268		Al-Nasrawi <i>et al.</i> , 2010
	Brésil		703	Rotavirus	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
	Turquie		9 907		Koroglu <i>et al.</i> , 2011
2006	Nouvelle-Zélande	Eau de distribution	218	HuNov	Hewitt <i>et al.</i> , 2007
	Chine		718	VHA	Cao <i>et al.</i> , 2009
2007	Corée du Sud	Eau de distribution	69	VHA	Lee <i>et al.</i> , 2008
	Belgique		51	HuNoV	ter Waarbeek <i>et al.</i> , 2010
	Finlande		≈ 1 000	HuNov, astrovirus, adénovirus, rotavirus, entérovirus	Maunula <i>et al.</i> , 2009
2008	Monténégro	Eau de distribution	1 699	HuNoV, rotavirus, adénovirus	Werber <i>et al.</i> , 2009
	France		142	HuNoV	L'Azou et Duchon, 2012
2009	Suède	Eau de distribution	≈ 200	HuNoV	Riera-Montes <i>et al.</i> , 2011
	Italie		299	HuNoV, rotavirus, entérovirus, astrovirus	Scarcella <i>et al.</i> , 2009
2011	Etats-Unis	Eau de source	119	HuNoV	Beer <i>et al.</i> , 2015
2012	Etats-Unis	Eau de puits	19	HuNoV	Beer <i>et al.</i> , 2015
	Grèce	Eau de distribution	552	Rotavirus	Mellou <i>et al.</i> , 2014
	France		477	HuNoV	Mouly <i>et al.</i> , 2013
2013	Finlande	Eau de distribution	≈ 170	HuNoV	EFSA, 2015
2014	Chine	Eau de distribution	29	HuNoV	Qin <i>et al.</i> , 2016
			1 614		Zhou <i>et al.</i> , 2016
2016	Espagne	Eau embouteillée	4 146	HuNoV	ProMED-mail, 2016

Les épidémies d'origine hydrique sont connues au niveau mondial sauf pour l'Afrique par manque d'infrastructures et d'informations. La majorité des épidémies sont dues aux HuNoV dans les deux grands types d'eaux, l'eau de distribution et l'eau de baignade. Cependant, d'autres virus entériques sont régulièrement retrouvés dans ces eaux comme le VHA, les rotavirus ou le virus de l'hépatite E. Aux Etats-Unis, les « Centers for Disease Control » ont recensé 50 épidémies virales d'origine hydrique entre 1999 et 2013 (CDC, 2015b). La majorité (49) était liée au HuNoV avec 2136 cas avec pour origine la consommation d'eau de distribution. La dernière épidémie aux Etats-Unis liée au VHA a été répertoriée en 2006 avec 14 cas.

Le **Tableau 3** présente quelques exemples d'épidémies d'origine alimentaire liées aux virus entériques. La consommation d'aliments crus comme les fruits de mer, les fruits rouges ou la salade est mise en cause dans ces épidémies. La congélation utilisée pour les fruits rouges (framboises, fraises, myrtilles...) n'entraîne pas d'inactivation des virus entériques. C'est ainsi que de nombreuses épidémies sont causées par des fruits rouges congelés (EFSA, 2014; Falkenhorst *et al.*, 2005; Le Guyader *et al.*, 2004; Mäde *et al.*, 2013; Maunula *et al.*, 2009). Les aliments peuvent être contaminés par deux causes distinctes. La première cause concerne la culture ou la production de l'aliment avec une contamination fécale de l'eau de mer (fruits de mer), un engrais contaminé utilisé dans les cultures maraichères ou une eau de rinçage contaminée pour le lavage des fruits. La seconde concerne la préparation ou le service par des personnes contaminées (Boxman *et al.*, 2006; Foong-Cunningham *et al.*, 2012; Le Guyader *et al.*, 2008; Nishida *et al.*, 2007; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012).



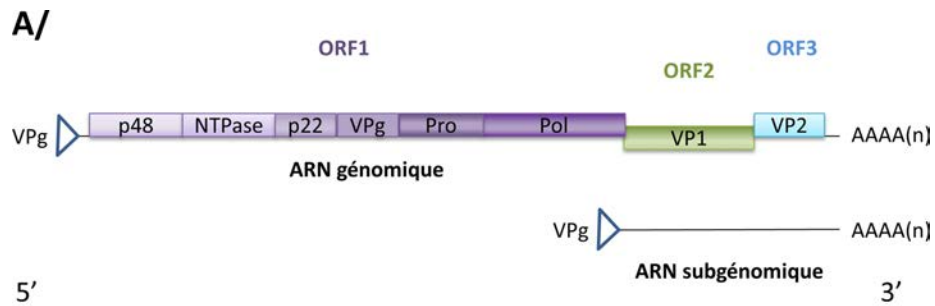
Tableau 3. Exemples d'épidémies à virus entériques d'origine alimentaire dans le monde.

Année	Localisation	Source de contamination	Nombre de cas	Virus	Référence
1988	Chine	Palourdes	≈ 300 000	VHA	Halliday <i>et al.</i> , 1991
2000	Etats-Unis	Palourdes	5	HuNoV	Kingsley <i>et al.</i> , 2002
2001	Suède	Framboises	30	HuNoV	Le Guyader <i>et al.</i> , 2004
2002	Nouvelle-Zélande	Myrtilles	39	VHA	Calder <i>et al.</i> , 2003
	France - Italie	Huîtres	127 + 200	HuNoV	Le Guyader <i>et al.</i> , 2006
	Italie	Moules	103		Prato <i>et al.</i> , 2004
2003	Australie	Huîtres	83	HuNoV	Webby <i>et al.</i> , 2007
	Singapour		305		Ng <i>et al.</i> , 2005
2004	Canada	Huîtres	26	HuNoV	David <i>et al.</i> , 2007
2005	Danemark	Framboises	≈ 1 000	HuNoV	Falkenhorst <i>et al.</i> , 2005
2007	Suède	Huîtres	30	HuNoV	Nenonen <i>et al.</i> , 2009
	Japon	Salades	23		Oogane <i>et al.</i> , 2008
	Allemagne	Pommes de terre	6	Rotavirus	Mayr <i>et al.</i> , 2009
2008	France	Huîtres	205	HuNoV, rotavirus, astrovirus, entérovirus	Le Guyader <i>et al.</i> , 2008
2009	Finlande	Framboises	≈ 200	HuNoV	Maunula <i>et al.</i> , 2009
	Australie	Tomates séchées	562	VHA	Donnan <i>et al.</i> , 2012
2010	France	Tomates séchées	49	VHA	Gallot <i>et al.</i> , 2011
	Pays-Bas		13		Petrignani <i>et al.</i> , 2010
	Europe (5 pays)	Huîtres	334	HuNoV	Westrell <i>et al.</i> , 2010
	Danemark	Laitue	264	HuNoV	Ethelberg <i>et al.</i> , 2010
2010-2011	Danemark	Framboises	224	HuNoV	Müller <i>et al.</i> , 2014
2011	Angleterre	Tomates séchées	4	VHA	Carvalho <i>et al.</i> , 2012
2012	Allemagne	Fraises	≈ 11 000	HuNoV	Mäde <i>et al.</i> , 2013
2013	Europe (12 pays)	Mélange de fruits rouges	1 444	VHA	EFSA, 2014
2013-2014	Australie	Porc	55	VHE	Yapa <i>et al.</i> , 2016

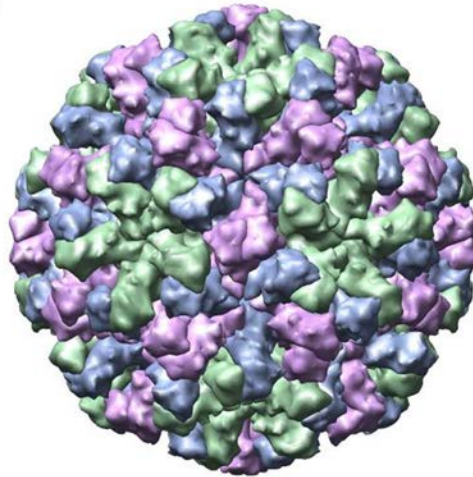
Comme observé avec les épidémies d'origine hydrique, les virus entériques pathogènes sont régulièrement responsables d'un grand nombre d'épidémies dans le monde. Par exemple, un lot de tomate séchées, provenant de Turquie, a provoqué une épidémie de VHA dans 4 pays distincts (Carvalho *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2014; Donnan *et al.*, 2012; Gallot *et al.*, 2011). En Europe, entre 756 et 1070 épidémies virales d'origine alimentaire ont été recensées chaque année entre 2012 et 2014 avec environ 10 000 cas par an (EFSA, 2014b, 2015, 2016). Les fruits de mer, les végétaux et les fruits sont les principaux aliments responsables de ces épidémies. Aux Etats-Unis, plus de 5 millions de cas d'infections virales liées à une consommation d'aliments ont été recensés chaque année entre 1998 et 2012 (Hall *et al.*, 2014; Painter *et al.*, 2013; Scallan *et al.*, 2011). Au contraire de ce qui décrit en Europe, les observations faites aux Etats-Unis donnent comme première cause l'ingestion de végétaux, salades en particulier, puis les fruits, les fruits de mer n'étant que faiblement impliqués. La différence observée dans le nombre d'épidémies et les aliments impliqués entre les Etats-Unis et l'Europe pourrait être le résultat d'une surveillance beaucoup plus précise aux Etats-Unis qu'en Europe et/ou d'habitudes alimentaires différentes.

### **I.3. Les norovirus humains**

Les HuNoV appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, au genre *Norovirus*. Ils mesurent environ 27 nm de diamètre (Thornton *et al.*, 2004). Trois génogroupes I, II et IV infectent les humains. Les autres génogroupes (II, III et V) connus infectent uniquement des animaux comme le porc, la souris ou le mouton. Les génogroupes I et II sont les plus courants et sont divisés respectivement en 8 et 19 génotypes (Zheng *et al.*, 2006). Ces virus possèdent un ARN simple brin de polarité positive de 7 300 à 7 500 bases (Karst *et al.*, 2014; Thorne et Goodfellow, 2014). Le génome des norovirus est organisé en trois cadres de lecture ouverts (ORF), représentés sur la **Figure 2A**. Le premier ORF (ORF1) est traduit en une polyprotéine clivée par la protéase virale Pro afin d'obtenir les différentes protéines non structurales du virus. ORF2 et ORF3 permettent, respectivement, la production de VP1 qui est la protéine majeure de la capsid et de VP2 qui est la protéine mineure de la capsid (Hardy, 2005; Karst *et al.*, 2014). L'extrémité 5' du génome est liée à une protéine non structurale codée par le virus appelée VPg, tandis que l'extrémité 3' de 48 nucléotides est polyadénylée (Thorne et Goodfellow, 2014).



**B/**



**Figure 2. Structure du norovirus humain.**

**A/ Organisation génétique de l'ARN du norovirus humain (adapté de Thorne et Goodfellow, 2014).**

**B/ Représentation tridimensionnel de la structure de la capside du norovirus humain (PDB : 1IHM).**

La structure de la capside du norovirus du génogroupe I a été résolue par cristallographie aux rayons X, représentée sur la **Figure 2B** (Prasad *et al.*, 1999). La capside possède 180 copies de la protéine VP1, qui est composée de 530 à 555 acides aminés pour une masse moléculaire de 58 à 60 kDa. Les 180 copies sont arrangées sous forme icosaédrique (Hardy, 2005). La protéine VP2 est présente en seulement une ou deux copies par virion et n'est pas nécessaire à la formation de la capside virale ; par contre, elle est essentielle pour le caractère infectieux. De plus, VP2 jouerait un rôle dans l'expression et la stabilité de la protéine VP1 (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Vongpunsawad *et al.*, 2013). Elle pourrait également participer à l'encapsidation du génome viral par une liaison directe avec l'ARN viral ou par l'intermédiaire de la protéine VPg (Hardy, 2005).

L'étape de reconnaissance et d'adhésion des norovirus à la cellule dépend des glycanes exprimés dans le tractus intestinal qui varient selon le groupe sanguin des individus (Le Pendu *et al.*, 2014; Thorne et Goodfellow, 2014). L'expression de ces récepteurs, appartenant à la famille des groupes sanguins tissulaires ABO, dépend du polymorphisme aux locus ABO, FUT2 (Fucosyltransferase 2) et FUT3 (Fucosyltransferase 3). En effet, la fixation du HuNoV de différents

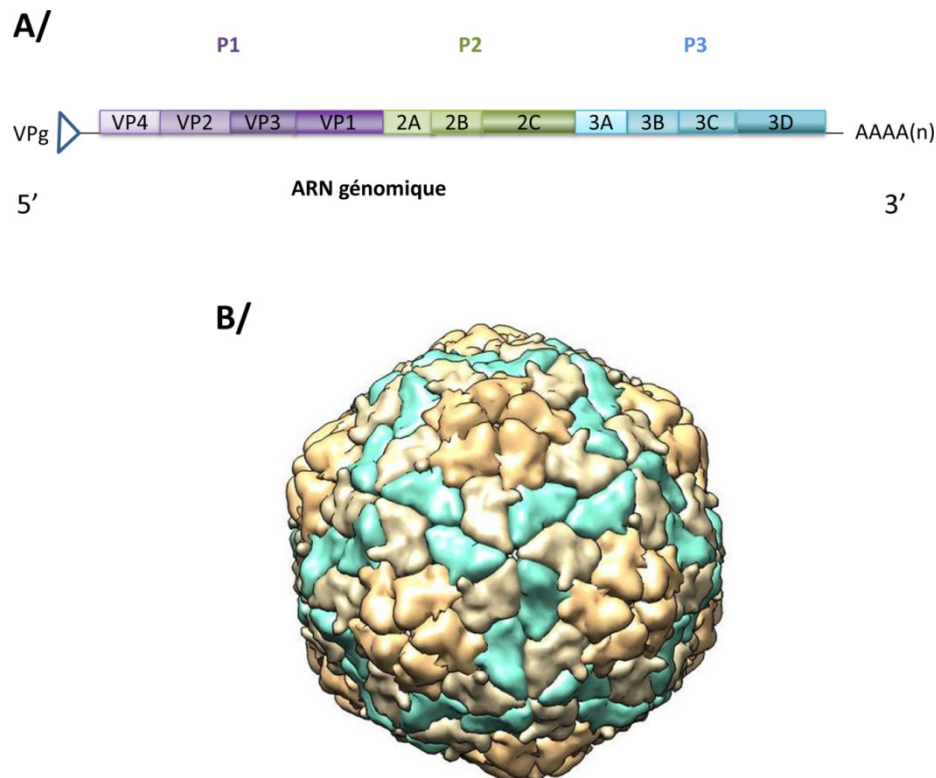
variants du génogroupe II.4 est différente selon le groupe sanguin de l'individu testé (de Rougemont *et al.*, 2011). Il en est de même avec l'expression ou non de FUT2. L'étude de Lopman *et al.* (2015) a montré que des individus sécrétant FUT2 sont sensibles à HuNoV GII.4 alors que les non sécréteurs y sont insensibles. Ainsi, les individus présenteraient des différences de sensibilité à une souche donnée de norovirus en raison du polymorphisme des gènes du groupe sanguin mais également des gènes FUT2 et FUT3.

La transmission du norovirus s'effectue majoritairement par voie féco-orale, par contact direct avec une personne infectée, par les aérosols produits lors de vomissements, également par contact avec des surfaces contaminées (poignée de porte, mobilier, objets divers) (Koopmans *et al.*, 2002; Lopman *et al.*, 2012; Marks *et al.*, 2003; Thornton *et al.*, 2004). Comme abordé dans le paragraphe précédent, l'eau et les aliments contaminés sont également à prendre en considération (Daniels *et al.*, 2000; Parshionikar *et al.*, 2003). Une personne infectée par un norovirus excrète de  $10^5$  à  $10^{11}$  particules virales par gramme de selles et jusqu'à plusieurs semaines après l'apparition de la maladie, une année dans le cas d'une personne immunodéprimée (Atmar *et al.*, 2008; Glass *et al.*, 2009; Koopmans et Duizer, 2004; Rockx *et al.*, 2002). Cette excrétion, au-delà de la période symptomatique, constitue une source de dissémination du virus. La dose infectieuse est probablement faible, entre 10 et 100 particules virales (Caul, 1994; Robilotti *et al.*, 2015). L'incubation est courte, de 12 à 48 heures. Les symptômes des infections par les norovirus sont communs à beaucoup d'autres maladies, on retrouve principalement les vomissements et une diarrhée qui peuvent être accompagnés de fièvre, crampes abdominales, céphalées ou myalgies (Thornton *et al.*, 2004). La maladie est jugée comme généralement bénigne et spontanément résolutive en 2 à 3 jours (Koopmans *et al.*, 2002; Rockx *et al.*, 2002). A l'heure actuelle, aucun vaccin ni traitement spécifique n'est disponible pour les HuNoV (Glass *et al.*, 2009; Le Flou *et al.*, 2012). Actuellement, la culture du HuNoV en routine est impossible mais des essais semblent prometteurs en utilisant les lymphocytes B ou les entérocytes (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014). Celle-ci sera abordée dans la partie « méthodes de détection ».

#### 1.4. Le virus de l'hépatite A

Le VHA appartient à la famille des *Picornaviridae* et mesure 27 à 32 nm de diamètre. A l'inverse des HuNoV, il existe un seul sérotype humain. Le VHA est un virus nu à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7 500 bases (Koopmans *et al.*, 2002; Ticehurst *et al.*, 1983). Un seul cadre de lecture ouvert est retrouvé pour ce virus, représenté sur la **Figure 3A**, il est transcrit en une polyprotéine d'environ 250 kDa (Vaughan *et al.*, 2014). Cette polyprotéine est composée de trois régions nommées P1, P2 et P3. La région P1 correspond aux protéines structurales de la capsid,

nommées VP1, VP2, VP3 et VP4. Les régions P2 et P3 codent les sept protéines non structurales qui participent à la réplication du génome viral et à l'assemblage des virus (Nainan *et al.*, 2006; Vaughan *et al.*, 2014). La polyprotéine est clivée par la protéase virale 3Cpro et produit les différentes protéines structurales et non structurales (Nainan *et al.*, 2006). Comme pour les HuNoV, le génome présente deux régions non codantes en 5' et 3' (Koopmans *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2007). La région 5' est liée à une protéine non structurale appelée VPg tandis que l'extrémité 3' est polyadénylée (Nainan *et al.*, 2006).



**Figure 3. Structure du virus de l'hépatite A.**

**A/ Organisation génétique de l'ARN du virus de l'hépatite A (adapté de Nainan *et al.*, 2006; Vaughan *et al.*, 2014).**

**B/ Représentation tridimensionnel de la structure de la capsid du virus de l'hépatite A (PDB : 4QPI).**

La structure de la capsid du VHA a été récemment résolue par cristallographie aux rayons X, elle est représentée sur la **Figure 3B** (Wang *et al.*, 2015b). La capsid mature est composée de 12 pentamères contenant chacun cinq copies de VP1, VP2 et VP3 de masse moléculaire respective de 38-40 kDa, 24-30 kDa et 21-28 kDa (Debing *et al.*, 2014; Totsuka et Moritsugu, 1999). La quatrième protéine structurale, VP4, est essentielle à la formation des virions, mais elle n'a pas été que récemment détectée au sein des particules virales matures du fait de sa faible taille, 23 acides

aminés contre 68 pour la protéine VP4 du poliovirus (Li *et al.*, 1994; Probst *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2015b). VP4 n'est pas myristoylée pour le VHA à l'inverse d'autres *Picornaviridae* comme le poliovirus (Chow *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2015b).

Peu d'informations sur les étapes de reconnaissance et d'adhésion du VHA à la cellule hôte sont connues. Comme décrit pour le poliovirus, la transcytose, réalisée par les cellules M présentes dans les plaques de Peyer au sein du tractus intestinal, a été suggéré comme mécanisme d'entrée du virus dans la voie sanguine (Blank *et al.*, 2000; Ouzilou *et al.*, 2002). Le premier récepteur du VHA connu, nommé HAVCR1 (ou TIM1), appartient à la famille des gènes TIM (T cell transmembrane, immunoglobulin, and mucin domain) (Feigelstock *et al.*, 1998; Kaplan *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 2014). Ce récepteur est, entre autre, exprimé dans les tissus hépatiques (Feigelstock *et al.*, 1998; Kaplan *et al.*, 2013). La distribution de l'expression de HAVCR1 ne peut pas complètement expliquer le tropisme spécifique du VHA pour le foie. De plus, deux autres récepteurs, HAVCR2 (ou TIM-3) appartenant à la même famille que HAVCR1 et ASGPR du groupe des asialoglycoprotéines, ont été rapportés comme participant à l'entrée du VHA dans la cellule (Dotzauer *et al.*, 2000; Sui *et al.*, 2006). Une forme circulante du VHA dans le sang, qui a la particularité d'être enveloppée, a été décrite récemment (Feng *et al.*, 2013). Cette enveloppe provient de la cellule hôte et pourrait expliquer la coexistence entre des VHA infectieux et des anticorps neutralisants dans le sérum puisque ces virus résistent à la neutralisation par ces anticorps (Vaughan *et al.*, 2014). La réplication du virus s'effectue principalement au sein des tissus hépatiques. Le virus est ensuite libéré dans la bile pour être éventuellement excrété par voie fécale (Debing *et al.*, 2014; Vaughan *et al.*, 2014).

Comme pour les HuNoV, la transmission du VHA s'effectue surtout par voie féco-orale, de façon indirecte via les aliments ou l'eau par exemple et par contact direct, mais aussi par l'utilisation de seringues souillées et lors de rapports sexuels masculins (Guet *et al.*, 2011; Mbithi *et al.*, 1992; Nainan *et al.*, 2006; Vaughan *et al.*, 2014). L'excrétion du VHA dans les selles est observée aussi bien dans les formes asymptomatiques que symptomatiques à des valeurs comprises entre  $10^5$  et  $10^9$  particules virales par gramme de selles (de Paula, 2012; Kaplan *et al.*, 2013). Le pic d'excrétion du VHA se produit au cours des deux semaines précédant la phase ictérique lorsqu'elle a lieu. Cette excrétion peut durer jusqu'à 12 semaines (de Paula, 2012; Koopmans *et al.*, 2002). L'excrétion du virus avant et après l'apparition de symptômes facilite la transmission de personne à personne (de Paula, 2012). L'infection par ce virus nécessite un temps d'incubation compris entre 15 et 50 jours. La maladie causée par l'infection due au VHA, dont le taux de mortalité est inférieur à 1%, comprend des symptômes non spécifiques qui peuvent inclure de la fièvre, des maux de tête, de la fatigue, des nausées et une gêne abdominale, suivis par des symptômes plus spécifiques d'une hépatite avec

notamment un ictère une à deux semaines plus tard (Koopmans *et al.*, 2002; Matheny et Kingery, 2012; Sánchez *et al.*, 2007). Cette maladie peut également rester asymptomatique en particulier chez les jeunes enfants (Koopmans *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2007). La dose infectieuse serait faible et proche de celle indiquée pour les HuNoV, entre 10 et 100 particules virales (Caul, 1994; Hirneisen *et al.*, 2010). Au contraire des HuNoV, un vaccin est disponible pour le VHA mais il n'existe pas de traitement spécifique (Matheny et Kingery, 2012). Par contre, une greffe est possible lors d'une hépatite fulminante (Matheny et Kingery, 2012).

### **I.5. Méthodes de détection**

Les méthodes de détection des virus entériques dans l'environnement, que ce soit dans l'eau ou dans les aliments, doivent prendre en compte la faible prévalence de ces virus dans ces différents milieux. Des étapes de concentration ou d'élution-concentration sont les plus couramment utilisées. Des méthodes normalisées de détection du génome viral des norovirus et du VHA dans différentes matrices alimentaires (salades, fruits rouges, mollusques bivalves, eaux embouteillées, surfaces...) sont parues en 2013 (ISO/TS 15216, 2013). Selon la matrice analysée et la méthode de détection, il est nécessaire d'adapter le système de concentration des virus puisqu'il n'existe pas de méthode universelle. Par exemple, avec la norme ISO/TS 15126 (2013), les échantillons d'eau embouteillée sont concentrés à l'aide de membranes chargées positivement, mais les échantillons de salade subissent une étape d'élution de la matrice puis de concentration à l'aide de polyéthylène glycol (PEG). L'échantillon ainsi concentré va ensuite pouvoir être analysé par différentes méthodes. Un résumé de ces méthodes est présenté dans le **Tableau 4**.

**Tableau 4. Différentes méthodes de détection des virus entériques dans les échantillons environnementaux et alimentaires (adapté de Hamza *et al.*, 2011; Koopmans et Duizer, 2004; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012; Vinjé, 2015).**

Méthodes	Approches	Avantages	Inconvénients	Références
<b>Culture cellulaire</b>	Culture cellulaire conventionnelle	Détection des virus infectieux, seule méthode déterminant directement l'infectivité virale	Besoin de lignée cellulaire et d'un ECP, longue, compétence requise	Hamza <i>et al.</i> , 2011
	Microscopie à fluorescence	Rapide, sensible, étude possible en temps réel de la réplication	Coûteuse, dépend de la spécificité des anticorps	Calgua <i>et al.</i> , 2011; Yeh <i>et al.</i> , 2008a,b
	Cytométrie en flux	Rapide, sensible, automatisée, détection à haut débit	Coûteuse, non applicable pour les virus non cultivables	Barardi <i>et al.</i> , 1998; Cantera <i>et al.</i> , 2010
	ICC-RT-PCR ou ICC-PCR	Plus rapide et sensible que la culture cellulaire, peu sensible aux inhibiteurs de PCR	Non applicable pour les virus non-cultivables, détection d'ARNs ou ADNs provenant de virus inactivés	Ogorzaly <i>et al.</i> , 2013; Reynolds <i>et al.</i> , 2001, 1996
<b>Moléculaire</b>	RT-PCR ou PCR point final	Séquençage et détermination des souches virales	Confirmation nécessaire par séquençage ou hybridation	Li <i>et al.</i> , 2002a; Vinjé, 2015
	RT-PCR ou PCR temps réel	Spécificité, sensibilité, quantitatif, débit, multiplexage de plusieurs cibles	Equipement requis, sensibilité faible pour les échantillons cliniques	Coudray-Meunier <i>et al.</i> , 2015, 2016
	digital RT-PCR ou PCR	Spécificité, sensibilité, quantitatif, débit, moins sensible aux inhibiteurs que la RT-qPCR	Equipement et compétence requis	Coudray-Meunier <i>et al.</i> , 2015, 2016
<b>Immunologique</b>	Séparation immunomagnétique	Sélection des virus, faible inhibition de la RT-PCR ou PCR	Dépend des propriétés antigéniques du virus, cible toutes les souches possibles du virus	Abd El Galil <i>et al.</i> , 2004; Haramoto <i>et al.</i> , 2010



Seule la culture cellulaire permet la détection des particules virales infectieuses puisqu'une particule infectieuse est définie comme ayant la capacité d'effectuer son cycle viral complet et de produire de nouvelles particules virales infectieuses. Cette méthode est celle de référence, elle permet d'affirmer le caractère infectieux des particules virales (Hamza *et al.*, 2011). Dans le cas des HuNoV, plusieurs équipes ont proposé une culture cellulaire *in vitro* (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014; Straub *et al.*, 2007). Straub *et al.* (2007) utilisaient une méthode de culture cellulaire en 3D pour répliquer les HuNoV. Néanmoins, cette méthode n'a jamais pu être reproduite par une autre équipe (Takanashi *et al.*, 2013). L'étude de Jones *et al.* (2014) semble, elle, plus prometteuse bien que les titres en virus infectieux soient, à l'heure actuelle, faibles. En effet, les auteurs ont publié leur protocole complet en 2015 et celui-ci a été reproduit par différentes équipes américaines (Jones *et al.*, 2015). Très récemment, une autre équipe américaine a mis au point une autre méthode de culture des HuNoV à l'aide d'entérocytes (Ettayebi *et al.*, 2016). Celle-ci présente l'avantage de répliquer de nombreuses souches d'HuNoV. Il faudra, cependant, attendre quelques années pour espérer une culture cellulaire optimisée de routine pour les HuNoV. La culture du VHA n'est possible que pour la souche vaccinale (Debing *et al.*, 2014; Kaplan *et al.*, 2013). Les souches environnementales ne produisent pas d'effet cytopathique (ECP) dans les lignées cellulaires utilisées (Debing *et al.*, 2014; Kaplan *et al.*, 2013). Globalement, les HuNoV et le VHA ne sont pas cultivables en routine par les laboratoires et aucune information sur le caractère infectieux ne peut donc être donnée pour ces deux virus. La durée et la complexité d'analyse des ECP impliquent la recherche d'autres méthodes plus rapides et moins complexes.

Les méthodes moléculaires répondent à ces critères. La norme ISO/TS 15216 (2013) permet d'harmoniser les méthodes de détection des HuNoV et du VHA dans différentes matrices (eaux, salades, fruits de mer...). Le principal problème lié à cette norme est une détection des virus basée uniquement sur la présence de leur génome. En effet, il a été démontré que le génome viral détecté par RT-PCR provient à la fois de particules infectieuses et non infectieuses, voire de génome viral libre (Bae et Schwab, 2008; Gassilloud *et al.*, 2003; Helmi *et al.*, 2008; Skraber *et al.*, 2004). De plus, une persistance du génome viral au cours du temps, supérieure à celle du caractère infectieux, a été montrée dans plusieurs études (Bae et Schwab, 2008; Gassilloud *et al.*, 2003; Ogorzaly *et al.*, 2010). Or le caractère infectieux est un élément primordial pour l'évaluation du danger viral. C'est ainsi que différentes approches ont été proposées pour discriminer le génome provenant d'une particule virale infectieuse de celui d'une particule non-infectieuse ou éventuellement du génome libre. Un résumé de ses approches est donné dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5. Différentes approches de discrimination entre des virus infectieux et non-infectieux en vue de l'analyse d'échantillons environnementaux et alimentaires (adapté de Hamza *et al.*, 2011; Koopmans et Duizer, 2004; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2012).**

Méthodes	Approches	Avantages	Inconvénients	Références
<b>Culture cellulaire</b>	Impédance cellulaire	ECP non nécessaire, résultats en temps réel	Besoin de lignée cellulaire, coûteuse, interprétation des résultats	Cheng <i>et al.</i> , 2015; Martin-Latil, 2016
<b>Moléculaire couplée ou non à la culture cellulaire</b>	RT-PCR ou PCR long fragment	Facile, pourrait indiquer la présence de génome endommagé	Faible sensibilité, utilise l'intégrité du génome comme critère d'infectivité	Li <i>et al.</i> , 2002b; Simonet et Gantzer, 2006a,b; Wolf <i>et al.</i> , 2009
	RT-PCR ou PCR ciblée	Facile, pourrait indiquer la présence de génome endommagé	Utilise l'intégrité du génome comme critère d'infectivité, virus et traitement dépendants	Wigginton <i>et al.</i> , 2012; Xue <i>et al.</i> , 2013
	PMA/EMA	Rapide, confirmerait les dommages de la capsid, culture cellulaire non nécessaire	Intégrité de la capsid comme critère d'infectivité, inhibition de PCR possible	Fuster <i>et al.</i> , 2016; Leifels <i>et al.</i> , 2015; Parshionikar <i>et al.</i> , 2010; Prevost <i>et al.</i> , 2016
	Protéinase puis RNase ou RNase seule	Rapide, confirmerait les dommages de la capsid, culture cellulaire non nécessaire	Intégrité de la capsid comme critère d'infectivité	Baert <i>et al.</i> , 2008b; Nuanualsuwan et Cliver, 2002, 2003
	Adhésion au récepteur cible	Rapide, Facile, Automatisation possible	Non applicable pour les virus avec un récepteur inconnu, étape d'adhésion comme critère d'infectivité	Li <i>et al.</i> , 2011; Wang <i>et al.</i> , 2014
	Adhésion à la cellule hôte	Plus rapide que la culture cellulaire	Non applicable pour les virus non-cultivables, étape d'adhésion comme critère d'infectivité	Nuanualsuwan et Cliver, 2003
	Détection de l'ARNm ou du brin négatif d'ARN du virus ICC-RT-PCR ou ICC-PCR	Plus rapide que la culture cellulaire, peu sensible aux inhibiteurs de PCR	Non applicable pour les virus non-cultivables, spécifique de certains virus, détection de génome provenant de virus inactivés	Ko <i>et al.</i> , 2003, 2005 Ogorzaly <i>et al.</i> , 2013
	Détection de groupements carbonyles	Sensible, possible avec les virus non-cultivables	Dépendrait du virus cible, coûteuse, dépend du traitement appliqué	Sano <i>et al.</i> , 2010, 2015; Tojo <i>et al.</i> , 2013

Bien que la culture cellulaire soit la méthode de référence pour définir le caractère infectieux des virus, d'autres approches ont été développées pour essayer de discriminer des virus infectieux et non-infectieux. Une méthode récente, l'impédance cellulaire, pourrait permettre de rapidement définir le caractère infectieux d'un échantillon environnemental. Néanmoins, cette méthode n'a été employée actuellement que pour des souches vaccinales de VHA en laboratoire et pas pour des échantillons environnementaux. La détection du génome viral par RT-PCR ou PCR long fragment ou ciblée est également une alternative. Néanmoins, ces méthodes utilisent l'intégrité du génome comme critère d'infectivité du virus alors que la capsidite pourrait être non fonctionnelle et être incapable de reconnaître son récepteur par exemple. Une faible efficacité de la RT-PCR ou PCR long fragment est également notée. D'autres approches utilisant des enzymes telles que des RNases ou DNases des agents intercalants comme le propidium monoazide (PMA) ou l'ethidium monoazide (EMA) semblent prometteuses. Il s'agit de soit dégrader le génome des virus supposés non-infectieux soit d'empêcher leur amplification par la RT-PCR ou la PCR. Néanmoins, trop d'éléments manquent actuellement pour une efficacité optimale comme la connaissance des mécanismes d'inactivation des virus après un traitement inactivant utilisé dans l'industrie (chaleur, hypochlorite de sodium...) ou la caractérisation physico-chimique des virus entériques pathogènes infectieux d'une part et non-infectieux d'autre part. Une autre approche consiste à démontrer que le virus est capable de reconnaître son récepteur (HBGA pour les HuNoV) ou sa cellule hôte ce qui permet de démontrer la présence d'une capsidite fonctionnelle. Dans ce cas, le génome détecté correspond alors à une particule avec une capsidite fonctionnelle. Néanmoins, cette méthode ne permet pas d'affirmer que le reste du cycle viral est possible pour cette même particule et qu'elle est donc bien infectieuse. L'ICC-RT-PCR ou ICC-PCR permettrait de répondre à ce point mais il faut disposer d'une lignée cellulaire pour le virus d'intérêt pour cette méthode. Enfin, certaines études ont démontré la présence de groupement carbonyles sur les virus non infectieux après un traitement par l'hypochlorite de sodium et propose donc d'éliminer ainsi ces virus par fixation sur des supports fonctionnels (Sano *et al.*, 2010, 2015; Tojo *et al.*, 2013). Ceci montre que la connaissance des mécanismes d'inactivation permet d'apporter des solutions mais, dans ce cas, cela ne semble s'appliquer qu'après une étape préalable de désinfection. Avec ou sans l'emploi au préalable de différentes techniques, la détection du génome reste la méthode préférentiellement utilisée car la culture des virus entériques est difficile, voire impossible actuellement.

*En conclusion, les virus entériques, majoritairement représentés par le norovirus humain et le virus de l'hépatite A, sont impliqués dans la majorité des épidémies virales d'origine hydrique ou alimentaire. La détection de ces deux virus par culture cellulaire ne peut encore se faire en routine en laboratoire. Les méthodes de détection impliquent, principalement, la détection du génome viral avec une interprétation encore délicate des résultats. L'utilisation de virus modèles des virus entériques pathogènes qui sont eux cultivables permet d'étudier la survie et le comportement dans l'environnement afin de parfaire, par exemple, les différents traitements technologiques.*

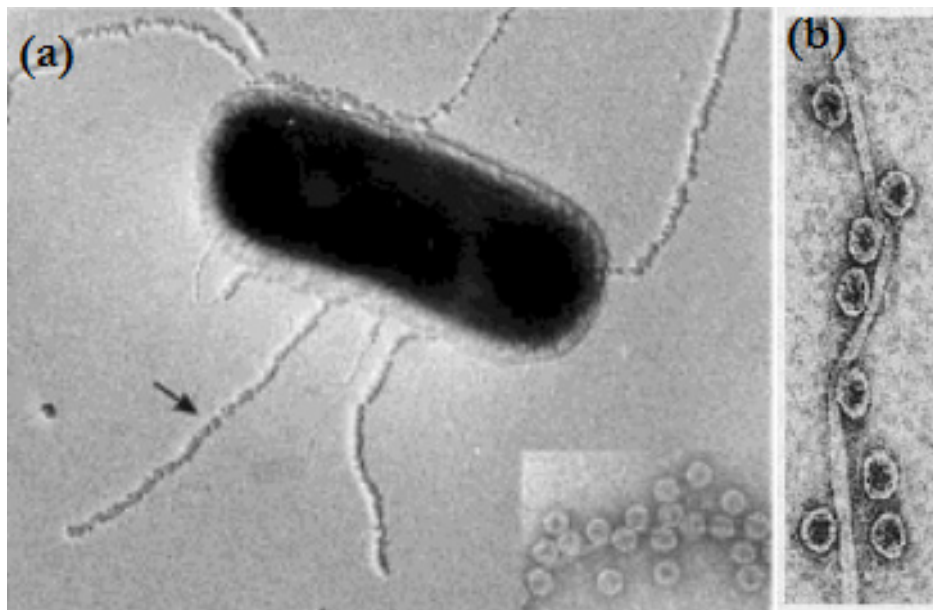
## II. Les modèles viraux des virus entériques pathogènes

Des virus sont couramment utilisés comme modèles des virus entériques pathogène pour étudier leur comportement dans l'environnement (adhésion, inactivation, survie) ou évaluer l'efficacité de traitements technologiques (Bales *et al.*, 1993; Deboosere *et al.*, 2012; Doré *et al.*, 2000; Wigginton *et al.*, 2012). Les virus modèles les plus fréquemment utilisés sont une souche vaccinale cultivable du VHA, des norovirus animaux tels que les norovirus murins et les calicivirus félins ou des virus modèles des norovirus comme les bactériophages ARN F-spécifiques (Bae et Schwab, 2008; Bales *et al.*, 1993; Boudaud *et al.*, 2012; Bozkurt *et al.*, 2015; Cromeans *et al.*, 2014; Deboosere *et al.*, 2012; Hirneisen et Kniel, 2013a; Sidhu et Toze, 2009; Wobus *et al.*, 2006).

### II.1. Les bactériophages ARN F-spécifiques

#### II.1.a. Généralités

Les bactériophages ARN F-spécifiques appartiennent à la famille des *Leviviridae*. Cette famille contient deux genres : les *Levivirus* et les *Allolevivirus*. Ces bactériophages sont dépourvus d'enveloppe et sont constitués exclusivement d'une capsidie protéique icosaédrique de 20 à 30 nm de diamètre et d'un génome à ARN simple brin de polarité positive. Ils infectent les bactéries possédant des pili sexuels ou F-pili (**Figure 4**). Ils font partie des plus petits virus connus à l'heure actuelle. Ils sont capables d'infecter non seulement les entérobactéries, telles qu'*Escherichia coli*, mais également les espèces des genres *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et probablement d'autres bactéries Gram négatives exprimant ces F-pili à leur surface. Ils sont donc excrétés par voie fécale. Du fait de leur structure proche de celle des virus entériques pathogènes (HuNoV, VHA, poliovirus...), certains de ces bactériophages ARN F-spécifiques sont couramment utilisés comme modèles d'études de l'inactivation virale lors de traitements technologique ou de l'adhésion virale sur différents supports (Bae et Schwab, 2008; Bales *et al.*, 1993; Deboosere *et al.*, 2012; Doré *et al.*, 2000; Wigginton *et al.*, 2012).



**Figure 4.** Observation par microscopie électronique à transmission après coloration négative de bactériophages MS2 adsorbés sur des F-pili d'*Escherichia coli* (Date, 1979; King *et al.*, 2012).

### II.1.b. Taxonomie

Les genres *Levivirus* et *Allolevivirus* de la famille des *Leviviridae* comporte chacun deux génogroupes. Le **Tableau 6** représente les différents génogroupes (de I à IV), espèces type et souches de bactériophages ARN F-spécifiques notamment *Enterobacteria phage MS2*.

Tableau 6. Classification des *Leviviridae* (adapté de King *et al.*, 2012).

Famille	Genre	Génogroupe	Espèce type	Souches
<b>Leviviridae</b>	<i>Levivirus</i>	Génogroupe I	<i>Enterobacteria phage fr</i>	Enterobacteria phage fr* Enterobacteria phage MS2* Enterobacteria phage f2 Enterobacteria phage R17 ...
		Génogroupe II	<i>Enterobacteria phage BZ13</i>	Enterobacteria phage GA* Enterobacteria phage BZ13* Enterobacteria phage TH1 Enterobacteria phage JP34 ...
		« Espèce provisoire »		Acinetobacter phage AP205* Pseudomonas phage PP7* Pseudomonas phage PRR1*
	<i>Allolevivirus</i>	Génogroupe III	<i>Enterobacteria phage Q<math>\beta</math></i>	Enterobacteria phage M11* Enterobacteria phage MX1* Enterobacteria phage TW18* Enterobacteria phage Q $\beta$ * ...
		Génogroupe IV	<i>Enterobacteria phage F1</i>	Enterobacteria phage NL95* Enterobacteria phage SP* Enterobacteria phage F1 Enterobacteria phage TW19 ...
32 phages qui infectent <i>Enterobacteria</i> , <i>Caulobacter</i> et <i>Pseudomonas</i> non classés				

\* : Génome entièrement séquencé et disponible sur la base de données Genbank du Centre national pour l'information biotechnologique (NCBI)

D'après des études phylogénétiques, le genre *Levivirus* (du latin *levi* : « léger ») serait le plus proche de l'ancêtre commun (Bollback et Huelsenbeck, 2001; Furuse, 1987). Suite à des mutations, le genre *Allolevivirus* (du grec *allo* : « autre ») serait apparu et aurait engendré le clivage en deux génogroupes pour chaque genre. Les génogroupes I et II représentés, respectivement, par les bactériophages MS2 et GA appartiennent au genre *Levivirus*. La différence majeure entre ces deux génogroupes se situe au niveau de la région 3' (60 nucléotides) non traduite pour le génogroupe II. De plus, une délétion de 35 nucléotides sur le gène de la réplicase est également observé pour le génogroupe II (King *et al.*, 2012). Le genre *Allolevivirus* regroupe les génogroupes III et IV représentés, respectivement, par les bactériophages Q $\beta$  et SP avec pour principale différence une délétion d'environ 90 nucléotides dans le gène de la protéine de maturation pour le génogroupe III (Bollback et Huelsenbeck, 2001; Schaper et Jofre, 2000; Vinje *et al.*, 2004).

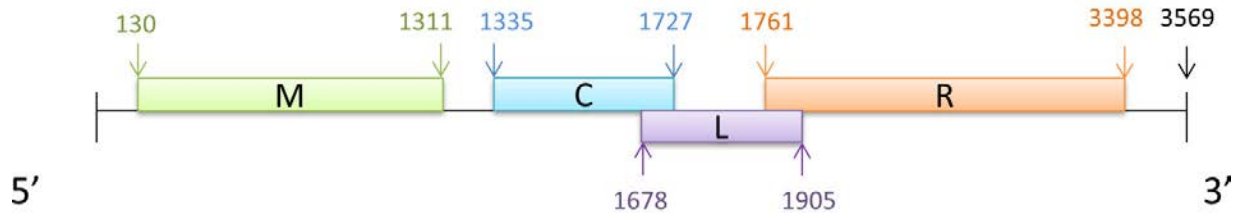
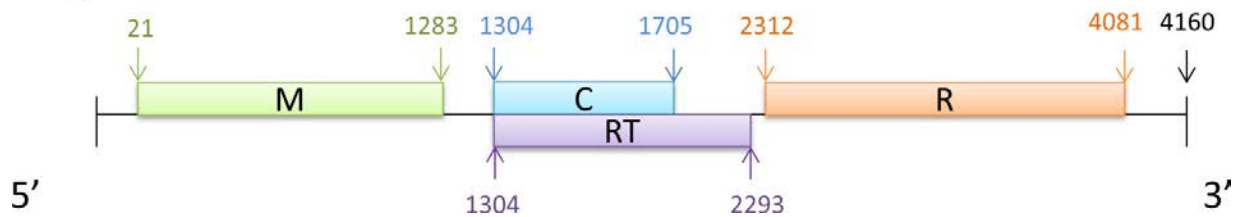
Le bactériophage MS2 ou phage MS2 sera utilisé pour nos travaux et décrit plus spécifiquement dans les paragraphes suivants. Le bactériophage Q $\beta$  a été également très étudié et des parallèles avec ce bactériophage seront effectués.

### **II.1.c. Organisation du génome viral**

Le génome des bactériophages ARN F-spécifiques est constitué d'un ARN simple brin non segmenté de polarité positive de 3 569 bases (MS2) à 4 160 bases (Q $\beta$ ) codant quatre gènes (**Figure 5**). Trois gènes sont communs à la famille des *Leviviridae* alors que le quatrième est dépendant du genre auquel appartient le phage. Concernant les trois gènes communs, le gène M correspond au gène de la protéine de maturation, aussi appelée protéine A. Elle est présente en une seule copie dans la capsid. Cette protéine est liée à l'ARN simple brin (King *et al.*, 2012), elle est impliquée dans la maturation du virion et dans l'adhésion aux F-pili bactériens. Cette protéine influence l'agencement global de la capsid (Kuzmanovic *et al.*, 2006). Le gène C code la protéine de la capsid présente en 178 copies par bactériophage. Le gène R code la réplicase qui permet la réplication du génome phagique en association avec des protéines bactériennes. Il s'agit d'une ARN polymérase ARN dépendante. Ce gène peut être réprimé par la protéine de capsid (Peabody, 1993). Le quatrième gène pour les *Levivirus* est le gène L codant la protéine de lyse qui permet la libération des phages néo-synthétisés en dégradant les peptidoglycanes bactériens. Dans le cas des *Allolevivirus*, le quatrième gène code une protéine "readthrough" (RT) qui assure la lyse bactérienne par interaction avec la protéine de maturation (Klovins *et al.*, 2002).



## Phage MS2

Phage Q $\beta$ 

**Figure 5. Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2 et Q $\beta$  (adapté de Bollback et Huelsenbeck, 2001; King *et al.*, 2012; Priano *et al.*, 1995).**

**M : gène de la protéine de maturation, C : gène de la protéine de la capside, R : gène de la réplicase, L : gène de la protéine de lyse, RT : gène de la protéine « readthrough ». Les positions des gènes des deux bactériophages sont issues de la base de données Genbank : GI:176120924 (Phage MS2) et GI:21217435 (Phage Q $\beta$ ).**

Pour ces deux phages, MS2 et Q $\beta$ , de nombreuses études sur la structure secondaires du génome ont été effectuées (Beekwilder *et al.*, 1996, 1995; Groeneveld *et al.*, 1995; Jacobson, 1976; Jacobson *et al.*, 1998; Klovinis *et al.*, 1997; Koning *et al.*, 2016; Rumnieks et Tars, 2014; Toropova *et al.*, 2008; Weissmann *et al.*, 1973). Ces structures secondaires ont un rôle primordial pour ces virus, en particulier lors de l'assemblage des particules virales et concernant la régulation de la traduction (Koning *et al.*, 2016; Toropova *et al.*, 2008). Un exemple de structure secondaire de type « tige-boucle » sur le gène de la réplicase pour les bactériophages MS2 et Q $\beta$  est présenté sur la **Figure 6**.

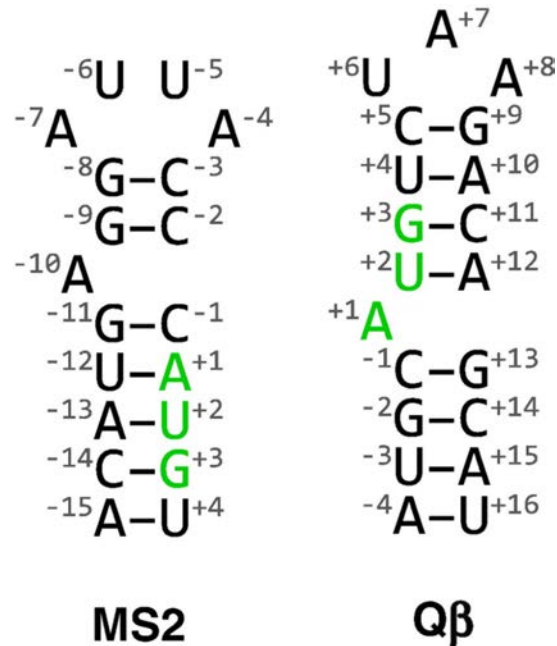


Figure 6. Structure secondaire « tige-boucle » au début du gène codant la réplicase des bactériophages MS2 (19 nucléotides) et Qβ (20 nucléotides) (adapté de Rumnieks et Tars, 2014).

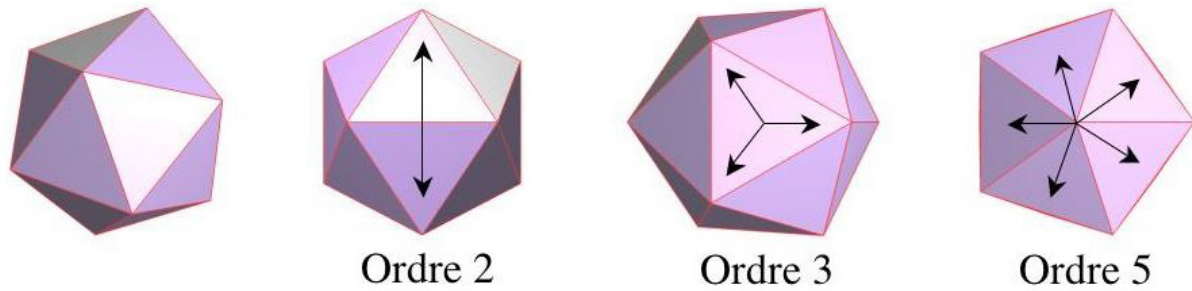
Le codon initiateur du gène codant la réplicase est marqué en vert. Les positions des nucléotides sont indiquées à côté des nucléotides, la numérotation démarre au codon initiateur avec le sigle + pour les nucléotides le suivant ou - pour ceux le précédent.

Le génome des bactériophages a un rôle de support de l'information génétique, il intervient également pour sa propre réplication initialement dans le cytoplasme bactérien.

#### II.1.d. Capside

La capside protège l'acide nucléique viral de l'environnement extérieur. Dans le cas des virus nus, elle intervient également dans l'adhésion du virus au récepteur de la cellule hôte. Jusqu'à récemment, cette capside était considérée comme composée de 180 copies de la protéine de capside (13,7 kDa) et d'une copie de la protéine de maturation (44 kDa) (Valegård *et al.*, 1990). Néanmoins, une étude récente a montré que la capside de MS2 ne possède que 178 copies de la protéine de capside car la protéine de maturation remplace un dimère de la protéine de capside (Dent *et al.*, 2013). La capside est arrangée sous forme d'un icosaèdre composé de 20 faces, 12 sommets et 30 arêtes et présente une symétrie selon trois ordres de rotation (Figure 7) :

- Ordre 2 avec 15 axes qui passent par les milieux de 2 arêtes opposées,
- Ordre 3 avec 10 axes qui passent par les centres de 2 faces opposées,
- Ordre 5 avec 6 axes qui passent par 2 sommets opposés.

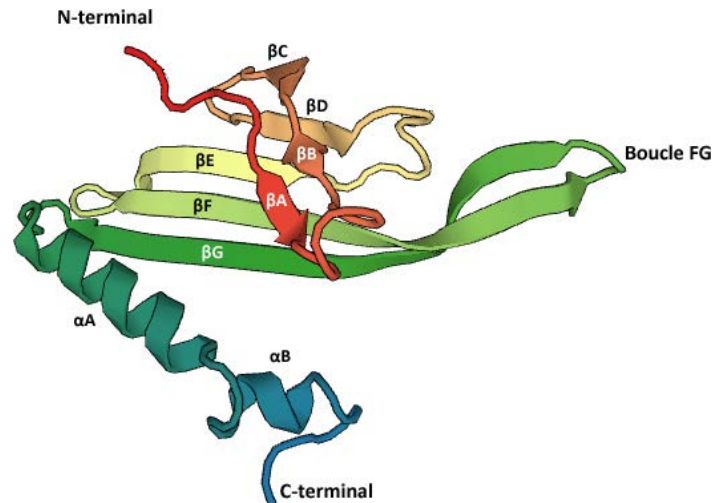


**Figure 7. Symétrie d'un icosaèdre comprenant des axes de rotation d'ordre 2, 3 et 5 (adapté de [www.mathcurve.com](http://www.mathcurve.com)).**

Les protéines de capsidie n'étant pas symétriques, aucun axe de symétrie ne passe par celles-ci. La structure nécessite donc plusieurs protéines au niveau de chaque face triangulaire. La capsidie des *Levivirus* possède donc une symétrie cubique  $T=3$  (nombre de triangulation) dans laquelle chacune des 60 unités asymétriques est composée de trois protéines (Caspar et Klug, 1962; Johnson et Speir, 1997; Toropova *et al.*, 2008). La taille du bactériophage MS2, mesurée aux rayons X, par microscopie électronique à transmission (MET) et par diffusion dynamique de la lumière ou DLS (Dynamic Light Scattering), est comprise entre 22 et 29 nm (Dika *et al.*, 2011; Golmohammadi *et al.*, 1993; Langlet *et al.*, 2008a; Valegård *et al.*, 1990, 1991). La capsidie possède 32 pores d'un diamètre d'environ 17 Å répartis au niveau des axes d'ordre 3 et 5 (Golmohammadi *et al.*, 1993; Hooker *et al.*, 2004; Valegård *et al.*, 1990).

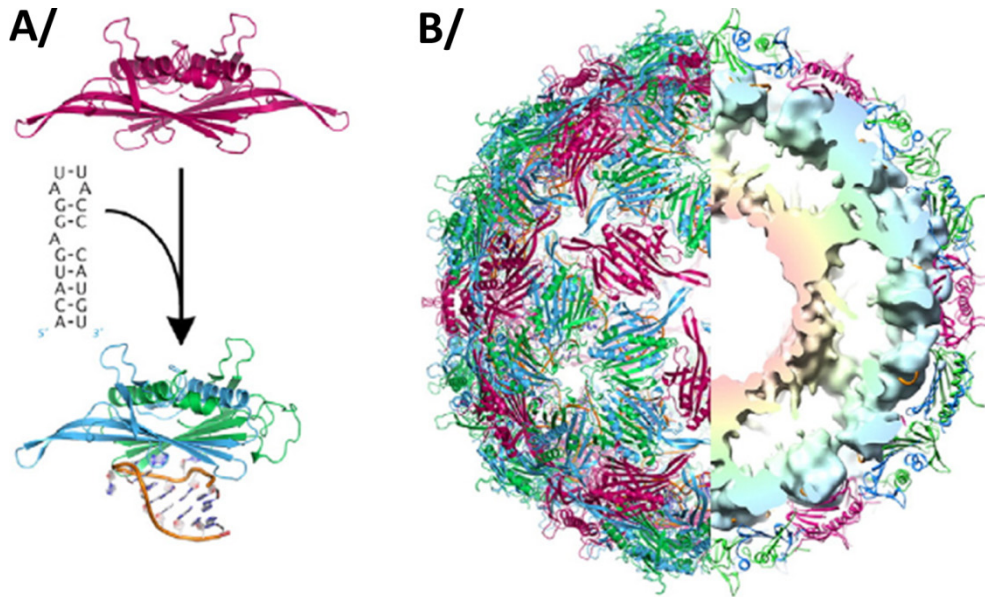
La capsidie s'assemble de manière spontanée et rapide rendant difficile des études sur les formes intermédiaires de sa formation (Kuzmanovic *et al.*, 2006; Zlotnick *et al.*, 2000). La capsidie du bactériophage MS2 possède la protéine de capsidie sous trois conformations: A, B et C. La protéine de capsidie possède une structure tertiaire, composée de 7 feuillets  $\beta$ , nommés de  $\beta A$  à  $\beta G$ , et de 2 hélices  $\alpha A$  et  $\alpha B$ , représentée sur la **Figure 8**. La principale différence entre les trois conformations de la protéine de capsidie se situe aux niveaux des feuillets  $\beta F$  et  $\beta G$  appelés boucles FG. Dans l'axe d'ordre 5, la boucle FG de la conformation B forme un canal cylindrique de 14 Å de long et 16 Å de diamètre, courbée vers les autres sous-unités (Valegård *et al.*, 1990). Dans l'axe d'ordre 3, les boucles FG des conformations A et C possèdent un contact d'ordre 6, formant un pore d'environ 17 Å de diamètre (Valegård *et al.*, 1990). Les différentes conformations de la protéine de capsidie se regroupent en dimères de deux types : dimères A/B et dimères C/C (Toropova *et al.*, 2008; Valegård *et al.*, 1990) au nombre de 60 et 29, respectivement. La majorité des interactions entre les dimères et les boucles FG sont hydrophiles (Valegård *et al.*, 1990). La protéine de maturation remplacerait un dimère C/C selon Dent *et al.* (2013). Kuzmanovic *et al.* (2006) ont montré par diffusion de neutrons aux petits angles (SANS : Small-angle neutron scattering) que la protéine de maturation ou l'ARN viral

n'était pas nécessaire à l'auto-assemblage des particules virales. Cependant, Dent *et al.* (2013) ont montré que les capsides de MS2 sans génome et protéine de maturation, appelées particules pseudo-virales (VLPs), sont constituées uniquement de dimères C/C et sont symétriques. Ils ont réussi à positionner la protéine de maturation ou protéine A au sein de la capside. Cette protéine remplace un dimère C/C et rend ainsi le virus asymétrique.



**Figure 8. Structure tertiaire de la protéine de capsid du bactériophage MS2 avec l'ensemble de ces sept feuillets  $\beta$  (de A à G) et deux hélices  $\alpha$  (de A à B) (PDB : 2MS2).**

La protéine de capsid est liée à une structure type « tige-boucle » de l'ARN viral de 19 nucléotides qui modifie la conformation de 60 dimères C/C en dimères A/B (Dykeman *et al.*, 2010; Stockley *et al.*, 2007). Cette modification de conformation est représenté sur la **Figure 9A**. La liaison ARN-capsid possède deux autres fonctions, elle est responsable de la spécificité de l'encapsidation de l'ARN et sert de site d'initiation pour l'assemblage *in vitro* et *in vivo* (Beckett *et al.*, 1988; Ling *et al.*, 1970; Rolfsson *et al.*, 2016). Une représentation globale de la capsid du bactériophage MS2 est présentée sur la **Figure 9B**.



**Figure 9. Composants et structure de la capside du bactériophage MS2 (adapté de Rolfsson *et al.*, 2016).**

**A/ Représentation des structures :** dimère symétrique C/C (rouge) et dimère asymétrique A/B (bleu/vert). La liaison du dimère C/C sur la séquence type « tige-boucle » de l'ARN viral de 19 nucléotides provoque le passage en conformation A/B de ces dimères.

**B/ Structure d'un bactériophage MS2.** La partie gauche est la vue de la surface de la structure icosaédrique (T=3) moyenne d'un bactériophage MS2 aux rayons X (Golmohammadi *et al.*, 1993; Valegård *et al.*, 1997). La partie droite est une coupe schématique de la reconstitution d'une image de microscopie électronique avec une résolution de 9 Å (Toropova *et al.*, 2008). Ce schéma montre les nombreux point de contacts entre le génome viral (densité radiale de couleur rose à bleu à mesure que le rayon augmente) et la capside protéique.

Les bactériophages ARN F-spécifiques, notamment le bactériophage MS2, sont largement utilisés comme modèles des virus entériques pour l'observation des phénomènes biologiques comme l'adhésion, la pénétration dans la cellule hôte, l'assemblage de la capside ou la libération des virions (Valegård *et al.*, 1990; Wigginton *et al.*, 2012). La culture de ces bactériophages est rapide, sans danger pour l'expérimentateur et peu onéreuse. Ceux-ci possèdent une taille et une structure voisine des virus entériques tels que les HuNoV ou le VHA. Ces bactériophages sont également utilisés comme modèles d'études des propriétés de surface des virus entériques (Dika *et al.*, 2011, 2013b; Langlet *et al.*, 2008a,b). Les bactériophages ARN F-spécifiques peuvent être obtenus à des concentrations très élevées de l'ordre de  $10^{13}$  à  $10^{14}$  UFP (Unité Formant Plaque)/mL permettant l'utilisation de méthodes analytiques qui nécessitent de fortes concentrations en particules virales telle que la mesure de la mobilité électrophorétique.

### II.1.e. Cycle de réplication

La première étape du cycle viral est l'adsorption ou la fixation du bactériophage MS2 sur les F-pili de la bactérie. Cette adsorption entraîne le clivage de la protéine de maturation et la libération de l'ARN viral à l'intérieur de la bactérie (Kozak et Nathans, 1971; Krahn *et al.*, 1972). Il reste néanmoins des zones d'incertitudes concernant la pénétration de l'ARN viral dans la bactérie.

Les virus se répliquent à partir de leur seul ARN une fois que celui-ci est libéré dans le cytoplasme bactérien. Les régions codantes de l'ARN sont ensuite traduites en protéines par les ribosomes bactériens. Quand la réplicase virale est synthétisée, elle s'associe avec trois protéines bactériennes (les facteurs d'élongation de la traduction EF-Tu et EF-Ts et la protéine ribosomale S1) pour former la polymérase active qui réplique le génome du phage (Gytz *et al.*, 2015; Tsukada *et al.*, 2009). Une dernière protéine, appelée facteur d'hôte, est nécessaire pour la synthèse du brin négatif d'ARN, elle n'est pas associée au complexe de la polymérase.

Les dimères de la protéine de capsid agissent comme répresseurs traductionnels de l'ARN polymérase en se liant sur la structure de type « tige-boucle » au début du gène codant la réplicase représenté sur la **Figure 6** (Gralla *et al.*, 1974; Weber, 1976). Le complexe ARN-protéine est considéré comme étant le site de nucléation pour l'encapsidation. Les protéines de capsid et la protéine de maturation s'associent dans le cytoplasme autour de l'ARN viral au niveau des signaux d'assemblage (packaging signal en anglais) impliquant la conversion des dimères C/C en dimères A/B (Dykeman *et al.*, 2010; Rolfsson *et al.*, 2016; Stockley *et al.*, 2007). La lyse de la bactérie infectée par la protéine de lyse de MS2 entraîne la libération de milliers de phages néoformés par la dégradation du réseau de peptidoglycanes. La durée du cycle viral complet est comprise entre 15 et 20 minutes (Rappaport, 1965; Tsukada *et al.*, 2009).

## II.2. Le norovirus murin

### II.2.a. Généralités

Le norovirus murin (MNV), décrit pour la première fois en 2003, appartient à la famille des *Caliciviridae* (Karst *et al.*, 2003). Les calicivirus sont majoritairement excrétés par voie fécale. Cette famille comprend cinq genres : *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Sapovirus* et *Norovirus*. Un sixième genre *Recovirus* a été proposé après la découverte récente d'un virus affectant les macaques rhésus, le Tulane virus (Farkas *et al.*, 2008). Une autre étude a également proposé un autre genre au sein des *Caliciviridae* à partir d'un virus infectant les chiens domestiques (Mesquita *et al.*, 2010). Le MNV appartient au genre *Norovirus* comme les HuNoV. Les calicivirus sont dépourvus d'enveloppe et sont

constitués exclusivement d'une capsid protéique de 27 à 39 nm de diamètre et d'un génome à ARN simple brin de polarité positive (Kniel, 2014). Ils infectent différents animaux tels que les chats, les lapins, les singes, les vaches mais aussi l'homme (Kniel, 2014; Thorne et Goodfellow, 2014). Dans l'état actuel des connaissances, il existe une spécificité d'hôte mais les calicivirus animaux possèdent une organisation et une structure similaire aux HuNoV. Leur utilisation comme modèles d'études d'inactivation virale des HuNoV dans différentes matrices (eau et aliments) est courante (Baert *et al.*, 2008a; Belliot *et al.*, 2008; Bozkurt *et al.*, 2013, 2014; Cromeans *et al.*, 2014; DiCaprio *et al.*, 2012; Hirneisen et Kniel, 2013; Nims et Plavsic, 2013).

### II.2.b. Taxonomie

La famille des *Caliciviridae* comprend actuellement cinq genres : *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Sapovirus* et *Norovirus*. Le **Tableau 7** représente les différents genres et certains virus de chaque genre. De nombreux virus infectant d'autres hôtes comme les porcs, les moutons, les chiens ou les poules ne sont pas indiqués dans ce tableau.

**Tableau 7. Classification des *Caliciviridae* (adapté de Farkas *et al.*, 2004; King *et al.*, 2012; Otto *et al.*, 2011; Smiley *et al.*, 2002; Wobus *et al.*, 2006).**

Famille	Genre	Génogroupe	Virus	Hôte
<b><i>Caliciviridae</i></b>	<i>Vesivirus</i>	ND	Calicivirus félin	Chat
	<i>Lagovirus</i>	ND	Maladie virale hémorragique du lapin	Lapin
	<i>Nebovirus</i>	ND	Newbury virus	Bovin
	<i>Sapovirus</i>	Génogroupe I à V	Sapporo virus (Génogroupe I)	Homme
	<i>Norovirus</i>	Génogroupe I	Norwalk virus	Homme
		Génogroupe II	Hawaii virus	Homme
		Génogroupe III	Jena virus	Bovin
		Génogroupe IV	Alphatron virus	Homme
		Génogroupe V	Norovirus Murin	Souris
	Calicivirus non classés comme le Tulane virus (macaque rhésus)			

ND : Non défini

De nombreuses études phylogénétiques ont permis de classier les calicivirus. Les nouvelles technologies de séquençage et de bio-informatique ont permis d'améliorer cette classification. Tous les calicivirus possèdent une structure similaire et un génome à ARN de polarité positive. Ainsi, les différents genres s'expliquent par des différences de la voie de transmission (aérienne, féco-orale),



de la gravité de l'infection (d'asymptomatique au décès), du nombre de cadres de lecture ouverts (2 ou 3) ou de la taille du génome (de 7400 à 8300 bases) et des protéines non-structurales et structurales (King *et al.*, 2012; Vashist *et al.*, 2009; Wobus *et al.*, 2006). En effet, les HuNoV, quel que soit le génogroupe, sont responsables de gastro-entériques aiguës. Le calicivirus félin est, quant à lui, responsable d'infections respiratoires. L'infection de la souris par le MNV est asymptomatique, alors que le calicivirus de lapin déclenche une fièvre hémorragique avec un taux de mortalité très élevé. De multiples événements de recombinaison ainsi qu'un taux de mutation élevé (commun aux virus à ARN) pourraient expliquer ces nombreux genres, génogroupes et génotypes recensés (King *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2006). Une revue bibliographique récente a proposé dans son arbre phylogénétique l'ajout de deux génogroupes (VI et VII) au sein du genre *Norovirus* correspondant à des norovirus canins (Vinjé, 2015). Le MNV, utilisé pour nos travaux, appartient au génogroupe V du genre *Norovirus*, il sera décrit plus spécifiquement dans les paragraphes suivants et des comparaisons avec les autres calicivirus seront effectuées.

### II.2.c. Organisation du génome viral

Le génome du MNV est constitué d'un ARN simple brin non segmenté de polarité positive de 7383 bases pour la souche S99 utilisée au cours de notre étude (Figure 10).

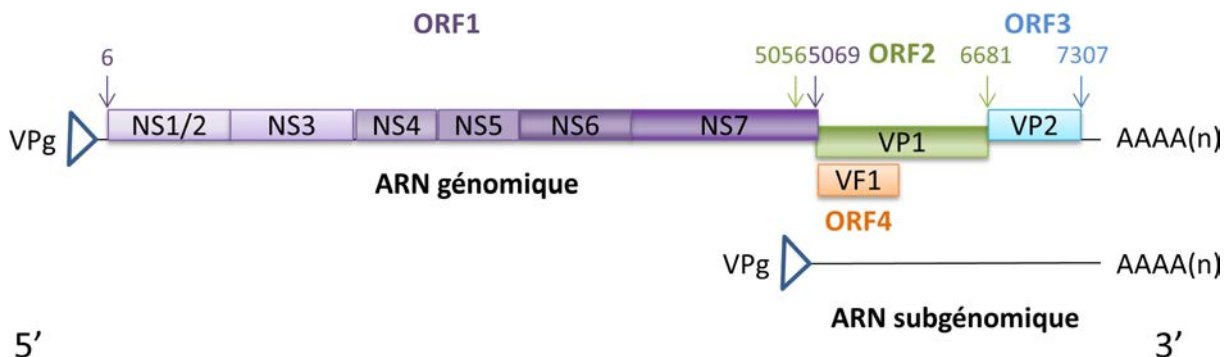


Figure 10. Organisation génétique de l'ARN du norovirus murin (adapté de Royall et Locker, 2016; Thorne et Goodfellow, 2014).

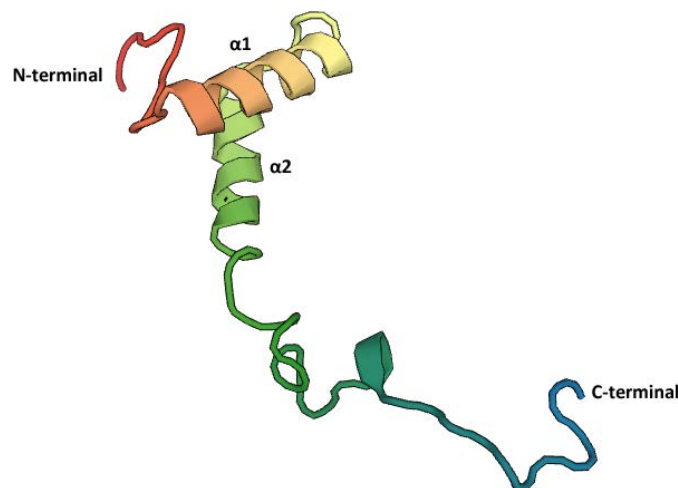
**ORF** : cadre de lecture ouvert, **NS** : gène de la protéine non-structurale, **VP** : gène de la protéine structurale, **VPg** : protéine virale associée au génome, **VF1** : facteur de virulence. Les positions des cadres de lecture ouverts sont issues de la base de données Genbank : GI: 145967363 (MNV souche S99). La position exacte de l'ORF4 n'est pas connue mais chevauche celle de l'ORF2.

Le génome du MNV est organisé en quatre cadres de lectures ouverts comprenant les trois cadres de lectures conservés au sein des *Norovirus* et un dernier cadre alternatif est spécifique du génogroupe V. Aucun équivalent n'a été actuellement retrouvé au sein du genre *Norovirus* (Thorne



et Goodfellow, 2014). Le seul membre de la famille des *Caliciviridae* ayant un quatrième ORF est le sapovirus humain (Clarke et Lambden, 2000; McFadden *et al.*, 2011). La position de ce quatrième cadre a seulement été estimée pour le MNV-3 (GI : 77744933) par McFadden *et al.* (2011), mais pas pour la souche S99 utilisée dans notre étude. ORF1 est traduit en une polyprotéine qui est clivée par la protéase virale NS6 afin d'obtenir les différentes protéines non structurales du virus. Parmi celles-ci, la protéine NS5 correspond à la coiffe de l'ARN du MNV (VPg) et la protéine NS7 est une ARN polymérase ARN-dépendante. Les fonctions des autres protéines non-structurales sont seulement prédites. Les protéines NS1/NS2, NS3 et NS4 auraient respectivement comme fonction la formation du complexe de réplication, la formation d'hélicase de l'ARN et la formation du complexe de réplication. ORF2 et ORF3 permettent respectivement la production de VP1, protéine majeure de la capsid et de VP2, protéine mineure de la capsid (Hardy, 2005; Karst *et al.*, 2014). Les protéines, non structurales (NS) et structurales (VP), possèdent les mêmes fonctions chez les norovirus humain et murin (Thorne et Goodfellow, 2014). Le dernier cadre de lecture ouvert (ORF4) code une protéine de virulence virale appelée VF1 qui agit sur un régulateur de l'immunité innée au sein des mitochondries (McFadden *et al.*, 2011).

Comme pour les ARN messagers eucaryotes, l'ARN génomique et subgénomique possède en 5' VPg et en 3' une queue polyadénylée (Thorne et Goodfellow, 2014) (**Figure 10**). La protéine (VPg), de 13 à 16 kDa est fixée de manière covalente à l'extrémité 5' du génome, elle est représentée sur la **Figure 11** (Leen *et al.*, 2013). Cette protéine est présente chez l'ensemble des *Caliciviridae* (Leen *et al.*, 2013; Royall et Locker, 2016).



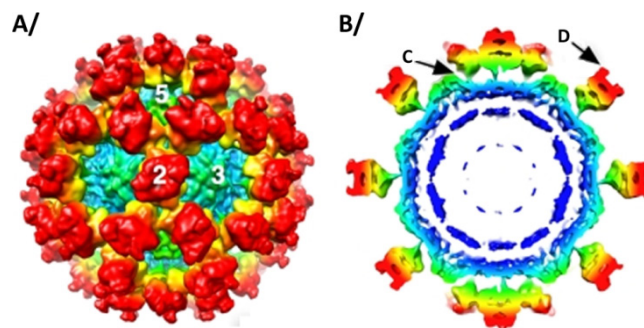
**Figure 11. Structure tertiaire des résidus 11 à 85 du domaine central de la protéine VPg du MNV avec ces deux hélices  $\alpha$ ,  $\alpha1$  et  $\alpha2$  (PDB : 2M4G).**

La protéine VPg est impliquée dans les étapes de réplication et de traduction du génome de MNV, elle intervient en particulier lors de l'initiation de la traduction (Thorne et Goodfellow, 2014).

Pour le MNV, VPg se fixerait sur la région HEAT-1 de la protéine eIF4G, qui est un facteur d'initiation de la traduction possédant de nombreux domaines d'interaction avec d'autres facteurs d'initiation eucaryotes comme eIF4E (Chung *et al.*, 2014; Goodfellow *et al.*, 2005; Hosmillo *et al.*, 2014; Leen *et al.*, 2016; Royall *et al.*, 2015). VPg est également retrouvée chez d'autres virus à ARN tels que les *Picornaviridae* ou certains virus de plantes (Herbert *et al.*, 1997).

### II.2.d. Capside

La capside du MNV possède deux protéines, VP1, majoritaire et VP2, minoritaire et mesure de 28 à 35 nm de diamètre, elle est représentée **Figure 12** (Hardy, 2005; Prasad *et al.*, 1999; Wobus *et al.*, 2006).



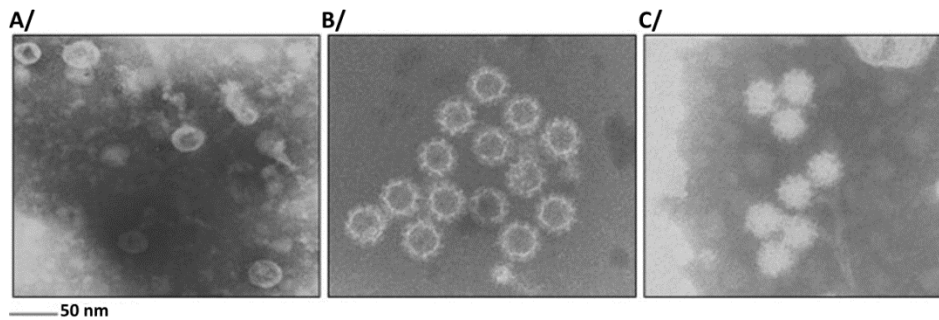
**Figure 12. Structure du norovirus murin (Katpally *et al.*, 2010).**

**A/ Représentation tridimensionnelle de la structure de la capside du MNV. Les chiffres blancs représentent les trois axes de rotation d'ordre 2, 3 et 5.**

**B/ Coupe transversale de la capside de MNV avec une coloration radiale en fonction du rayon (de couleur bleu à rouge à mesure que le rayon augmente). La flèche C indique le connecteur fin entre les domaines P1 et S. La flèche D montre les « cornes » retrouvées sur le sommet des domaines P2.**

La protéine VP1, présente en 180 copies, possède de 530 à 555 acides aminés pour un poids moléculaire compris entre 58 et 60 kDa (Hardy, 2005). La protéine VP2, présente en une ou deux copies, possède de 208 à 268 acides aminés pour un poids moléculaire compris entre 22 et 29 kDa (Hardy, 2005; Seah *et al.*, 1999). VP2 a été décrite la première fois chez le calicivirus de lapin puis pour d'autres calicivirus (Glass *et al.*, 2000; Sosnovtsev et Green, 2000; Wirblich *et al.*, 1996). Au contraire du phage MS2, la(es) position(s) de la protéine VP2 n'est (ne sont) pas définie(s) actuellement pour les calicivirus. L'utilisation de VLPs exprimant seulement la protéine VP1 a permis de montrer que la capside était capable de s'auto-assembler. La capside des calicivirus serait stabilisée par la protéine VP2 (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003; Vongpunsawad *et al.*, 2013). Pour le calicivirus félin, Di Martino et Marsilio (2010) se sont intéressés aux différences de morphologies

entre des VLPs n'exprimant que VP1, des VLPs exprimant VP1 et VP2 et des particules virales complètes. Les observations de MET (**Figure 13**) nous confirment l'importance de la protéine VP2 dans la formation et la stabilité de la capsidie du calicivirus félin. Cette capsidie est en effet de taille et de forme différente lorsque cette protéine est absente. Ces informations ne sont pas actuellement disponibles pour le MNV.



**Figure 13. Images de microscopie électronique à transmission de différentes particules de calicivirus félin. Echelle : 50 nm (Di Martino et Marsilio, 2010).**

**A/ VLPs de calicivirus exprimant VP1.**

**B/ VLPs de calicivirus exprimant VP1 et VP2.**

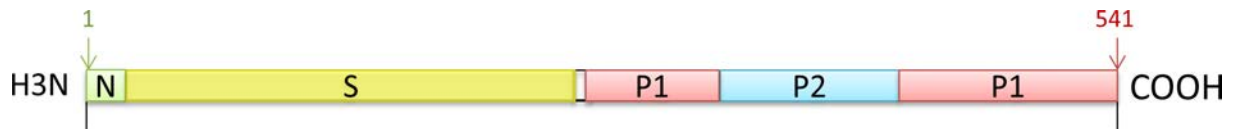
**C/ Souche sauvage de calicivirus félin.**

Comme pour les HuNoV, la capsidie est arrangée sous forme d'icosaèdre (Prasad *et al.*, 1999). De même que pour la capsidie du bactériophage MS2, celle du MNV et des autres calicivirus possède une symétrie cubique, T=3, avec 60 unités asymétriques composées chacune de trois protéines VP1 (Caspar et Klug, 1962; Prasad *et al.*, 1994, 1999; Taube *et al.*, 2010). Comme pour le bactériophage MS2, la protéine de capsidie VP1 possède trois conformations A, B et C ayant chacune des particularités. Trois différences ont été retrouvées (Prasad *et al.*, 2000) :

- L'orientation entre les différents domaines S et P de la sous-unité C est différente de celle des sous-unités A et B.
- Le nombre de résidus désordonnés du bras N-terminal correspond aux 9 premiers acides aminés pour la sous-unité B contre 28 pour les sous-unités A et C.
- Des liaisons hydrogènes sont présentes entre les résidus 64 et 65 (domaine S) et entre les résidus 505 et 506 (domaine P1) au sein des sous-unités A et B mais sont absentes pour la sous-unité C.

La protéine VP1 est organisée en trois principaux domaines. L'organisation et la structure de VP1 du MNV sont représentées sur la **Figure 14**. Le domaine N est la partie N-terminale de la protéine VP1 et constitue la face interne de la capsidie virale. Le domaine S possède un rôle essentiel

pour la formation de la capside pour le MNV mais également pour le HuNoV (Hardy, 2005; Ruvoën et Le Pendu, 2013; Taube *et al.*, 2010). Le domaine P est la partie C-terminale de la protéine, il constitue la face externe de la capside. Les domaines S et P sont connectés entre eux par une charnière flexible (Taube *et al.*, 2010). La séquence protéique du sous-domaine P2 est la moins conservée suivie par les domaines P1 et S (Taube *et al.*, 2010).



**Figure 14. Organisation de la protéine de capside VP1 du norovirus murin (adapté de Taube *et al.*, 2010). Le domaine N est coloré en vert, le S en jaune, le P1 en rouge et le P2 en bleu. La position de la délimitation des acides aminés de chaque domaine n'est pas encore déterminée pour le MNV.**

Le domaine P est sous-divisé en deux parties, P1 et P2. La structure du domaine P du MNV est représentée **Figure 15**. Le sous-domaine P1 est décomposé en deux parties et correspond aux résidus 229 à 277 en N-terminal et 416 à 541 en C-terminal. Ce sous-domaine comprend deux feuillets  $\beta$  antiparallèles et une seule hélice  $\alpha$  (Taube *et al.*, 2010). Le sous-domaine P2 est une vaste insertion au sein du domaine P1 (des résidus 278 à 415) et comprend 6 brins  $\beta$  antiparallèles (Prasad *et al.*, 1999; Taube *et al.*, 2010). L'interface entre les deux sous-domaines P1 et P2 au sein d'un monomère est constituée d'une chaîne polypeptidique enroulée de manière aléatoire (Taube *et al.*, 2010). La partie C-terminale du domaine P de MNV est en partie flexible et désordonnée. Cette partie flexible pourrait être impliquée dans la polymérisation des sous-unités au sein de la particule virale.

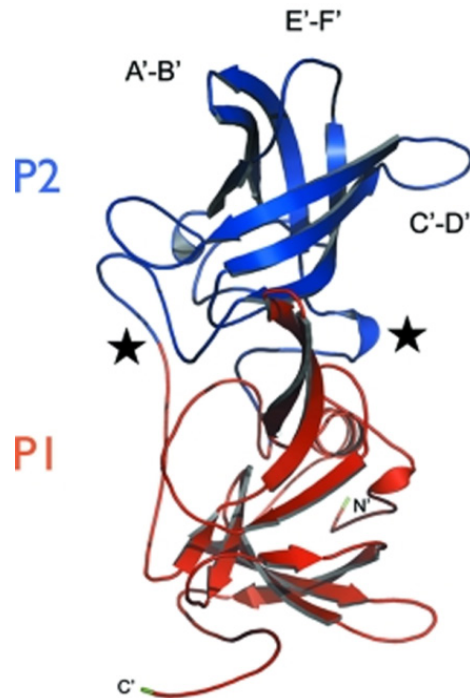


Figure 15. Représentation de la structure du domaine P du MNV (Taube *et al.*, 2010).

Le sous-domaine P1 est représenté en rouge, le P2 en bleu. Les régions N-terminale et C-terminale sont colorées en vert. Les boucles exposées en surface sont notées A'-B' (résidus 299 et 300), C'-D' (résidus 342 à 350) et E'-F' (résidus 378 à 388). Les flèches représentent les brins  $\beta$  et les bobines, les hélices  $\alpha$ . Les étoiles désignent les régions charnières entre P1 et P2.

### II.2.e. Cycle de réplication

Les modèles animaux et la culture cellulaire ont permis d'appréhender globalement le cycle de réplication du MNV. Le premier modèle animal décrit dans la littérature est celui de Karst *et al.* (2003). Le modèle cellulaire (RAW 264.7), actuellement utilisé pour les expérimentations *in vitro* du MNV, a été publié l'année suivante (Wobus *et al.*, 2004). Le cycle global de réplication du MNV est représenté sur la **Figure 16**.

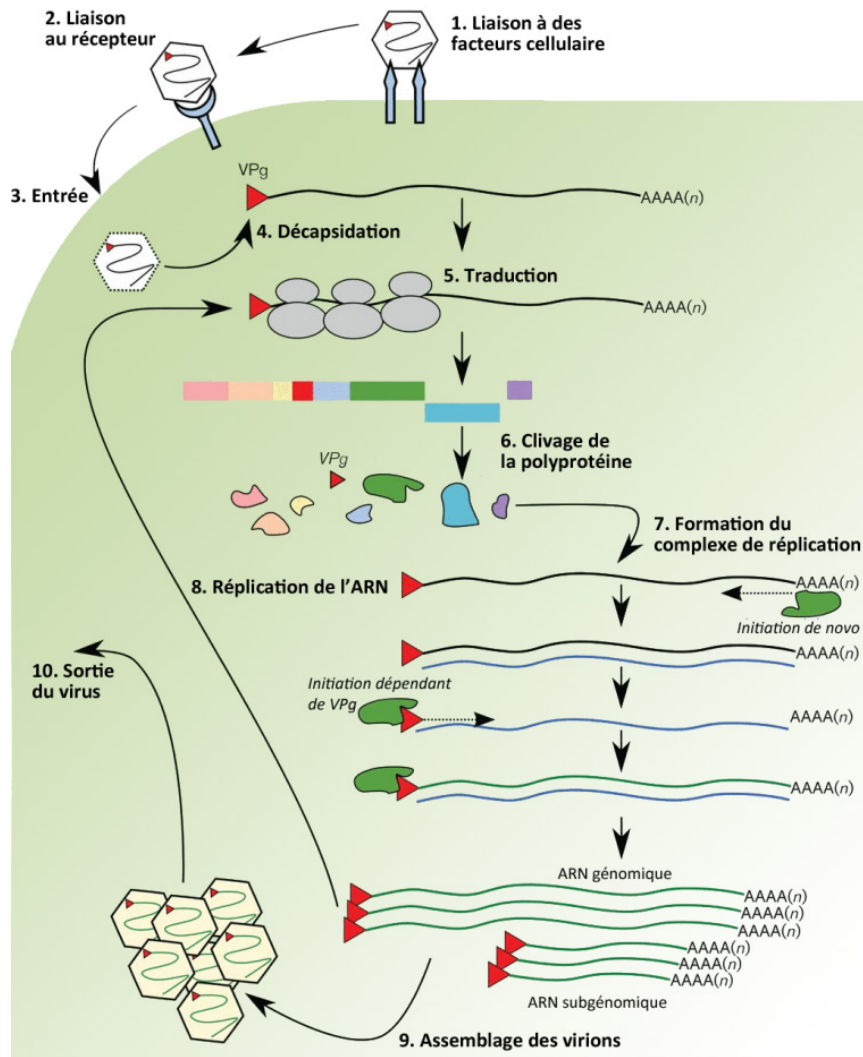


Figure 16. Représentation schématique du cycle de réplication du MNV (adapté de Thorne et Goodfellow, 2014).

(1 et 2) : Adhésion sur des facteurs de fixation présents sur la cellule puis sur le récepteur de la cellule hôte, (3) Entrée du virus, (4) Décapsidation du génome viral, (5) Traduction du génome viral, (6) Clivage de la polyprotéine par la protéase NS6, (7) Formation du complexe de réplication avec les protéines virales NS1/2 et NS4 et des protéines de la cellule hôte, (8) Réplication du génome viral, (9) Traduction des protéines de capside et assemblage des virions, (10) Sortie du virus.

Comme pour le bactériophage MS2, la première étape du cycle est l'adhésion du virus au récepteur présent sur sa cellule hôte. Cette étape est en partie connue, le virus se lie aux cellules hôtes par l'intermédiaire d'acide sialique, de glycolipides ou de glycoprotéines selon la souche de MNV utilisée (Taube *et al.*, 2010, 2013). Par contre, le récepteur cellulaire du MNV n'a pas été encore identifié (Thorne et Goodfellow, 2014). L'étape suivante est l'entrée du virus dans la cellule, le mécanisme n'est pas entièrement découvert, il va dépendre du cholestérol et de la dynamine, protéine impliquée dans la formation des vésicules lors de l'endocytose (Gerondopoulos *et al.*, 2010;

Perry et Wobus, 2010). Le génome viral est ensuite répliqué à l'aide d'un complexe de réplication associé à des vésicules membranaires intracellulaires induites par ces virus (Hyde *et al.*, 2009). Ce complexe inclut également le cytosquelette de la cellule, ce qui permet sa mise en place à proximité du centre organisateur des microtubules. L'ARN viral est ensuite utilisé directement comme un ARN messager et permet la traduction des différentes protéines virales. Dès que la polymérase est formée, elle va répliquer l'ARN viral qui forme la matrice répliquative à double brin nécessaire à la formation de nouveaux virions. La traduction des protéines VP1, VP2 et VF1 se produit principalement à partir de l'ARN subgénomique. L'utilisation de cet ARN subgénomique permettrait une production de VP1 à des niveaux plus importants que l'ARN génomique (Thorne et Goodfellow, 2014). La traduction de la protéine mineure de capsid, VP2, s'effectue selon le mécanisme de terminaison-réinitiation puisque l'ARN subgénomique est polycistronique (Naphthine *et al.*, 2009). À la fin de la traduction de VP1, le ribosome reste associé à l'ARN subgénomique et initie la traduction de VP2. Ce phénomène est facilité par le chevauchement de l'ORF2 et l'ORF3 grâce à la séquence UAAUG. Les étapes d'assemblage des protéines de la capsid, d'encapsulation du génome viral et de libération du MNV sont méconnues. Comme pour les HuNoV, la protéine VP1 est capable de s'auto-assembler en VLPs. La protéine VP2 a, elle, un rôle primordial dans la stabilité de VP1 et dans la production de virus infectieux (Bertolotti-ciarlet *et al.*, 2002; Sosnovtsev *et al.*, 2005). En parallèle de la production de nouveaux virions, le facteur de virulence VF1 retarderait l'apoptose de la cellule infectée (McFadden *et al.*, 2011) afin de terminer la réplication virale et permettre l'assemblage des particules virales avant leur libération (Furman *et al.*, 2009).

*En conclusion, les deux virus modèles choisis pour cette étude, le bactériophage MS2 et le norovirus murin, sont fréquemment utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes, en particulier le norovirus humain. Leur utilisation va nous permettre d'étudier les effets de trois traitements technologiques sélectionnés (chaleur, hypochlorite de sodium, ozone) communément employés dans les traitements des eaux ou des aliments.*

### III. Les mécanismes d'inactivation des particules virales

L'inactivation est un processus complexe conduisant à la perte de capacité du virus à infecter une cellule. Les traitements inactivants peuvent être de deux natures : physiques (chaleur, rayonnement UVs, hautes pressions) ou chimiques (hypochlorite de sodium, dioxyde de chlore, ozone...).

Certains auteurs mettent en avant la nécessité d'une meilleure connaissance fondamentale des différentes fonctions de la capsidie pour prédire les mécanismes de l'inactivation virale (Cliver, 2009; Wigginton et Kohn, 2012). Une meilleure compréhension de l'assemblage et de la structure des protéines de la capsidie est également indispensable (Wigginton et Kohn, 2012). La culture cellulaire est la seule méthode de référence pour définir le caractère infectieux d'un virus. Néanmoins, tous les virus entériques pathogènes ne sont pas actuellement cultivables en routine.

#### III.1. Chaleur

Depuis de nombreuses années, le traitement par la chaleur a été appliqué pour inactiver des virus et comprendre les mécanismes mis en jeu (Breindl, 1971; Dimmock, 1967; Youngner, 1957). D'importantes différences de résistance sont observées selon le virus, la température, le temps de contact et la composition du milieu (Bertrand *et al.*, 2012; Bizagos *et al.*, 1988; Dimmock, 1967; Tuladhar *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 1976). Une revue bibliographique (Bertrand *et al.*, 2012) a comparé les résultats de 76 publications concernant l'inactivation par la chaleur. Dans la conclusion de cette revue, cinq conclusions principales sont énoncées :

- l'inactivation est très rapide pour des températures supérieures ou égales à 50°C,
- un effet température-matrice est observé,
- l'inactivation est globalement plus rapide dans des matrices complexes (aliments, sols, eaux chargées en matières en suspension...) que dans des matrices simples (eau du robinet, eau embouteillée, tampon PBS...),
- la persistance du génome est très supérieure à celle du caractère infectieux,
- les virus à ADN double brin (bactériophage PRD1) ou simple brin (bactériophage Phi X 174) semblent plus résistants à la chaleur que les virus entériques pathogènes à ARN (poliovirus ou VHA).

Des études réalisées sur le poliovirus (type I Mahoney) montrent que l'exposition du poliovirus à la chaleur (50°C pendant 10 minutes ou 55-56°C pendant 4 à 60 minutes) entraîne une séparation de la particule initiale en une capsidie vide et un génome libre (Belnap *et al.*, 2000; Breindl, 1971; Fricks et Hogle, 1990; Levy *et al.*, 2010). L'étude de Breindl (1971) montre que l'inactivation par une



température de 50°C pendant 10 min s'effectue en deux étapes. La libération d'une des protéines de capsid, la protéine VP4, qui joue un rôle important lors de l'assemblage de la particule virale, est d'abord observée. Elle peut être suivie par la libération de l'ARN viral (Levy *et al.*, 2010). La particule exposée à la chaleur possède un coefficient de sédimentation de 80S contre 160S pour la particule native infectieuse. D'autres études ont mis en évidence une forme intermédiaire du poliovirus, nommée 135S, quand celui-ci est chauffé à 50°C pendant 3 minutes (Curry *et al.*, 1996; Fricks et Hogle, 1990; Tuthill *et al.*, 2010). Cette forme 135S a généralement perdu la protéine VP4 et la partie N-terminale de la protéine VP1 est externalisée, mais elle contient encore l'ARN viral. De plus, cet ARN contenu dans la capsid ne peut être dégradé par l'utilisation de RNases (Curry *et al.*, 1996). L'externalisation de la partie N-terminale de VP1 est directement liée à une augmentation de l'hydrophobie de ces particules virales (Fricks et Hogle, 1990). Curry *et al.* (1996) ont montré que, malgré une augmentation d'hydrophobie de cette forme 135S, celle-ci reste infectieuse pour des cellules non-permissives initialement au poliovirus comme les cellules CHO ou murine L. Une étude basée sur la cryo-microscopie électronique avec une résolution de 22 Å, a montré que la taille des formes 135S et 80S était augmentée de 4% par rapport à la forme 160S (Belnap *et al.*, 2000). Une étude s'est intéressée aux conséquences de la chaleur sur le point isoélectrique (*pI*) qui correspond à la valeur de pH pour laquelle la charge globale du virus est nulle (O'Brien et Newman, 1979). Le *pI* diminue, passant de 7,5 à 4,5, après exposition à 56°C pendant cinq minutes.

Les observations de Breindl (1971) sur la libération du génome du poliovirus par la chaleur (50°C) ont été confirmées par Rombaut *et al.* (1994) avec un traitement de 42°C ou 45°C pendant, respectivement, 72 heures ou 24 heures. D'après Shiomi *et al.* (2004), les mécanismes de l'inactivation seraient différents entre une température élevée (50°C) avec un temps d'exposition court de 30 minutes et une température physiologique (37°C) avec un temps d'exposition de plusieurs jours. En effet, les poliovirus mutants ne sont plus résistants que les poliovirus sauvages qu'à 50°C et pas pour une température de 37°C avec une durée d'exposition de cinq à sept jours. Cette différence est liée à une mutation au niveau d'un nucléotide de la séquence du gène de la protéine de capsid VP1 qui entraîne une modification de la séquence en acides aminés et empêche la libération du génome après 30 minutes à 50°C. La température semble agir de la même manière sur le parvovirus B19, un virus entérique à ADN (Mani *et al.*, 2007). En effet, la perte du caractère infectieux du parvovirus B19 est liée à une libération du génome après 10 minutes à 60°C et une externalisation de la partie N-terminal de sa protéine de capsid VP1.

Pour les deux virus modèles choisis dans notre étude, peu d'informations sur les mécanismes d'inactivation sont actuellement disponibles. Néanmoins, certains auteurs constatent un lien entre la perte du caractère infectieux et la perte de la capacité de liaison du bactériophage MS2 au récepteur

du F-pili de sa bactérie hôte (*E. coli*) (Pecson *et al.*, 2009; Wigginton *et al.*, 2012). Le phage inactivé est également devenu plus sensible à l'action de la protéase sur la capsid (Pecson *et al.*, 2009). La perte de capacité de reconnaissance de la bactérie hôte et l'augmentation de la sensibilité à la protéase pourraient être expliquées par un changement de conformation des protéines de capsid. Dans le cas du MNV, seules des publications descriptives qui comparent son inactivation à celle d'autres virus modèles ou pathogènes ou sur des aliments sont pour l'instant retrouvées (Cromeans *et al.*, 2014; Hewitt *et al.*, 2009; Hirneisen et Kniel, 2013b; Jarke *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012; Seo *et al.*, 2012; Tuladhar *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Une comparaison de la résistance du MNV et du phage MS2 a été réalisée par Seo *et al.* (2012). Pour ces deux virus, une température supérieure à 60°C entraîne une inactivation très rapide mais avec une plus grande résistance du bactériophage MS2 par rapport au MNV. Par contre, les études qui ne se basent que sur la persistance du génome semblent démontrer que les HuNoV sont plus résistants que des virus pathogènes (VHA, poliovirus...) ou des virus modèles (MNV, calicivirus félin...) (Bertrand *et al.*, 2012; Hewitt *et al.*, 2009; Knight *et al.*, 2016; Tuladhar *et al.*, 2012). Deux principales limites à ces conclusions peuvent être émises : (i) le caractère infectieux des particules virales de HuNoV ne sont pas vérifiables à l'heure actuelle et (ii) la détection du génome viral par RT-qPCR ne permet pas de définir la diminution du caractère infectieux du virus. Finalement, comme pour les autres virus, en particulier le poliovirus ou le bactériophage MS2, la chaleur n'agirait que sur la capsid virale du MNV. En effet, l'étude de Wigginton *et al.* (2012) montre que, dans le cas du bactériophage MS2, le génome viral n'est pas altéré par une température de 72°C pendant 3 minutes et moins confirmant une précédente étude sur ce même virus (Pecson *et al.*, 2009). Bien qu'une altération du génome n'ait été pas décrite après exposition à la chaleur une modification de la structure secondaire du génome viral ne peut être exclue.

Un nombre croissant d'études s'intéressent à la discrimination entre virus infectieux et non-infectieux après traitement par la chaleur en utilisant un traitement enzymatique (RNase ou DNase) associé ou non au préalable à la Protéinase K, selon le virus étudié. L'hypothèse serait que le traitement à la chaleur provoque des modifications structurelles et/ou conformationnelles de la capsid virale. Ainsi, celle-ci deviendrait sensible à la Protéinase K et/ou ne protégerait plus le génome viral qui serait accessible au traitement par la RNase ou la DNase. Dans le cas d'un traitement à une température supérieure à 72°C, l'utilisation de la RNase couplée ou non à la Protéinase K est efficace pour le poliovirus, le VHA, le calicivirus félin, le bactériophage MS2, le MNV et le Tulane virus (Hirneisen et Kniel, 2012; Nuanualsuwan et Cliver, 2002; Pecson *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2015). Cependant, Yang et Griffiths (2014) démontrent qu'une exposition à 55°C pendant 40 minutes ne rend le génome du bactériophage MS2 que partiellement accessible à la Protéinase K

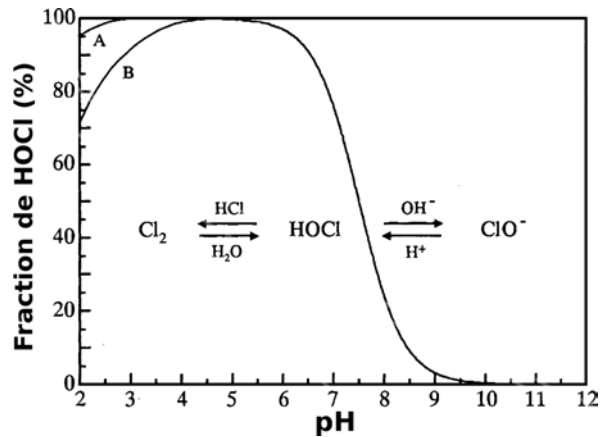
puis la RNase. Cette observation est également faite par Xu *et al.* (2015) avec le Tulane virus dont le génome n'est que partiellement accessible à la RNase après exposition à 56°C pendant 5 minutes. En se plaçant à une température de 37°C, malgré une inactivation virale complète de trois virus (poliovirus, VHA et calicivirus félin), aucun effet de ces enzymes sur le génome viral n'a été observé par Nuanualsuwan et Cliver (2003a). Il semble de ce fait probable qu'il existe une température à partir de laquelle le génome devient accessible à la RNase. En dessous de cette température « critique » l'ARN ou l'ADN du virus non-infectieux n'est pas accessible aux traitements enzymatiques. D'autres auteurs utilisent un intercalant à l'ADN/ARN tel que le PMA ou EMA pour discriminer un virus infectieux d'un non-infectieux. Ces deux molécules, avec un faible poids moléculaire (512 g/mol pour le PMA et 420 g/mol pour l'EMA) sont également utilisées comme marqueurs de viabilité pour des bactéries, des micromycètes et des protozoaires intestinaux (*Cryptosporidium*). (Bae et Wuertz, 2009; Brescia *et al.*, 2009; Fittipaldi *et al.*, 2011; Kim et Ko, 2012; Nocker *et al.*, 2007; Prevost *et al.*, 2016; Vesper *et al.*, 2008). L'efficacité de ce traitement chimique dépend de l'accessibilité du génome viral, soit par la faculté de la molécule à pénétrer au sein de la capsidite soit par un accès direct de la molécule au génome viral. Comme observé avec les traitements enzymatiques, des températures supérieures à 72°C permettent une diminution de la quantité de génome détecté après traitement au PMA ou à l'EMA pour différents virus entériques (poliovirus, VHA, rotavirus, astrovirus) et pour le bactériophage MS2 (Karim *et al.*, 2015; Kim et Ko, 2012; Moreno *et al.*, 2015; Parshionikar *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014). Toutefois même à cette température, cette méthode n'est pas probante pour d'autres virus tel que le MNV, le bactériophage T4 ou le Snow Mountain Virus (souche humaine de norovirus) (Escudero-Abarca *et al.*, 2014; Fittipaldi *et al.*, 2010; Kim et Ko, 2012). Ainsi, une température supérieure à 77°C est requise pour une bonne efficacité de cette méthode sur le Snow Mountain Virus. Par contre, on peut noter que dans le cas du rotavirus ou du bactériophage Phi X 174 ce traitement au PMA ou à l'EMA est peu, voire inefficace, puisque pour ces deux virus semblent laisser pénétrer ces petites molécules sans inactivation (Leifels *et al.*, 2015). Ce type de traitement semble inutilisable si la température à laquelle le virus est soumis est trop faible, comprise entre 4°C et 65°C (Leifels *et al.*, 2015; Prevost *et al.*, 2016). L'ensemble des résultats indiquent que l'efficacité de ces agents intercalants dépend (i) du virus étudié, (ii) de la température et (iii) du temps d'exposition à une température donnée. Toutefois il faut noter que l'état de la capsidite des virus étudiés, intègre ou non, n'est pas abordé dans ces différentes publications.

*En résumé, la chaleur impacte essentiellement la capsid virale. Le génome ne semble pas être altéré, une perte de sa structure secondaire n'est cependant pas exclue. Malgré toutes ces études, les effets moléculaires ou conformationnels de la température sur les protéines de capsid ne sont pas encore expliqués. Néanmoins, il a été montré que la chaleur impacte l'adhésion à la cellule hôte et pourrait impliquer des modifications des propriétés de surface de la capsid virale. Une température d'exposition supérieure à 72°C semblent altérer les capsides de la plupart des virus entériques permettant l'utilisation de traitements enzymatiques (RNase, DNase) ou chimiques (PMA, EMA) qui discriminent les virus infectieux des non-infectieux.*

### III.2. Chlore

La chloration est une technique très utilisée pour désinfecter l'eau destinée à la consommation en raison de son faible coût et de la possibilité de maintenir une concentration résiduelle biocide (Fukuzaki, 2006; Rodriguez et Sérodes, 2001; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). D'autres avantages de son utilisation sont un large spectre d'activité antimicrobienne, une action biocide rapide, une solubilité importante dans l'eau, une facilité de mise en œuvre et une stabilité à différentes concentrations (Fukuzaki, 2006). Néanmoins, son utilisation implique des précautions de manipulation avec une possible formation de sous-produits halogénés potentiellement cancérigènes comme les trihalométhanes, en réaction avec les matières organiques présentes en suspensions. Les acides ou l'ammoniaque ne doivent pas être également utilisés pour éviter la formation de gaz toxique (Deborde et von Gunten, 2008; Fukuzaki, 2006; INRS, 2006). Un substitut existe à l'hypochlorite de sodium, le dioxyde de chlore (ClO<sub>2</sub>), qui ne forme pas ces sous-produits halogénés et peut être utilisé sous forme aqueuse ou gazeuse (Korn *et al.*, 2002; Yeap *et al.*, 2016).

La chloration de l'eau fait partie des traitements oxydants au même titre que l'ozone ou les rayonnements UVs. L'hypochlorite de sodium est le plus utilisé pour les différentes chloration dans le cadre, par exemple, du traitement de l'eau de distribution ou de la production de salades 4<sup>ème</sup> gamme. Les chlores libres issus de l'hypochlorite de sodium sont l'acide hypochloreux (HOCl) et sa base conjuguée, l'ion hypochlorite (ClO<sup>-</sup>) et leur présence dépend du pH de l'eau (**Figure 17**).



**Figure 17. Distribution en pourcentage de l'acide hypochloreux (HOCl) et de sa base conjuguée (ClO<sup>-</sup>) en solution aqueuse en fonction du pH à 25°C (pKa = 7,5).**

**Les courbes A et B sont hypothétiques et dépendent, respectivement, de l'absence ou de la présence de 100 mM de NaCl (adapté de Fukuzaki, 2006).**

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour qualifier l'effet virucide d'un traitement par chloration : le temps de contact entre le virus et le chlore, la température, le pH du milieu, la concentration en chlore, la force ionique du milieu et l'agrégation des virus (Barbeau *et al.*, 2005; Kahler *et al.*, 2010, 2016; Sharp *et al.*, 1980). Son efficacité va notamment dépendre de la qualité de l'eau lors des traitements. La formule C.t est couramment utilisée pour comparer les données d'inactivation, où C correspond à la concentration en chlore (mg/L) et t au temps de contact (minutes). Ainsi, un C.t de 5 mg.min/L peut correspondre soit une concentration de chlore de 5 mg/L pendant 1 minute, soit à une concentration de 0,5 mg/L pendant 10 minutes. Il est donc primordial de noter qu'une même valeur de C.t peut correspondre à des conditions expérimentales très différentes.

Dans la partie expérimentale de ce manuscrit, l'hypochlorite de sodium est la seule espèce du chlore qui sera utilisée. Néanmoins, les études d'inactivation et des mécanismes sont abordées pour l'hypochlorite de sodium et le dioxyde de chlore. Seuls des virus traités dans les mêmes conditions expérimentales en respectant les différents paramètres pourront être comparés. L'effet de la chloration sur un virus peut être analysé en termes d'impact sur (i) l'inactivation, (ii) le génome et/ou (iii) la capsid.

Plusieurs études se sont intéressées à l'inactivation de virus entériques pathogènes (poliovirus, VHA) et de virus modèles tels que le bactériophage MS2 et le MNV par ces traitements oxydants (Cromeans *et al.*, 2014, 2010; Kahler *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2010a; Nuanualsuwan et Cliver, 2003a, 2003b; Shin et Sobsey, 2008; Simonet et Gantzer, 2006a; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003,

2005a; Xue *et al.*, 2013). La température a également un effet sur l'inactivation des virus et des phages, son augmentation implique une hausse de l'inactivation virale (Kahler *et al.*, 2010). Lim *et al.* (2010a) obtiennent 4 log<sub>10</sub> (99,99%) d'inactivation pour le bactériophage MS2 et le MNV pour des C.t, respectivement, de 0,183 et 0,291 mg.min/L à 20°C. Ces valeurs sont nettement inférieures à la concentration de 3 mg.min/L à 20°C recommandée par l'agence de protection environnementale aux Etats-Unis (USEPA) pour obtenir cette inactivation virale. Lors de différents traitements inactivants et notamment pour la chloration, un effet de traîne (en anglais, tailing effect) est observé sur les virus entériques pathogènes mais également pour le bactériophage MS2 ou le MNV (Berman et Hoff, 1984; Chen et Vaughn, 1990; Hornstra *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2013; Mattle et Kohn, 2012; Sigstam *et al.*, 2014). En effet, ces auteurs n'observent pas de relation linéaire entre la concentration et l'inactivation, l'augmentation de la concentration n'entraîne pas une hausse de l'inactivation à partir d'un certain stade. Quatre hypothèses ont été émises pour le bactériophage MS2 dans le cas du dioxyde de chlore : (i) un changement de réactivité de la solution, (ii) une agrégation des virus, (iii) la présence d'une sous-population virale résistance et (iv) un changement dans les propriétés du virus (Sigstam *et al.*, 2014). Les trois premières furent réfutées par leurs différentes expériences (Sigstam *et al.*, 2014), seule une modification des propriétés des virus serait alors la cause de cet effet de traîne. Une étude a évalué l'effet de la chloration sur l'ensemble des quatre génogroupes des bactériophages ARN F-spécifiques (Schaper *et al.*, 2002). Il s'avère que le génogroupe I dont fait partie le bactériophage MS2 est le plus résistant à la chloration et que les génogroupes III et IV sont les plus sensibles. Pour le MNV, une étude a comparé son inactivation par l'hypochlorite de sodium à celle d'autres virus modèles comme le Tulane virus ou le calicivirus félin (Cromeans *et al.*, 2014). Les auteurs concluent que la séquence d'impact de la chloration sur ces virus est la suivante (du plus au moins affecté) : calicivirus félin >> calicivirus porcin ≈ Tulane virus ≈ MNV. Le MNV semble donc un bon modèle parmi les différents modèles utilisés pour les virus entériques après utilisation de l'hypochlorite de sodium. Cette conclusion sur une plus grande sensibilité du calicivirus félin par rapport au MNV mais également par rapport au bactériophage MS2 a été démontrée dans deux études distinctes (Lim *et al.*, 2010a; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). Le MNV serait par contre plus sensible à la chloration que l'adénovirus, l'échovirus ou le coxsackievirus (Cromeans *et al.*, 2010; Kahler *et al.*, 2010).

L'étude de Xue *et al.* (2013) a comparé l'effet de l'hypochlorite de sodium et du dioxyde de chlore sur le rotavirus. Un effet plus global sur le génome du rotavirus est observé avec l'hypochlorite de sodium par rapport au dioxyde de chlore. Cependant, ils remarquent des zones communes pour les deux traitements. Des séquences de gènes, codant des protéines structurales et non-structurales du rotavirus, sont impactées par les deux formes du chlore. Simonet et Gantzer (2006a) montrent

pour le poliovirus que les zones terminales du génome, 5' et 3' seraient plus sensibles au chlore que le reste du génome. Ces conclusions sur des zones du génome plus sensibles que d'autres au chlore avaient été abordées par Li *et al.* (2002b) dans le cadre d'une étude sur le VHA pour lequel la région 5' du génome était plus impactée que les régions codantes. Cette différence de sensibilité selon les régions du génome a également été notée pour le bactériophage MS2 (Wigginton *et al.*, 2012). Une comparaison de l'inactivation par l'hypochlorite de sodium du HuNoV, du poliovirus et du bactériophage MS2 a été faite par Shin et Sobsey (2008). Ces auteurs observent que le poliovirus est le plus résistant à la chloration que le bactériophage MS2 et le HuNoV qui ont une inactivation similaire. Néanmoins, seules des données de perte de signal de RT-qPCR ont été utilisées entre ces trois virus afin de classer le HuNoV par rapport aux deux autres virus. Une revue bibliographique a comparé la persistance du génome du HuNoV à celle du calicivirus félin et du MNV après chloration (Knight *et al.*, 2016). Les données obtenues suggèrent une plus grande résistance du génome du HuNoV que ceux des deux virus fréquemment utilisés comme modèles du HuNoV. Néanmoins, une étude a démontré que la persistance du génome ne pouvait pas être directement corrélée à la persistance du caractère infectieux d'un même virus (Gassilloud *et al.*, 2003). En effet, le calicivirus félin perd très rapidement son caractère infectieux par rapport au poliovirus, mais l'inverse est observé pour le génome viral.

La sensibilité des acides aminés au chlore a fait l'objet de nombreuses études (Armesto *et al.*, 1993; Deborde et von Gunten, 2008; Nightingale *et al.*, 2000; Pattison et Davies, 2001). Une forte réactivité de l'hypochlorite de sodium pour les groupes fonctionnels du soufre est généralement observée (Deborde et von Gunten, 2008). Ces observations impliquent une constante de vitesse de réaction sur les acides aminés soufrés (Met et Cys) au minimum 10 à 100 fois, et jusqu'à un million de fois, plus importante que pour les autres acides aminés. Les acides aminés et les liaisons peptidiques sont affectés par l'hypochlorite de sodium selon la séquence suivante (du plus au moins affecté) : Met > Cys >> Ser ≈ His ≈ Gly ≈ 5' N-term > Val ≈ Ala > Trp > Lys ≈ Pro >> Tyr ≈ Arg > Liaison peptidique (amide) >> Asn ≈ Gln (Deborde et von Gunten, 2008; Hawkins *et al.*, 2003; Nightingale *et al.*, 2000; Pattison et Davies, 2001). D'autres études se sont également intéressées à la réactivité de l'hypochlorite de sodium vis-à-vis des acides nucléiques (Prat *et al.*, 1968; Prütz, 1996), qui est plus importante à pH acide. La séquence suivante est donnée selon la réactivité du ribonucléotide vis-à-vis de l'hypochlorite de sodium (du plus au moins affecté): GMP > TMP >> CMP > AMP (Prütz, 1996). La séquence protéique et nucléique et leur structure propre seraient également importantes sur les cibles du chlore et son impact sur la capsid et/ou le génome (Pattison *et al.*, 2012).

Deux équipes travaillent sur l'oxydation de la capsid virale ou du génome pour comprendre les mécanismes d'inactivation virale mis en jeu lors d'un traitement par l'hypochlorite de sodium (Sano *et al.*, 2010, 2015, Sigstam *et al.*, 2013, 2014; Tojo *et al.*, 2013; Wigginton *et al.*, 2012). Des différences sur les protéines de capsid sont observées après une oxydation des particules virales par chloration (Sano *et al.*, 2010, 2015; Tojo *et al.*, 2013). En effet, le nombre de groupements carbonyles augmenterait à la surface des particules virales et permettrait une fixation de ces virus oxydés avec une méthode utilisant le système biotine-avidine. Ces expériences ont été réalisées sur le HuNoV du génogroupe II, le rotavirus A, l'astrovirus du sérotype 4 et le MNV pour des concentrations d'hypochlorite de sodium comprises entre 0,05 et 1 mg/L et un temps d'exposition de 3 à 15 minutes (Sano *et al.*, 2010, 2015; Tojo *et al.*, 2013). Pour certains acides aminés tels que la lysine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine, la cystéine ou encore la méthionine, des produits d'oxydation différents des groupements carbonyles peuvent se former (Heinecke *et al.*, 1999; Levine *et al.*, 1999; Lewisch et Levine, 1995; Nightingale *et al.*, 2000; Schöneich, 2005; Sharov *et al.*, 2006; Winterbourn et Kettle, 2000). De plus, 13% à 50% des astrovirus ou MNV non exposés à l'hypochlorite de sodium sont déjà reconnues par le système biotine-avidine, ceci pourrait être lié à un stress oxydatif provoqué par la cellule hôte lors du cycle de réplication du virus (McGuire *et al.*, 2011). Au contraire des observations faites après exposition à la chaleur, un traitement à l'hypochlorite de sodium ne modifierait pas le *pI* du poliovirus (O'Brien et Newman, 1979).

Peu d'informations sur l'accessibilité des génomes viraux sont disponibles au PMA, à l'EMA ou aux enzymes telles que la RNase ou la DNase après exposition au chlore. Trois études ont utilisé les traitements enzymatiques (RNase ou DNase) après exposition au chlore pour essayer de discriminer les virus infectieux des non-infectieux (de Abreu Corrêa *et al.*, 2012; Nuanualsuwan et Cliver, 2003a; Xu *et al.*, 2015). Nuanualsuwan et Cliver (2003a) démontrent l'efficacité du traitement enzymatique pour le VHA après chloration à 1,25 mg/L à 5°C. Cette conclusion n'a pu être confirmée pour le poliovirus et le calicivirus félin puisque la chloration n'a abouti qu'à des résultats en RT-PCR négatifs et ce sans traitement enzymatique. La RNase a également été utilisée pour le Tulane virus par Xu *et al.* (2015). Au contraire des résultats obtenus par Nuanualsuwan et Cliver (2003a), le traitement à la RNase après chloration ne permet pas de différencier des Tulane virus infectieux et non-infectieux. Des conclusions identiques ont été formulées par de Abreu *et al.* (2012) pour l'adénovirus et le MNV.

Le PMA ou l'EMA ont également été utilisés après exposition au chlore. Une très bonne efficacité de ces molécules est rapportée pour des virus entériques pathogènes et des modèles de ces virus pathogènes (Karim *et al.*, 2015; Leifels *et al.*, 2015; Parshionikar *et al.*, 2010; Prevost *et al.*, 2016). Ces molécules amélioreraient la détection des virus infectieux après exposition au chlore pour



le poliovirus, l'échovirus, le coxsackievirus, le rotavirus, l'adénovirus ou encore le MNV. Toutefois, ces traitements sont peu efficaces pour le bactériophage Phi X 174 et l'adénovirus (Leifels *et al.*, 2015). Pour l'adénovirus, des sérotypes distincts (5 et 41) et/ou des conditions expérimentales différentes peuvent expliquer la variation entre les deux études (Leifels *et al.*, 2015; Prevost *et al.*, 2016). Par contre, aucune publication n'a utilisé un de ces deux traitements pour le bactériophage MS2. Il faut noter que le PMA ou l'EMA ont initialement été évalués en microbiologie pour améliorer la discrimination entre les bactéries vivantes et inactivées pour des Salmonelles et des Légionnelles notamment (Chang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2015; Nocker *et al.*, 2007).

Une comparaison de l'effet de l'hypochlorite de sodium et du dioxyde de chlore sur les étapes du cycle viral du bactériophage MS2 a été réalisée (Wigginton *et al.*, 2012). Il en résulte que les mécanismes d'inactivation par les deux espèces de chlore sont différents. En effet, le dioxyde de chlore empêcherait majoritairement l'étape d'adhésion à la cellule hôte ce qui n'est pas le cas avec l'hypochlorite de sodium. Celui-ci altérerait les étapes d'injection et de réplication du génome. Cette observation sur l'impact de l'hypochlorite de sodium a été également faite pour l'adénovirus de type 2 (Page *et al.*, 2010). Une étude réalisée sur l'inactivation du MNV déposé sur des coupons en inox par le dioxyde de chlore gazeux apporte d'autres éléments sur les mécanismes d'inactivation (Yeap *et al.*, 2016). Au contraire des observations faites pour le bactériophage MS2 par Wigginton *et al.* (2012), le dioxyde de chlore altère la capsid et le génome viral du MNV. Des différences de mécanismes d'inactivation entre le bactériophage MS2 et le MNV et/ou entre le dioxyde de chlore sous forme aqueuse ou gazeuse ne sont pas à exclure.

Globalement, les mécanismes d'inactivation peuvent donc varier d'un virus à l'autre mais également en fonction de la forme de chlore utilisée : l'hypochlorite de sodium ou le dioxyde de chlore (Cromeans *et al.*, 2010; Sharp *et al.*, 1980; Sigstam *et al.*, 2013; Wigginton *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2013). Cette variation de réponse peut s'expliquer par des différences structurales ou génomiques, impliquant une résistance distincte pour chaque virus, comme observée, par exemple, dans le cadre des bactériophages ARN F-spécifiques (Schaper *et al.*, 2002; Sigstam *et al.*, 2013).

*En résumé, le chlore est un agent oxydant à large spectre. Il est très largement utilisé dans les traitements des eaux et en industrie agro-alimentaire. L'hypochlorite de sodium, forme de chlore la plus couramment utilisée, va impacter la capsid et le génome viral. Les mécanismes d'inactivation par le chlore sont peu connus mais des cibles préférentielles au niveau des acides aminés et des acides nucléiques ont été mises en évidence. D'autres étapes du cycle viral que l'adhésion à la cellule hôte semblent être impactés par l'hypochlorite de sodium, les mécanismes d'inactivation par le dioxyde de*

chlore étant différents. Ces diverses altérations de la particule virale pourraient alors engendrer des modifications des propriétés de surface après exposition au chlore.

### III.3. Ozone

L’ozone est un agent oxydant plus puissant que le chlore, il possède un potentiel oxydant de 2,07 mV contre 1,49 mV et 1,27 mV pour, respectivement, l’hypochlorite de sodium et le dioxyde de chlore (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003). L’ozone est un désinfectant très polyvalent altérant aussi bien les bactéries que les parasites, les protozoaires ou les virus (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Herbold *et al.*, 1989; Hirneisen *et al.*, 2010). En solution, l’ozone se décompose très rapidement en différentes espèces radicalaires comme le superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) ou l’hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) selon le schéma ci-dessous (Figure 18). La réactivité de l’ozone s’explique par l’ensemble des radicaux libres formés lors de sa décomposition.

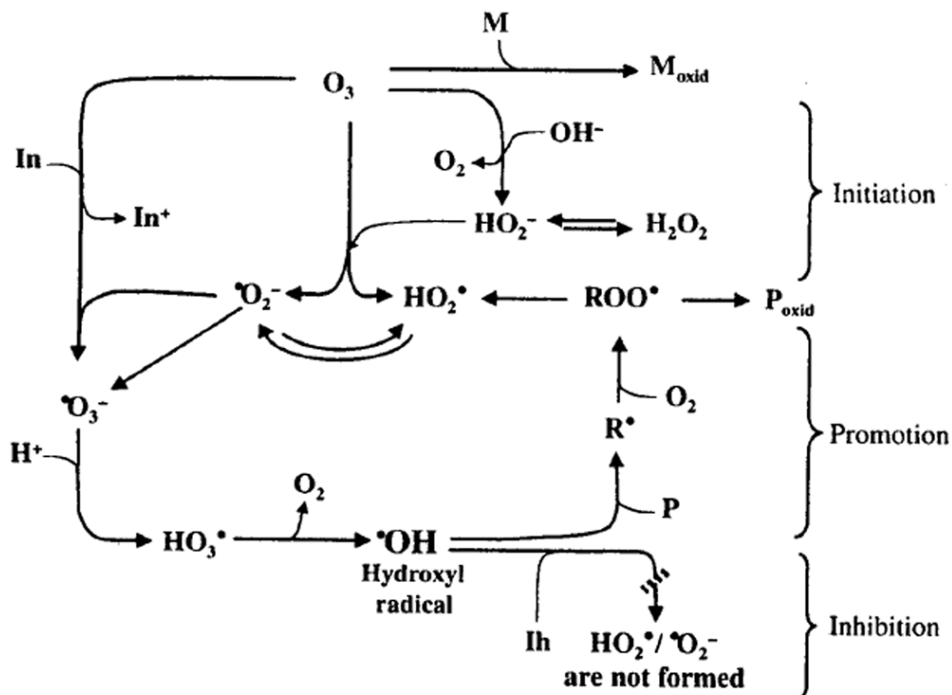


Figure 18. Les réactions de décomposition de l’ozone (adapté de Kim *et al.*, 2003).

M, soluté ; In, initiateur ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{HO}_2^-$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $-\text{SH}$ , UV) ; P, promoteur ( $\text{O}_3$ ,  $-\text{SH}$ ,  $\text{R}-\text{CH}_2\text{OH}$ , groupement aryle) ; Ih, Inhibiteur (groupement alkyle,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $t\text{-BuOH}$ ,  $-\text{SH}$ ).

La production d’ozone se fait généralement selon le procédé de décharge-corona qui rompt la stabilité de la molécule d’oxygène et forme deux radicaux d’oxygène. Ces radicaux peuvent se combiner avec les molécules d’oxygène pour former des molécules d’ozone. Comme pour le chlore, la formule C.t est utilisée dans le cadre des traitements par l’ozone. L’ozone peut être utilisé sous

forme gazeuse ou liquide. L'utilisation de l'ozone implique des règles importantes de sécurité pour tous les utilisateurs. En effet, une exposition à l'ozone provoque des lésions irritantes des muqueuses respiratoires pouvant aller jusqu'à l'œdème pulmonaire pour des concentrations supérieures ou égales à 18 mg/m<sup>3</sup> dans l'air (Inrs, 2013). Les effets à long terme sont méconnus de par la difficulté à les différencier d'autres expositions. Dans l'eau, le principal inconvénient de son utilisation est la formation potentiel de bromates potentiellement cancérigènes, mesurés lors des traitements de l'eau (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; von Gunten, 2003a, 2003b, 2007). La solubilité de l'ozone dans l'eau est par ailleurs faible et dépend fortement de la température (**Tableau 8**).

**Tableau 8. Relation entre la température et la solubilité de l'ozone dans l'eau (Guzel-Seydim *et al.*, 2004).**

Température (°C)	Solubilité (litre d'O <sub>3</sub> /litre d'eau)
0	0,640
15	0,456
27	0,270
40	0,112
60	0,000

L'efficacité de l'ozone, comme pour le chlore, dépend du pH, de la température et de la présence de matière organique (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Herbold *et al.*, 1989; Hirneisen *et al.*, 2010; Hoigné, 1998; Khadre *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 1982). Sa demi-vie dépend de la qualité de l'eau, elle est de l'ordre de la seconde à plusieurs heures (Hoigné, 1998; von Gunten, 2007). Dans le cadre des traitements de l'eau, elle varie entre 1 et 30 minutes (Hoigné, 1998). Pour un meilleur résultat, l'utilisation de l'ozone peut être couplée aux rayonnements UV, au peroxyde d'hydrogène ou à la température de manière séquentielle (Kim *et al.*, 2003; von Gunten, 2007).

Les études d'inactivation virale concernent plus souvent la chaleur ou le chlore que l'ozone. Cependant, des études sur des virus entériques pathogènes tels que le poliovirus, le VHA ou l'adénovirus ainsi que le bactériophage MS2, le MNV ou le calicivirus félin ont été publiées (Finch et Fairbairn, 1991; Herbold *et al.*, 1989; Hirneisen *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2010b; Predmore *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 1981, 1982; Shin et Sobsey, 2003; Thurston-Enriquez *et al.*, 2005b; Wang *et al.*, 2015a). Deux études ont comparé la résistance du bactériophage MS2 et du poliovirus de type 1 ou 3, elles ont montré que le bactériophage MS2 était plus sensible que le poliovirus à l'ozone dans leurs

conditions expérimentales (Finch et Fairbairn, 1991; Shin et Sobsey, 2003). Roy *et al.* (1982) ont comparé la résistance à l’ozone de poliovirus 1 et 2, d’échovirus et de coxsackievirus. Ils ont conclu à la séquence suivante (du plus au moins affecté) : coxsackievirus A9 > echovirus 5 > coxsackievirus B5 > poliovirus 1 > echovirus 1 > poliovirus 2. Les résistances semblent dépendantes du virus mais, également de sa souche. Herbold *et al.* (1989) ont comparé la résistance à l’ozone du VHA et du poliovirus. Le VHA apparaît comme plus résistant que le poliovirus. En effet, une inactivation de 4  $\log_{10}$  (99,99 %) de ces virus est obtenue à 20°C avec une concentration de 0,09 ppm pendant 12,7 secondes pour le poliovirus, contre 0,10 ppm pendant 9,2 minutes pour le VHA. Deux comparaisons de l’inactivation du MNV et du Tulane virus en milieu aqueux et sur des matrices alimentaires (salade, fraise, luzerne germée) par l’ozone ont été réalisées (Predmore *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015a). D’après leurs études, le Tulane virus est plus résistant que le MNV en milieu aqueux de même qu’au contact de luzerne germée en milieu aqueux. Au contraire, le MNV est plus résistant que le Tulane virus sur la salade ou la fraise.

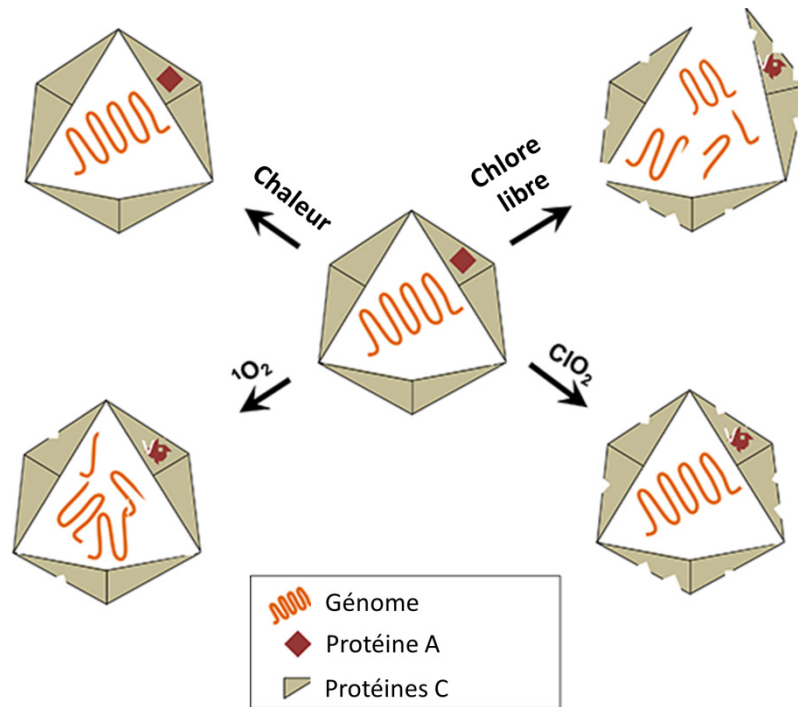
Les mécanismes mis en jeu lors de l’inactivation virale par l’ozone sont peu connus, en particulier au niveau des cibles de l’ozone. Trois études se sont intéressées aux cibles de l’ozone pour le poliovirus de type 1, le MNV, le Tulane virus et le bactériophage f2, proche du bactériophage MS2 (Kim *et al.*, 1980; Predmore *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 1981). L’ozone semble agir à la fois sur la capsidie et sur le génome du poliovirus (Kim *et al.*, 1980; Roy *et al.*, 1981). Les protéines VP1 et VP2 du poliovirus seraient particulièrement affectées par l’ozone au contraire de la protéine VP4 qui est importante dans l’étape d’adhésion à la cellule hôte. Les effets de l’ozone sur le génome ont été évalués par gradient de densité. Le génome viral exposé à l’ozone possède un profil de sédimentation différent de celui issu de virus non exposé. Predmore *et al.* (2015) observent un effet dose-dépendant de l’ozone sur l’aspect des particules virales du MNV et du Tulane virus. En effet, l’augmentation du temps d’exposition induit une destruction progressive des particules virales observées en microscopie électronique. La protéine majoritaire de la capsidie virale, VP1, de MNV et du Tulane virus n’est plus détectée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) dès 10 minutes de temps de contact alors que le génome reste détectable jusqu’à 40 minutes d’exposition à l’ozone. Kim *et al.* (1980) ont observé une inactivation virale très importante du bactériophage f2, supérieure à 4  $\log_{10}$  (99,99 %), et ce dès 5 secondes d’exposition à 0,09 ou 0,8 mg/L. Dans ces conditions, la capsidie puis le génome du phage sont impactés. Ces auteurs ont également observé que l’ARN libre serait moins sensible à l’ozone que l’ARN encapsidé. Ils ont émis l’hypothèse que les protéines de la capsidie virale pourraient impliquer le génome dans une réaction secondaire avec les acides aminés modifiés par l’ozone.

L'étude de Mudd *et al.* (1969) s'est intéressée aux cibles préférentielles de l'ozone au niveau des acides aminés afin de déterminer les zones clés impactées par l'ozone sur les protéines. Seuls les acides aminés suivants sont affectés par l'ozone selon la séquence suivante (du plus au moins affecté) : la cystéine, la méthionine, le tryptophane, la tyrosine, l'histidine et la phénylalanine. Les acides aminés aliphatiques ne seraient pas affectés par l'ozone. De la même manière, sur les bases pyrimidiques de l'acide nucléique, une seule étude a évalué leur ordre de réactivité vis-à-vis de l'ozone en utilisant les acides nucléiques d'*E. coli* (Prat *et al.*, 1968). La thymine est la base nucléique la plus sensible suivie de la cytosine puis l'uracile.

Les informations disponibles sur l'accessibilité des génomes viraux au PMA, à l'EMA ou aux enzymes telles que la RNase ou la DNase à l'ozone sont rares. L'unique étude référencée à ce jour concerne le MNV avec un traitement à la RNase (Hirneisen et Kniel, 2012). Après exposition à 6,25 ppm à température ambiante et pH neutre, le génome de MNV n'est pas accessible à la RNase et ce malgré une inactivation complète du virus ( $> 6 \log_{10}$ ). La capsidie possède donc toujours son rôle protecteur du génome viral. Le PMA n'a été utilisé après exposition à l'ozone que dans le cas d'une étude sur la détection de bactéries viables (Lee *et al.*, 2015). Il s'avère que le PMA est assez efficace et permet de suivre la perte du caractère infectieux de la bactérie étudiée par l'ozone.

*En résumé, l'ozone est un agent oxydant plus puissant que le chlore qui provoque à la fois des modifications de la capsidie protéique mais aussi du génome viral. Les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'exposition à l'ozone sont méconnus. Etant donné l'effet global de l'ozone sur les composantes protéiques et nucléiques sur les particules virales, une modification des propriétés de surface peut être attendue.*

Ainsi, la capside et/ou le génome peuvent être impactés au cours de l'inactivation virale. Wigginton *et al.* (2012) ont comparé l'effet du chlore libre (hypochlorite de sodium), du dioxyde de chlore, de la chaleur et de l'oxygène singulet (formé lors de la décomposition de l'ozone), sur la capside et le génome du bactériophage MS2. Les conclusions de leur étude sont schématisées sur la **Figure 19**.



**Figure 19. Impact de différents traitements sur la structure du bactériophage MS2 (adapté de Wigginton *et al.*, 2012).**

*En conclusion, la chaleur, l'hypochlorite de sodium et l'ozone sont largement utilisés dans le traitement de l'eau ou des denrées alimentaires (salade, fruits rouges...). Ces trois types de traitements présentent des caractéristiques, des avantages et des inconvénients distincts. Ainsi au niveau des particules virales, la chaleur agit uniquement sur les protéines de capside alors que l'hypochlorite de sodium et l'ozone ont une action sur les protéines de capside et sur le génome. En raison d'une action de ces trois traitements sur les protéines de capside, des modifications des propriétés de surface (charge électrostatique globale et hydrophobie) des particules virales peuvent être attendues.*

## IV. Propriétés de surface des particules virales

Les particules virales peuvent être caractérisées par leurs propriétés de surface représentées par la charge électrostatique globale et l'hydrophobie. Les propriétés de surface vont notamment gouverner le devenir de ces particules dans l'environnement en termes d'adhésion aux surfaces, de diffusion dans l'environnement et de résistance aux traitements physiques tels que la filtration (Boudaud *et al.*, 2012; Dika *et al.*, 2013b; Langlet *et al.*, 2009). D'autres paramètres tels que la température, le pH, la force ionique, le taux de matière en suspension et la concentration en particules virales peuvent influencer leur comportement dans l'environnement.

### IV.1. Charge électrostatique globale

Un virus est constitué par un génome à ARN ou ADN, protégé par une capsid. La capsid du virus résulte de l'assemblage de protéines qui sont constituées d'une succession d'acides aminés ayant des caractéristiques physico-chimiques distinctes. En effet, les acides aminés expriment une charge positive ou négative au niveau de leur chaîne latérale via, notamment, des groupements amines ou carboxyles. Les chaînes latérales des acides aminés sont responsables de la majorité de la charge exprimée par le virus, les extrémités 5' (-NH<sub>2</sub>) et 3' (-COOH) participent à cette charge de façon minoritaire (Patrickios et Yamasaki, 1995; Skoog et Wichman, 1986). Les acides aminés peuvent être également plus ou moins hydrophobes selon le groupement latéral. Au total, 20 acides aminés vont composer les protéines virales et se différencient par leur chaîne latérale qui peut être ionisée pour certains groupements (-COOH, -NH<sub>2</sub>,...) en fonction des valeurs de pH du milieu. Ainsi, le *pKa* des acides aminés donne une indication sur la charge exprimée par la chaîne latérale. Divers classements des acides aminés peuvent être réalisés en fonction de différents critères (charge, hydrophobie...). Un tableau descriptif des acides aminés est présenté dans le **Tableau 9**.

Tableau 9. Récapitulatif et description des 20 acides aminés retrouvés au sein des protéines de capsid virale (Kyte et Doolittle, 1982; Lippard et Berg, 1997; Pratt et Cornely, 2011).

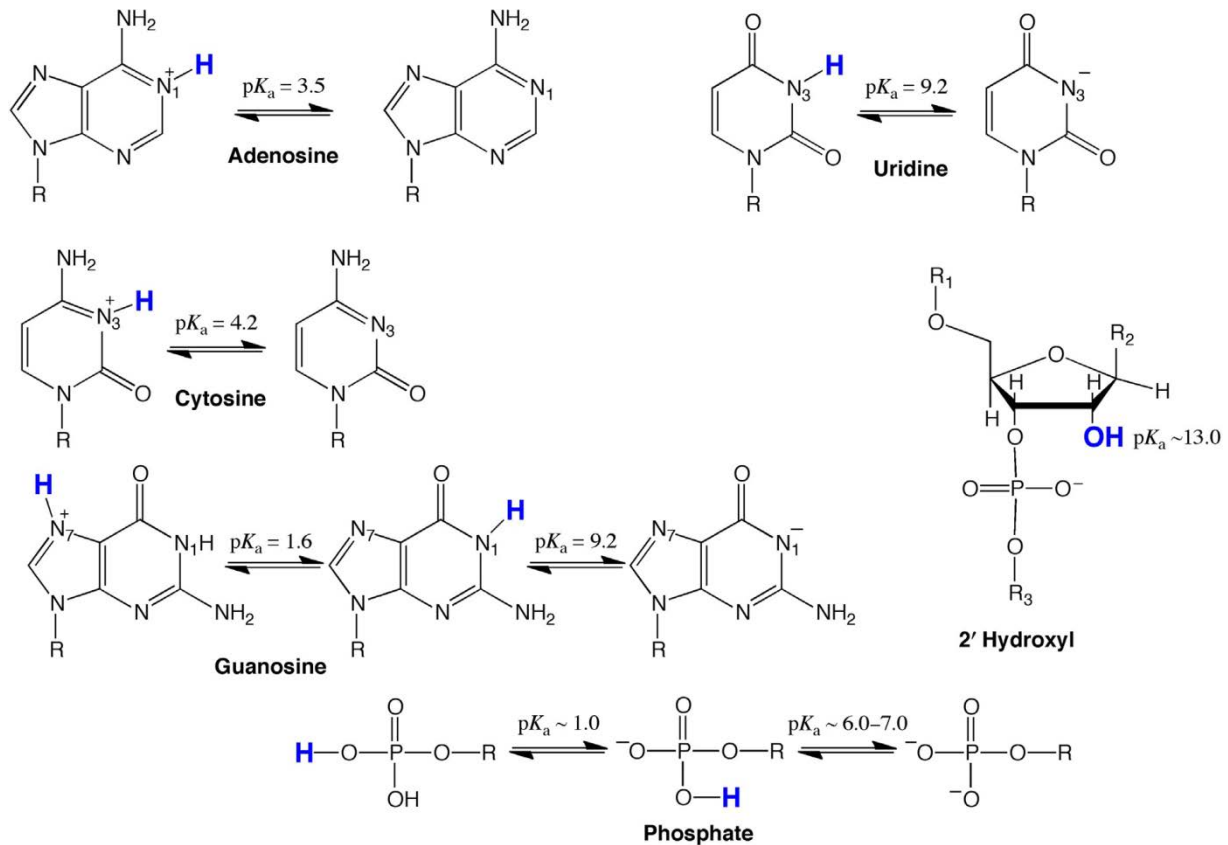
L'indice d'hydrophobie correspond à l'hydrophobie relative de chaque acide aminé. Les acides aminés hydrophobes ou hydrophiles ont des indices, respectivement, positifs ou négatifs. Plus la valeur absolue est élevée, plus le caractère hydrophobe ou hydrophile est important.

Acides aminés	Code 3 lettres (1 lettre)	Famille de la chaîne latérale : groupement	Indice d'hydrophobie	pK <sub>r</sub> <sup>a</sup>	Charge de la chaîne latérale en fonction du pH
Glycine	Gly (G)		- 0,4		
Alanine	Ala (A)		1,8		
Valine	Val (V)	Aliphatique : X <sup>b</sup>	4,2	-	x
Isoleucine	Ile (I)		4,5		
Leucine	Leu (L)		3,8		
Sérine	Ser (S)		Hydroxylé : -OH	- 0,8	-
Thréonine	Thr (T)	- 0,7			
Méthionine	Met (M)	Soufré : -SX <sup>b</sup>	1,9	-	0 7 14 Neutre
Cystéine	Cys (C)		2,5	8,4	0 8,4 14 Neutre Négatif
Acide aspartique	Asp (D)	Dicarboxylique : -COOH	- 3,5	3,9	0 4 14 Neutre Négatif
Acide glutamique	Glu (E)		- 3,5	4,1	
Arginine	Arg (R)		- 4,5	12,5	0 12,5 14 Positif Neutre
Histidine	His (H)	Diaminé : -NH <sub>2</sub>	- 3,2	6,0	0 6 14 Positif Neutre
Lysine	Lys (K)		- 3,9	10,5	0 10,5 14 Positif Neutre
Asparagine	Asn (N)		Amidé : - CONH <sub>2</sub>	- 3,5	-
Glutamine	Gln (Q)	- 3,5			
Phénylalanine	Phe (F)	Aromatique : Cycle aromatique	2,8	-	0 7 14 Neutre
Tryptophane	Trp (W)		- 0,9		
Tyrosine	Tyr (Y)		- 1,3	10,5	0 10,5 14 Neutre Négatif
Proline	Pro (P)	Imidazole : Cycle imidazole	- 1,6	-	0 7 14 Neutre
Extrémité -COOH libre			-	≈ 2-3	0 2-3 14 Neutre Négatif
Extrémité -NH <sub>2</sub> libre			-	≈ 9-10	0 9-10 14 Positif Neutre

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



Les acides nucléiques, formant l'ADN ou l'ARN viral, possèdent des fonctions ionisables caractérisées par leur  $pK_a$  comme les acides aminés. Seuls les composants de l'ARN sont représentés sur la **Figure 20**. A pH 7, l'ensemble des quatre bases azotées et le ribose ne sont pas chargés. Cependant, les groupements phosphates vont être chargés négativement. Le  $pK_a$  des différents acides nucléiques au sein d'un brin d'ARN ou ADN composés de milliers de nucléotides est inconnu.



**Figure 20.  $pK_a$  et sites de protonation (en bleu) des quatre bases azotées, du ribose et du groupement phosphate (d'après Thaplyal et Bevilacqua, 2014).**

Concernant la charge globale, une particule virale est caractérisable par son point isoélectrique ( $pI$ ) qui correspond à la valeur de pH pour laquelle celle-ci est nulle. La charge globale d'un virus est positive en dessous du  $pI$  et négative au-dessus du  $pI$  (Gerba, 1984; Michen et Graule, 2010). Ainsi, la valeur du  $pI$  nous renseigne sur la charge globale du virus à un pH donné de façon qualitative. La valeur du  $pI$  d'un virus peut être déterminée de façon théorique ou expérimentale.

La détermination théorique du  $pI$  se base sur la séquence primaire en acides aminés des protéines de la capsid et sur le  $pK_a$  de la chaîne latérale de chaque acide aminé. Ce calcul ne tient pas compte de la contribution du génome à la charge globale des particules virales. De plus, dans certaines estimations la structure en trois dimensions des protéines de capsid n'est pas prise en considération (Li *et al.*, 2005). Pour le bactériophage MS2, le calcul théorique du  $pI$  a été effectué par

plusieurs équipes et serait supérieur à 8 (Armanious *et al.*, 2016; Langlet, *et al.*, 2008b; Penrod *et al.*, 1996; Schaldach *et al.*, 2006). D'autres bactériophages ARN F-spécifiques (fr, GA et Q $\beta$ ) possèdent également un *pI* théorique supérieur à pH 8 (Armanious *et al.*, 2016). En tenant uniquement compte des acides aminés présents sur la surface externe de la capsid, Penrod *et al.* (1996) aboutissent à une valeur de *pI* de 4 pour le phage MS2. Une valeur similaire (3,9) a également été déterminée par Armanious *et al.* (2016) pour le phage MS2. La valeur de *pI* théorique a également été déterminée pour trois autres bactériophages ARN F-spécifiques, fr (4,5), GA (5,0), Q $\beta$  (4,9). Dans le cas du MNV, une valeur théorique de *pI* de 4,8 a été obtenue en ne prenant en compte que la protéine majoritaire de capsid VP1 (Bolton *et al.*, 2013).

Le *pI* peut également être déterminé de façon expérimentale par différentes méthodes. Dans la littérature, les deux méthodes principales sont la focalisation isoélectrique et la mobilité électrophorétique (Michen et Graule, 2010). La focalisation isoélectrique consiste à faire migrer des virus dans un gel contenant un gradient de pH. La migration est induite par un courant électrique. Les particules virales arrêtent leur migration dans la zone de pH correspondant à leur *pI*. La migration des particules virales sur le gel peut être suivie par un marquage radioactif préalable des particules virales ou par l'analyse de différentes zones du gel qui déterminera celle contenant la plus forte concentration en particules virales. Une autre méthode de détermination du *pI* repose sur la microélectrophorèse qui consiste à mesurer la vitesse de migration d'un virus dans un champ électrique. Cette vitesse de migration rapportée au champ électrique permet d'obtenir une valeur de mobilité électrophorétique. La mobilité électrophorétique ( $\mu$ ) correspond à l'ensemble des mouvements des particules en suspension dans un liquide soumis à l'influence d'un champ électrique et s'exprime en  $m^2.V^{-1}.s^{-1}$ . Les mesures sont effectuées pour différentes valeurs de pH dans un milieu de faible force ionique. Cette méthode permet d'estimer le *pI* et correspond au pH pour laquelle la mobilité électrophorétique est nulle ( $\mu = 0$ ). Les mesures de mobilité électrophorétique sont quantitatives et permettent de comparer la charge globale de deux virus à une valeur de pH donnée (Redman *et al.*, 1997). Une méthode récente utilisant la technologie « Tunable Resistive Pulse Sensing » pourrait également permettre de déterminer la charge de particules virales. Il s'agit d'un système basé sur l'impédance. Une tension est appliquée à travers un pore rempli d'électrolyte ce qui entraîne un courant ionique. A chaque fois qu'une particule traverse ce pore, elle génère une diminution temporaire de courant. Cette diminution se manifeste sous forme d'un pic proportionnel à la taille de la particule. La largeur du pic correspond à la charge des particules virales exprimée en potentiel zêta. La longueur du pic correspond à la taille des particules et sa fréquence permet d'estimer la concentration en particules dans l'échantillon. Cette technique permet donc également de déterminer dans un échantillon le nombre de particules virales et leur distribution de taille avec une limite minimale de taille de 50 nm (Akpınar et Yin, 2015; Farkas *et al.*, 2013; Gaudin et

Barteneva, 2015; Vogel *et al.*, 2011). Cette limite de taille ne permet pas de travailler avec la plupart des virus entériques pathogènes et leurs modèles. Par contre, des mesures de taille ont été réalisées avec cette dernière méthode pour l'adénovirus et le rotavirus (Farkas *et al.*, 2013; Vogel *et al.*, 2011).

Plusieurs équipes ont définies, de façon expérimentale, les valeurs de *pI* de virus entériques pathogènes pour l'homme et de virus modèles tel que le bactériophage MS2 (**Tableau 10**). Ces déterminations expérimentales ont abouties à des valeurs de *pI* comprises entre 3,1 et 3,9 pour le phage MS2 (Langlet *et al.*, 2008a; Overby *et al.*, 1966; Redman *et al.*, 1997).

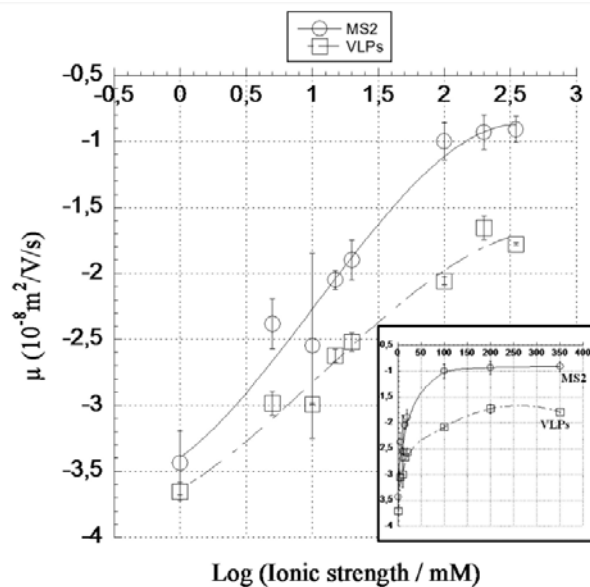
**Tableau 10. Point isoélectrique expérimental de virus entériques pathogènes pour l'homme et de bactériophages (adapté de Jin et Flury, 2002; Michen et Graule, 2010; Samandougou *et al.*, 2015).**

Famille	Genre	Virus	<i>pI</i>
<b>Picornaviridae</b>	<i>Enterovirus</i>	Poliovirus (1 et 2)	4,5 à 8,2
		Echovirus 1 (différentes souches)	5,0 à 6,4
		Coxsackievirus (différentes souches)	4,75 à 6,75
	<i>Hepatovirus</i>	VHA	2,8
<b>Caliciviridae</b>	<i>Norovirus</i>	HuNoV (VLP)	4,2 à 6,0
	<i>Vesivirus</i>	Calicivirus félin (VLP)	3,9
<b>Reoviridae</b>	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus A	8,0
<b>Adenoviridae</b>	<i>Mastadenovirus</i>	Adénovirus 5	4,5
<b>Leviviridae</b>	<i>Levivirus</i>	MS2	3,1 à 3,9
	<i>Allolevivirus</i>	Q $\beta$	2,7 à 5,3

Une grande variabilité des valeurs de *pI* existe entre ces différents virus, mais ils sont en majorité chargés négativement à pH 7. Pour un même virus, les différences de valeurs de *pI* peuvent être dues aux méthodes utilisées, à la formation d'agrégats et aux méthodes de purification appliquées aux particules virales (Dika *et al.*, 2013a; Michen et Graule, 2010).

Une donnée supplémentaire à prendre en compte est que la détermination de la charge d'une particule diffère selon que celle-ci est considérée comme « dure » ou « molle ». Une particule est considérée comme « dure » lorsque sa surface possède une limite nette. Sa charge peut alors être assimilée au potentiel zêta (Duval et Ohshima, 2006) qui représente la charge de surface à l'interface liquide-solide. Les particules biologiques telles que les acides humiques, polysaccharides, bactéries, mais aussi les virus sont considérées comme des particules « molles ». Ces particules présentent une perméabilité hydrodynamique permettant à leurs composants internes d'influer sur leur charge globale. Pour ce type de particules la notion d'interface est préférée à celle de surface

(Ohshima, 1995). Pour nos virus d'intérêts, l'interface comprendrait l'ensemble des structures virales (capside et génome) qui peuvent interagir entre elles et avec leur environnement. La perméabilité des particules virales, qui correspond à leur capacité à laisser passer le flux hydrodynamique, et l'influence du génome sur leur charge ont notamment été montrées pour le bactériophage MS2 (Dika *et al.*, 2011; Langlet *et al.*, 2008b). Pour cela, des mesures de la mobilité électrophorétique ont été réalisées en fonction de la force ionique du milieu à pH constant (Dika *et al.*, 2011; Langlet *et al.*, 2008b). Avec les particules « molles », la mobilité électrophorétique ne devient jamais nulle même pour des forces ioniques élevées supérieures à 100 mM (Langlet *et al.*, 2008b). La **Figure 21** représente des mesures de mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique pour le bactériophage MS2 et des VLPs de ce même phage.



**Figure 21. Mobilité électrophorétique du bactériophage MS2 et de VLPs de MS2 en fonction de la force ionique à pH 7 (Dika *et al.*, 2011).**

Lors de la mesure de mobilité électrophorétique, deux principaux paramètres interviennent dans les propriétés électrostatiques du virus, sa charge et son hydrodynamisme (Dika *et al.*, 2011; Langlet *et al.*, 2008b). La pente de la courbe représente le ratio entre la densité de charge interne et de charge externe d'une particule virale (Langlet *et al.*, 2008b). Pour une même densité de charge externe, la pente de cette courbe est d'autant plus importante que la densité de charge interne l'est également. La pente obtenue est donc plus importante pour les particules entières de phage MS2 que pour ces VLPs (Dika *et al.*, 2011). Ceci démontre que le génome à l'intérieur de la capsid peut avoir un impact sur la charge d'un virus. Le plateau observé à haute force ionique est la caractéristique principale des particules « molles » (Langlet *et al.*, 2008b). Une différence importante de mobilité électrophorétique est observée entre les bactériophages MS2 et leurs VLPs à force

ionique élevée. La mobilité électrophorétique des phages au plateau est en effet plus faible que celle de leurs VLPs. Cette différence peut être expliquée par une plus faible perméabilité des phages complets par rapport à des VLPs (Dika *et al.*, 2011). L'absence d'agrégation des particules doit être vérifiée impérativement avant des mesures de mobilité électrophorétique, en fonction de la force ionique ou du pH. En effet, l'agrégation aura un impact sur les mesures de mobilité électrophorétique des particules par modification de leur hydrodynamie (Langlet *et al.*, 2008a; Mattle *et al.*, 2011).

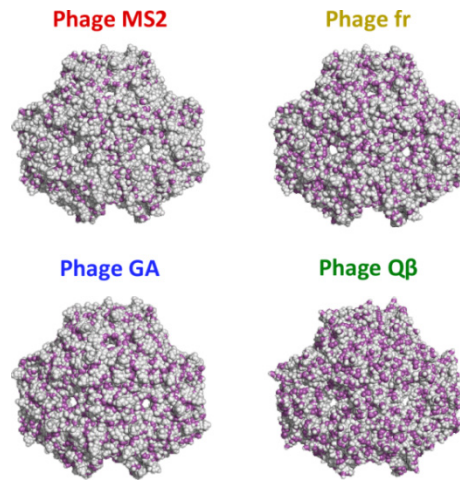
Les groupements ionisables des acides aminés, et des phosphates (ARN ou ADN) vont impliquer des interactions électrostatiques. Ces interactions dépendent du pH mais également de la concentration saline (Armanious *et al.*, 2016). Deux particules de même signe provoqueront une répulsion alors que deux particules de signe contraire s'attireront. L'intensité de ces interactions électrostatique dépend de la distance. Plus celle-ci est importante, plus l'intensité de ces interactions électrostatiques diminue. L'implication des interactions électrostatiques a été étudiée dans le cas de l'adhésion virale (Armanious *et al.*, 2016; Lukasik *et al.*, 2000; Penrod *et al.*, 1996; Shields et Farrah, 2002; van Voorthuizen *et al.*, 2001). Pour les phages MS2, Q $\beta$  et les VLPs du phage MS2, Armanious *et al.*, (2016) montrent l'importance des forces électrostatiques dans le phénomène d'adhésion sur des surfaces chargées positivement ( $-\text{NH}_3^+$ ) à des valeurs de pH compris entre 5 et 8. Il s'agissait dans ces expériences de forces attractives. Des tests d'adhésion avec des surfaces chargées négativement ( $-\text{COO}^-$ ) ont été également réalisés dans cette étude. Aucune adhésion n'est observée à des pH compris entre 7 et 8 pour les bactériophages testés puisqu'une répulsion est observée entre les particules virales et la surface chargées négativement. Une valeur de pH plus faible (5 au lieu de 6) est nécessaire pour l'adhésion du bactériophage MS2 par rapport au bactériophage Q $\beta$  impliquant une charge de surface négative plus forte du bactériophage MS2.

## IV.2. Hydrophobie

La capside virale possède des acides aminés avec des domaines hydrophiles ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ) et des domaines hydrophobes ( $-\text{CH}_3$ ), présenté dans le **Tableau 9**. Les structures secondaires et tertiaires des protéines de capside vont être impliquées dans le caractère hydrophobe ou hydrophile de la particule virale. Celles-ci dépendent de la position, externe ou interne, des différents groupements hydrophiles et hydrophobes des protéines constituant la capside. L'hydrophobie de la particule virale est un élément important dans l'adhésion de virus à des surfaces inertes ou organiques (Deboosere *et al.*, 2012; Dika *et al.*, 2013b; Gerba, 1984).

L'hydrophobie d'une particule virale peut être évaluée par différentes méthodes de manière théorique ou expérimentale. Armanious *et al.*, (2016) ont également déterminé un score

d'hydrophobie théorique de différents bactériophages (MS2, fr, GA et Q $\beta$ ) à l'aide du programme Rosetta ([www.rosettacommons.org/software](http://www.rosettacommons.org/software)) en ne prenant en compte que la surface de la capsid virale. Ils obtiennent ainsi un score d'hydrophobie de 45,6 pour le bactériophage MS2, 230,4 pour le bactériophage fr, 176,0 pour le bactériophage GA et 592,8 pour le bactériophage Q $\beta$ . Le bactériophage MS2 est ainsi le moins hydrophobe, et le bactériophage est Q $\beta$  le plus hydrophobe. Une représentation des zones hydrophobes à la surface de ces différents bactériophages est donnée sur la **Figure 22**.



**Figure 22. Représentation des zones hydrophobes de douze trimères de protéines sur la surface externe de la capsid des bactériophages MS2, fr, GA et Q $\beta$ .**

**En violet les zones hydrophobes sur la surface externe de la capsid, en gris les chaînes voisines des douze trimères (Armanious *et al.*, 2016).**

La mesure de l'angle de contact par rapport à un support hydrophobe et l'observation de l'agrégation des particules dans des solutions de force ionique croissante sont des méthodes expérimentales d'estimation de l'hydrophobie. Les méthodes d'évaluation de l'hydrophobie telles que l'adhésion microbienne aux solvants aussi appelée tests MATS (Microbial Adhesion To Solvents), MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) et la chromatographie d'interaction hydrophobe utilisent souvent des surfaces ou substrats qui possèdent une charge électrostatique pouvant interférer dans l'adhésion des particules (Ahimou *et al.*, 2001; Busscher *et al.*, 1995; Farkas *et al.*, 2015; Wolff *et al.*, 2010). Farkas *et al.* (2015) ont utilisé la méthode MATH dans l'étude de l'adhésion d'une suspension de rotavirus et de bactériophage MS2 dans une solution d'hexadécane. Le bactériophage MS2 se retrouve plus dans la phase hydrophobe que le rotavirus dans les conditions expérimentales utilisées. Il serait donc plus hydrophobe que le rotavirus d'après leurs expérimentations. Une méthode de mesure des forces hydrophobes utilisant la microscopie à force atomique (AFM) a été proposée par Attinti *et al.* (2010). Cette méthode mesure les forces

d'interaction entre une pointe de nitrure de silicium recouverte de virus et différents supports hydrophobes. L'avantage de cette méthode réside dans une mesure directe des forces de contact entre le virus et le support hydrophobe et permettrait de mieux caractériser le devenir des virus lors d'interactions avec différents supports. Toutefois, d'après Attinti *et al.* (2010), les méthodes de fixation des virus sur la pointe AFM par le glutaraldéhyde pourraient impacter les mesures des interactions hydrophobes des particules virales.

Langlet *et al.* (2008a) ont étudié l'agrégation des bactériophages ARN F-spécifiques MS2, GA, Q $\beta$  et SP, représentant les quatre différents génogroupes, en fonction du pH et de la force ionique du milieu. L'agrégation des particules a alors été estimée par mesure de taille. Les auteurs ont conclu à une séquence d'hydrophobie de ces quatre bactériophages qui est la suivante : MS2 < Q $\beta$  < SP  $\approx$  GA, le phage MS2 étant le moins hydrophobe. De plus en plus d'études se consacrent à l'adhésion de micro-organismes sur des supports hydrophobes (Armanious *et al.*, 2016; Deboosere *et al.*, 2012; Dika *et al.*, 2013b, 2015; Heistad *et al.*, 2009; Lukasik *et al.*, 2000; van Voorthuizen *et al.*, 2001). Ainsi, Dika *et al.* (2013b) ont comparé l'adhésion des bactériophages MS2, GA et Q $\beta$  sur des surfaces hydrophobes (verre, polypropylène, acier inoxydable et 1-Dodecanethiol) et ont confirmé la séquence d'hydrophobie relative entre ces trois bactériophages observée précédemment par Langlet *et al.* (2008a). Armanious *et al.* (2016) ont également montré que le phage Q $\beta$  avait un caractère plus hydrophobe que le phage MS2. En effet, le phage Q $\beta$  adhère fortement sur une surface hydrophobe (-CH<sub>3</sub>) à une valeur de pH comprise entre 5 et 8 contre seulement 5 et 6 pour le bactériophage MS2. Dika *et al.* (2015) ont comparé l'adhésion des bactériophages de trois familles distinctes : MS2 (*Leviviridae*), Phi X 174 (*Microviridae*) et PRD1 (*Tectiviridae*). Ils ont défini la séquence d'hydrophobie suivante (du moins au plus hydrophobe) : PRD1 < MS2 < Phi X 174.

Pour mieux comprendre les phénomènes d'adhésion ou d'agrégation observés dans ces différentes études, une meilleure compréhension des interactions hydrophobes est indispensable. Cependant, ces interactions sont peu connues et leur caractérisation est complexe (Meyer *et al.*, 2006). Les interactions hydrophobes ont été décrites comme pouvant être de 10 à 100 fois supérieures aux interactions de van der Waals (Hyde *et al.*, 1997; van Oss, 1996). Elles ne peuvent donc pas être négligées. L'impact de ces interactions a été décrit dans l'adhésion de particules virales à des surfaces hydrophobes (Bales *et al.*, 1993; Lytle et Routson, 1995). Ces interactions entre les virus et la surface deviennent majoritaires à haute force ionique (Lukasik *et al.*, 2000; Shields et Farrah, 2002; van Voorthuizen *et al.*, 2001).

### IV.3. Les différents facteurs influençant les propriétés de surface

L'étude des propriétés de surface (charge électrostatique globale, hydrophobie) implique une connaissance de différents facteurs qui peuvent les impacter tels que la purification des particules virales, le pH de la solution, la force ionique, la température ou l'agrégation.

La méthode de purification des particules virales a été décrite comme impactant les propriétés de surface en termes de charge et d'hydrophobie par Dika *et al.* (2013a). Ces auteurs ont comparé, sur le bactériophage MS2 et ses VLPs, trois méthodes distinctes de purification : la dialyse seule, le gradient de densité suivi d'une dialyse et la précipitation au PEG. Ils ont constaté que l'hydrophobie évaluée via le phénomène d'agrégation diffère selon la méthode utilisée. La charge électrostatique, estimée par la mobilité électrophorétique, est également modifiée. Les profils de mobilité sont similaires entre la dialyse et le gradient de densité au contraire de ceux observés avec la précipitation au PEG. D'après leurs résultats, la méthode de purification la plus appropriée pour l'étude des propriétés de surface serait le gradient de densité suivi d'une dialyse afin de sélectionner toutes les particules virales de même densité et d'éliminer les protéines contaminantes.

Comme évoqué dans le paragraphe « Charge électrostatique globale », le pH entraîne la modification des groupements ionisables des particules virales (capside et génome) et/ou de surfaces. Il permet donc de modifier la charge du virus en termes de nature (+ ou -) et de densité. La goethite a été utilisée pour des tests d'adhésion à deux valeurs de pH (7,5 et 9,3) avec les bactériophages MS2 et Phi X 174 (Zhuang et Jin, 2008). A pH 9,3 où la goethite est globalement chargée négativement, aucune adhésion n'est observée avec les deux bactériophages. Au contraire à pH 7,5, les bactériophages adhèrent sur la goethite car celle-ci possède une équivalence de charge positive et négative à cette valeur de pH. Dans l'étude d'Armanious *et al.* (2016), le pH implique des modifications de la charge des bactériophages MS2 et Q $\beta$ . Selon les valeurs de pH, de 5 à 8, sur lesquels les auteurs ont travaillé, les phénomènes d'adhésion sur des surfaces chargées positivement ou négativement et hydrophobes diffèrent. Par exemple, la diminution des valeurs de pH, de 8 vers 5, permet la fixation de ces bactériophages sur des supports hydrophobes puisque la charge négative exprimée par ces bactériophages devient plus faible.



La force ionique est également un des facteurs pouvant modifier les propriétés de surface. La formule suivante la définit :

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

$c_i$  est la concentration molaire de l'ion (mol/L) et  $z_i$  sa valence (IUPAC, [www.iupac.org/goldbook/I03180.pdf](http://www.iupac.org/goldbook/I03180.pdf))

La force ionique dépend ainsi de la concentration saline mais également de la valence des ions en solution. A pH neutre, l'augmentation de la force ionique a été décrite comme diminuant l'adhésion du bactériophage MS2 sur une membrane hydrophile chargée positivement (Shields et Farrah, 2002). Ils remarquent également qu'à haute force ionique (4 M), le bactériophage MS2 se fixe sur une membrane hydrophobe. L'impact de la force ionique sur la capacité d'adhésion à différentes surfaces a également été étudié sur différents bactériophages ARN F-spécifiques (Armanious *et al.*, 2016). L'augmentation de la force ionique, de 10 à 100 mM, permet l'adhésion du phage MS2 sur une surface hydrophobe à pH 8. Cette augmentation (de 10 à 100 mM) permet aussi l'adhésion du phage Q $\beta$  à une surface chargée négativement à pH 8. Un écrantage des charges s'opère donc, diminuant les interactions électrostatiques et permettant la mise en évidence des interactions hydrophobes. Cette diminution de la densité de charge serait responsable de l'agrégation des particules par un rapprochement facilité (Gerba, 1984).

La température est un autre paramètre pouvant influencer les propriétés de surface notamment l'inactivation et l'adhésion des particules virales. En effet, une hausse de la température engendre une augmentation de la probabilité de rencontre entre deux particules en solution (mouvement brownien). Une rencontre plus fréquente entre deux particules favoriserait alors les phénomènes d'agrégation entre elles ou d'adhésion sur une surface. Shi *et al.* (2005) ont montré qu'un passage de 4°C à la température ambiante provoquait l'agrégation de VLP de papillomavirus humain. Une température trop élevée va par contre entraîner la dénaturation des protéines de capsid impliquant une possible déstructuration du virus (Cimpmperman et Matulis, 2011; Niesen *et al.*, 2007).

L'agrégation est le dernier facteur abordé ici puisqu'il va dépendre des autres paramètres (Langlet *et al.*, 2008a). La concentration en particules virales en suspension est importante pour induire une agrégation. Plus la concentration augmente plus la probabilité de rencontre entre deux particules est élevée permettant l'agrégation. Floyd et Sharp (1977) ont, en effet, mis en évidence qu'une diminution trop importante de la concentration en poliovirus n'était pas favorable à

l'agrégation. L'agrégation est un phénomène à prendre en considération notamment dans le cadre de traitements technologiques (eaux et aliments). Des études ont démontré que l'agrégation de particules virales augmentait leur résistance vis-à-vis d'un traitement inactivant par utilisation de l'hypochlorite de sodium ou d'acide peracétique (Kahler *et al.*, 2016; Mattle *et al.*, 2011). La dose infectieuse d'un virus entérique peut aussi dépendre de son état particulaire isolé ou agrégé lors de son ingestion. La probabilité d'infection est différente entre un virus isolé et un agrégat de ce même virus. L'infection est possible à une faible dose d'agrégat mais peu probable avec la même quantité de virus isolés (Teunis *et al.*, 2008).

*En conclusion, l'étude des propriétés de surface (charge électrostatique globale et hydrophobie) des particules virales est complexe. Elle dépend de nombreux paramètres dont le virus et le milieu en particulier. Les conditions expérimentales (pH, température, force ionique...) et la purification des particules virales sont primordiales pour une bonne estimation des propriétés de surface de nos virus modèles.*

***Partie 2 : Matériels et méthodes***

---

## I. Les virus modèles et leurs cultures

### I.1. Bactériophage MS2 et *E. coli* K12 Hfr

#### I.1.a. Souches

La bactérie hôte de référence *E. coli* K12 Hfr (ATCC, réf. 23631) est utilisée pour mettre en évidence le pouvoir infectieux du bactériophage MS2 (ATCC 15597-B1), conformément à la norme européenne (EN ISO 10705-1, 1995). Cette bactérie est sensible à l'ensemble des bactériophages ARN F-spécifiques. Ces bactériophages provoquent l'apparition de plage de lyse sur un tapis bactérien d'*E. coli* K12 Hfr. Cette dernière a la particularité de développer des F-pili ou pili sexuels lors de sa phase exponentielle de croissance à 37°C. Ces F-pili constituent les récepteurs du bactériophage MS2. Les différentes étapes de culture, production virale et adhésion du phage MS2 sur sa cellule hôte ont été réalisées avec *E. coli* K12 Hfr.

#### I.1.b. Milieux de culture

Trois milieux de culture pour la bactérie sont utilisés : (i) le TYGB (Tryptone Yeast-extract Glucose Broth), (ii) le TYGA (Tryptone Yeast-extract Glucose Agar) et (iii) le ssTYGA (semi-solid Tryptone Yeast-extract Glucose Agar). La composition et la préparation de ces différents milieux sont décrites dans le **Tableau A1**. Le milieu TYGB est liquide. Il permet la culture des bactéries utilisées pour la réalisation d'un titrage ou la production d'un stock viral. Les milieux TYGA et ssTYGA ne sont utilisés que pour réaliser la double couche de milieu nécessaire lors du titrage du phage MS2. Chaque milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes puis conservé à 4°C. Avant utilisation, chaque milieu est additionné de 1% (généralement 500 µL) d'une solution de glucose (100 g/L, Sigma-Aldrich, réf. G5767-500G) - calcium (30 g/L, Sigma-Aldrich, réf. C8106-500G). Cette solution est stérilisée par filtration sur une membrane en PES (polyéthersulfone) à faible adhésion protéique de porosité 0,22 µm (Millipore, réf. SLGP033RB).

#### I.1.c. Culture des bactéries

La suspension bactérienne est décongelée etensemencée (500 µL) dans 50 mL de milieu de culture TYGB supplémentée avec 500 µL d'une solution de glucose-calcium. La souche bactérienne *E. coli* K12 Hfr est cultivée jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance, celle-ci est contrôlée par la mesure d'absorbance à 600 nm ( $A_{600nm}$  comprise entre 0,3 et 0,5). A partir de cette étape, la culture bactérienne peut être utilisée pour la réalisation d'un stock de phage MS2 ou le titrage des phages par la technique des plages de lyse.

## I.2. MNV et lignées cellulaire RAW 264.7

### I.2.a. *Souches*

La lignée cellulaire RAW 264.7 (ATCC, réf. TIB-71) est utilisée pour définir le caractère infectieux du MNV. Ces macrophages issus de souris BALB/c sont des cellules en lignée établie ou « immortelle », leur culture serait, théoriquement, possible à l'infini. Ces cellules sont sensibles à l'infection par le MNV qui provoque un ECP. Les différentes étapes de culture, production virale ainsi que d'adhésion du MNV sur sa cellule hôte ont été réalisées avec ces cellules RAW 264.7. La souche de MNV utilisée est le MNV-1 S99 fourni par le Friedrich Loeffler Institute (Greifswald, Allemagne).

### I.2.b. *Milieux de culture*

Les différents milieux de culture utilisés pour les expérimentations réalisées avec les cellules RAW 264.7 sont présentés dans le **Tableau A2**. Trois milieux sont ainsi utilisés : (i) le milieu de croissance pour la culture des cellules RAW 264.7 (croissance et congélation), (ii) le milieu de titrage pour connaître la concentration en MNV infectieux et (iii) le milieu de maintenance pour réaliser les tests d'adhésion du virus MNV sur les cellules RAW 264.7.

### I.2.c. *Culture des cellules*

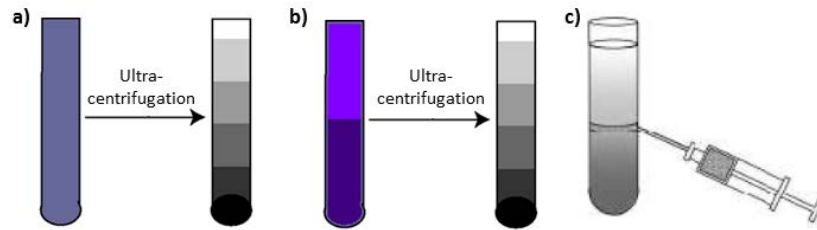
Tout au long des expérimentations, ces cellules sont cultivées en flasques de 75 cm<sup>2</sup> (Thermo Scientific, réf. 156499) contenant 20 mL de milieu de croissance (**Tableau A2**). A partir d'un tapis de cellules à confluence de nouvelles flasques sont préparées. Le tapis cellulaire est dissocié par grattage du tapis, les cellules sont ensuite diluées au 100<sup>ème</sup> et dénombrées à l'aide d'une cellule de Nageotte. La concentration initiale des cellules dans une nouvelle flasque est de 1,5.10<sup>6</sup> à 3.10<sup>6</sup> cellules/mL. Un tapis de cellules à confluence est obtenu après 3 ou 4 jours en incubateur à CO<sub>2</sub> (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, atmosphère humide). Dans le cadre de préparation d'un stock de cellules congelées, les cellules RAW 264.7 sont cultivées en flasques de 175 cm<sup>2</sup> (Thermo Scientific, réf. 159910) contenant 50 mL de milieu de croissance. Après formation d'un tapis cellulaire à confluence, les cellules sont grattées et congelées à -80°C dans du milieu de croissance supplémenté avec 20% de SVF et 10% de DMSO (Fisher Bioreagents, réf. 10103483) à une concentration finale minimale de 5.10<sup>6</sup> cellules/mL.

### I.3. Production et purification virale

#### I.3.a. *Bactériophage MS2*

La réplication du phage MS2 est effectuée sur une souche d'*E. coli* K12 Hfr conformément à la norme européenne (EN ISO 10705-1, 1995). Une pré-culture d'*E. coli* est d'abord réalisée dans du milieu TYGB supplémenté avec 1% de glucose-calcium, pendant  $18 \pm 2$  heures sous agitation à 37°C. Cette pré-culture est ensuiteensemencée à 1% dans du milieu TYGB et placée à 37°C sous agitation pendant 90 minutes. Le phage MS2 est ensuite inoculé à une concentration de  $10^7$  UFP/mL. Après incubation à 37°C sous agitation pendant 4 à 5 heures, la suspension de phages obtenue est centrifugée deux fois (20 minutes à 8000 g) pour éliminer les débris d'*E. coli*. Une filtration est réalisée à l'aide d'unité de filtration (Stericup, Dutscher, réf. 051246) de porosité 0,22  $\mu\text{m}$  puis le phage est conservé à 4°C avant purification.

La première étape de la purification est une ultracentrifugation de  $16 \pm 2$  heures à 42 000 g (WX Ultra 80, Thermo Scientific) qui permet de concentrer les phages MS2. L'étape suivante est un gradient de densité avec chlorure de césium (CsCl, solution à 2,8 g/mL) ou iodixanol (OptiPrep™ solution à 60% d'iodixanol) (Tube Cone-Top PA 14x47mm, Thermo Fisher Scientific, réf. 75000454). Le gradient de densité est réalisé pour le CsCl par un mélange d'un volume de la solution de CsCl à 2,8 mg/L pour un volume de la suspension de phage concentrée. Pour l'iodixanol, deux couches sont réalisées, une couche inférieure à 40% d'iodixanol et une couche supérieure à 20% d'iodixanol contenant le phage. Une ultracentrifugation à 260 000 g pendant  $7 \pm 1$  heures est appliquée, puis la bande correspondant à la densité du phage ( $\approx 1,46 \text{ g/cm}^3$  pour le gradient de CsCl et  $\approx 1,23 \text{ g/cm}^3$  pour le gradient d'iodixanol) est prélevée avec une seringue à travers le tube. Les différentes étapes de la purification du phage MS2 par gradient de densité sont représentées sur la **Figure 23**. La dernière étape de la purification consiste en deux dialyses successives d'une nuit et de 7 heures contre du tampon phosphate 0,1 X (PBS, Fisher Bioreagents, réf. BP2944-100, Float-A-Lyzer G2 dialysis device 100 kDa 1mL, Spectra/Por, réf. G235035).



**Figure 23. Schéma des gradients de densité.**

**a) Gradient de densité de CsCl par mélange de la solution de CsCl à 2,8 g/mL et du phage à purifier, b) Gradient de densité d'iodixanol en double couche avec une couche à 20% d'iodixanol contenant les phages à purifier et une couche 40% d'iodixanol, c) Prélèvement de la bande contenant les phages MS2.**

### I.3.b. *Norovirus murin*

La suspension de travail de MNV est préparée à partir d'un tapis cellulaire de RAW 264.7 à 70% de confluence en flasque de 175 cm<sup>2</sup>. Le milieu est aspiré et les cellules sont infectées avec un ratio de 1 virus pour 10 cellules, 5 mL de milieu de maintenance sont ajoutés et la flasque est placée dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>. La flasque est agitée régulièrement pendant 1 h, puis le volume du milieu de maintenance est amené à 50 mL. Dès que toutes les cellules montrent un ECP, ce qui nécessite au minimum 48 h, la flasque est congelée à -20°C. Trois cycles de congélation/décongélation (-20°C/20°C) sont effectués. Le milieu est prélevé et centrifugé (15 min, 400 g). Le surnageant, qui correspond à la suspension virale, est récupéré et filtré sur filtre-seringue de porosité 0,22 µm, puis stocké à -80°C en aliquots de 1,5 mL.

La veille de chaque expérience, une purification par dialyse, pendant une nuit, est effectuée contre une solution de PBS 0,1 X. La suspension virale est finalement filtrée sur filtre-seringue de porosité 0,22 µm, puis stockée à 4°C avant utilisation. Elle peut être ainsi conservée à cette température pendant 1 semaine sans que le titre infectieux ne diminue.

## II. Détermination du titre infectieux viral

### II.1. Méthode des plages de lyse pour le bactériophage MS2

Le titrage réalisé par la méthode des plages de lyse permet de déterminer la concentration en bactériophages infectieux, il est réalisé selon la norme européenne (EN ISO 10705-1, 1995). Une culture d'*E. coli* K12 Hfr est préparée dans un milieu TYGB qui contient 1% de solution de glucose-calcium. La culture est utilisée lorsqu'elle atteint une densité optique à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,5, ce qui correspond à environ 10<sup>8</sup> unités formant colonies par millilitre (UFC/mL). Pour effectuer le

titrage, des boîtes contenant du milieu TYGA solide sont utilisées. Ensuite, 1 mL de culture bactérienne et 1 mL de culture de phage sont ajoutés dans 2,5 mL de milieu TYGA semi-solide et déposés sur le milieu TYGA. Les boîtes sont incubées  $18 \pm 2$  heures à  $37^{\circ}\text{C}$ . Les plages de lyse sont comptées sous éclairage oblique afin de déterminer le titre infectieux en UFP/mL.

En parallèle du titrage des échantillons, un témoin positif pour le bactériophage MS2 est réalisé afin de confirmer les résultats. Il permet de garantir la bonne réceptivité et sensibilité de la souche hôte vis-à-vis du bactériophage MS2. Conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ , le témoin positif du bactériophage MS2 est calibré à environ 100 UFP/mL. Afin de valider ce témoin positif, il est nécessaire que celui-ci appartienne à l'intervalle constitué par la moyenne de tous les précédents témoins  $\pm 2$  écart-types. De plus, deux témoins négatifs sont réalisés lors de chaque titrage, l'un avec la bactérie seule afin de vérifier que la culture bactérienne n'est pas contaminée et l'autre avec le tampon phosphate utilisé pour les dilutions du phage afin de confirmer également l'absence de contamination.

## II.2. Méthode de Kärber pour le norovirus murin

Le titre infectieux du MNV est déterminé en plaque 96 puits (Thermo Scientific, Réf. 167008). La veille du titrage, les cellules RAW 264.7 sont déposées sur la plaque à raison de  $3.10^4$  cellules dans 100  $\mu\text{L}$  de milieu de titrage (**Tableau A2**) par puits. Une dilution logarithmique de la suspension virale est réalisée dans du milieu de titrage. Pour chaque dilution, 8 ou 16 puits sont inoculés avec 100  $\mu\text{L}$  de suspension virale par puits. La plaque est ensuite placée dans l'incubateur. Les puits présentant un ECP sont comptés après 2 à 4 jours d'incubation par observation au microscope inversé.

Le titre infectieux est estimé avec la formule suivante :

$$T = d \left[ \frac{r}{N} \times \left( n + \frac{N}{2} \right) \right]$$

Avec  $d$  :  $\log_{10}$  (dernière dilution donnant une réponse positive dans tous les puits)

$r$  :  $\log_{10}$  (raison de l'intervalle de dilution). Ici,  $r=1$

$N$  : Nombre de puits/dilution. Ici,  $N=8$  ou  $16$

$n$  : Nombre de puits donnant une réponse positive inférieure à 100%

$T$  :  $\log_{10}$  (TCID<sub>50</sub>/unité de volume testé)

Les résultats du titre infectieux sont finalement exprimés en dose infectieuse 50% en culture tissulaire (TCID<sub>50</sub>/mL).



### III. Extraction et quantification du génome viral

#### III.1. Extraction du génome

L'extraction de l'ARN est réalisée avec le kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen, réf. 52906). Les étapes de l'extraction sont présentées sur la **Figure A1**. Les particules virales sont lysées pendant 10 minutes à température ambiante avec un volume de tampon de lyse proportionnel à celui de l'échantillon puis l'échantillon est généralement congelé à -80°C. Lors de la poursuite de l'extraction, l'échantillon est décongelé et un volume d'éthanol identique à celui du tampon de lyse est ajouté. L'ensemble est déposé sur une colonne de silice en deux ou trois dépôts selon son volume. Les acides nucléiques fixés sur la colonne de silice sont lavés avec 500 µL de tampon AW1 et 500 µL de tampon AW2. La colonne est placée dans un tube DNA LoBind (Eppendorf, réf. 022431021). Les acides nucléiques sont élués avec 100 µL de tampon d'éluion AVE puis conservés à -80°C en tube DNA LoBind.

#### III.2. Quantification de l'ARN viral

Les amorces sens et anti-sens ainsi que la sonde TaqMan MGB, utilisées dans cette étude, proviennent de l'étude d'Ogorzaly et Gantzer (2006) pour le bactériophage MS2 et de l'étude de Belliot *et al.* (2008) pour le MNV (**Tableau 11**). Concernant le bactériophage MS2, l'amorce anti-sens et la sonde s'hybrident sur le gène codant la protéine de la capsidie tandis que l'amorce sens s'hybride sur le gène codant la protéine A. Pour le virus MNV, les deux amorces et la sonde s'hybrident sur le gène codant la protéine NS7.

**Tableau 11. Séquence et position des amorces de RT-qPCR sur le génome du bactériophage MS2 et de MNV (d'après Belliot *et al.*, 2008; Ogorzaly et Gantzer, 2006).**

Virus	Amorces et sonde	Séquence (de 5' vers 3')	Localisation	Longueur de la séquence	Orientation du brin
Phage MS2	Amorce sens	TCGATGGTCCATACCTTAGATGC	1255–1277	23	+
	Amorce anti-sens	ACCCCGTTAGCGAAGTTGCT	1404–1423	20	-
	Sonde	FAM-CTCGTCGACAATGG-MGBNFQ	1362–1375	14	+
MNV	Amorce sens	CCTGACATTGTGATGCAAGAATC	4530-4552	23	+
	Amorce anti-sens	CCATATCCAACCTCGAGGTTGGT	4590-4611	22	-
	Sonde	FAM-CGTCATCACCATAGAAG-MGBNFQ	4562-4578	17	-

\* Position des nucléotides d'après la séquence NC\_001417.2 pour le phage MS2 et NC\_008311.1 pour la souche de MNV CW1 (Accession number Genbank). MGB : Minor Groove Binder, NFQ : Non Fluorescent Quencher

### III.2.a. *Rétro-transcription (RT) de l'ARN en ADNc*

Lors de cette étape, l'ARN extrait des échantillons est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc). Un premier mélange réactionnel est préparé dont les produits et les volumes pour chaque réaction sont indiqués dans le **Tableau A3**. Le dépôt de 5,5  $\mu\text{L}$  de ce mélange est effectué dans une plaque 96 puits et 7,5  $\mu\text{L}$  d'ARN issu des échantillons sont ajoutés. Une première incubation de 5 minutes à 65°C est réalisée dans un thermocycleur (Veriti, Life Technologies).

Un second mélange réactionnel est ensuite préparé, les produits et les volumes par réaction sont indiqués dans le **Tableau A3**. Un dépôt de 7  $\mu\text{L}$  de ce mélange est réalisé dans les puits contenant les produits de la première étape de rétro-transcription. Une incubation d'1 heure à 50°C puis 15 minutes à 70°C est effectuée dans le même thermocycleur. Les échantillons sont maintenus à 4°C ou congelés à -20°C jusqu'à réalisation de la qPCR.

### III.2.b. *PCR quantitative avec une sonde TaqMan MGB*

La qPCR permet de quantifier le génome du bactériophage MS2 ou du MNV dans l'échantillon. Cette technologie permet de suivre l'amplification du génome en temps réel par mesure de fluorescence. La sonde possède à son extrémité 5' un fluorochrome émetteur, ici FAM (6-carboxyfluorescein), et à son extrémité 3' un fluorochrome suppresseur, ici NFQ (Non-fluorescent Quencher). Elle possède en plus un groupement appelé "Minor Groove Binder" (MGB) qui permet à la sonde d'être plus courte par la création d'une liaison sonde-séquence cible plus stable. Tant que la sonde est intacte et même si elle est hybridée à sa séquence cible, elle ne libère pas de fluorescence car le quencher absorbe la fluorescence du fluorochrome situé en 5'. Par contre, si l'amplification a lieu, la polymérase va cliver la sonde grâce à son activité exonucléasique et une fluorescence est émise. Le signal fluorescent est suivi avec le logiciel StepOne™ Software V.2.3 (Life Technologies).

Un mélange réactionnel est réalisé. Les produits et les volumes par réaction sont indiqués dans le **Tableau A3**. Le dépôt de 20  $\mu\text{L}$  de ce mélange est effectué dans une plaque 96 puits puis 5  $\mu\text{L}$  d'ADNc obtenu lors de la RT sont ajoutés. La plaque est placée dans le thermocycleur StepOne Plus™ (Life Technologies) et une incubation de 2 minutes à 50°C et 10 minutes à 95°C, puis 45 cycles composés de 15 secondes à 95°C et 60 secondes à 60°C sont appliqués.

Le signal fluorescent obtenu pour un échantillon positif suit une sigmoïde. Chaque échantillon est caractérisé par une valeur de cycle seuil (Ct ou threshold cycle) qui correspond au cycle de PCR à partir duquel la fluorescence est considérée comme significative. La valeur de Ct correspond au début de la phase exponentielle, sa valeur est inversement proportionnelle à la quantité de génome présente dans les échantillons. Afin de pouvoir quantifier le nombre de copies de génome (cg) présentes dans les échantillons par qPCR, une gamme étalon est analysée

simultanément à ceux-ci. Pour ce faire, des échantillons de génome de bactériophage MS2 ou de MNV à une concentration de  $10^7$  cg/réaction sont préparés, puis des dilutions d'ordre dix sont effectuées jusqu'à  $10^1$  cg/réaction. Les résultats de la quantification de l'ARN viral sont finalement exprimés en copies de génome par millilitre (cg/mL).

#### IV. Traitement à la RNase

Des suspensions virales du bactériophage MS2 ou du virus MNV natifs ou ayant subi un ou deux traitement(s) inactivant(s) (concentration finale de  $10^7$  cg/mL) sont traitées avec de la RNase A (concentration finale de 1 µg/mL, AppliChem, réf. A3832) à 37°C pendant 60 minutes dans un tampon Tris-HCl (10 mM), NaCl (15 mM) à pH 7,5. L'efficacité du traitement à la RNase est estimée par l'utilisation d'ARN extrait du bactériophage MS2 ou du virus MNV utilisé comme témoin positif. Des suspensions virales du bactériophage MS2 ou du virus MNV sans traitement à la RNase sont utilisées comme témoin négatif.

#### V. Etude de l'adhésion virale sur cellule hôte

##### V.1. Etude de l'adhésion du bactériophage MS2 sur la bactérie *E. coli* K12 Hfr

Une culture d'*E. coli* K12 Hfr est préparée selon les indications du paragraphe I.1.c. Dès que la culture atteint la phase exponentielle, soit une  $DO_{600nm}$  de 0,3 (environ  $10^8$  UFC/mL), elle est répartie en fractions de 1,8 mL dans des micro-tubes Protein LoBind. Une bactérie *E. coli* K12 MG1655 (ATCC 700926) ne produisant pas de F-pili est utilisée pour tester la spécificité de l'interaction entre le phage MS2 et les F-pili d'*E. coli*.

Le protocole d'étude de l'adhésion du phage MS2 à la bactérie *E. coli* est décrit sur la **Figure A2**. L'étude de l'adhésion du phage MS2 sur la bactérie *E. coli* est réalisée en ajoutant 200 µL de phages MS2 à une concentration finale de  $10^6$  UFP/mL à 1,8 mL de suspension bactérienne. Le ratio entre les phages et les bactéries est de 0,01, un phage infectieux est donc présent pour 100 bactéries, ce qui augmente la probabilité qu'un seul phage adhère par bactérie (Wigginton *et al.*, 2012). Dès la mise en contact du phage et de la bactérie, 50 µL d'échantillon sont prélevés pour quantifier les phages MS2 initialement mis en contact de la bactérie par RT-qPCR. Le tube est ensuite placé dans un agitateur rotatif (50 rpm) pendant 90 minutes à 4°C, puis centrifugé à 3000 g pendant 15 minutes à 4°C. Un volume de 50 µL du surnageant est prélevé pour quantifier les phages MS2 non adhérents par RT-qPCR. Le reste du surnageant, soit environ 1,8 mL, est utilisé pour le titrage des phages infectieux non adhérents. Le culot bactérien est lavé deux fois avec du milieu TYGB complet. Pour chaque lavage, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 3000 g à 4°C. Le culot lavé est utilisé

pour quantifier les phages MS2 adhérents aux bactéries par RT-qPCR (Q). Ce protocole est appliqué avant et après exposition des phages MS2, à différents traitements pour déterminer leur effet sur la capacité d'adhésion. La variation de cette capacité d'adhésion des phages MS2 est estimée par le calcul suivant :  $\log \frac{Q}{Q_0}$

$Q_0$  est le nombre de copies de génome de phages retrouvé dans les culots bactériens avant traitement.

$Q$  est le nombre de copies de génome de phages retrouvé dans les culots bactériens après traitement.

## V.2. Etude de l'adhésion du virus MNV aux cellules hôtes RAW 264.7

Ce test est effectué en plaque 24 puits (Thermo Scientific, Réf. 10604903). La veille, les puits ont été remplis de 500  $\mu$ L de suspension cellulaire dans un milieu de croissance à une concentration de  $10^6$  cellules/mL. Le lendemain, le milieu de chaque puits est éliminé avant d'ajouter 500  $\mu$ L de suspension virale diluée au  $10^{\text{ème}}$  et au  $100^{\text{ème}}$  avec chaque point en duplicata, puis la plaque est placée dans l'incubateur à  $\text{CO}_2$  pendant 2 heures. Chaque puits est lavé 2 fois avec 1 mL de milieu de maintenance. La lyse est effectuée 2 fois avec 250  $\mu$ L de tampon de lyse par puits et un temps d'incubation de 10 min pour chaque lyse. Enfin, le génome est extrait et quantifié pour obtenir le nombre de copies de génome qui ont adhéré sur les cellules. La spécificité d'adhésion de MNV sur les cellules RAW 264.7 a été vérifiée par comparaison avec son adhésion (i) sur une autre lignée cellulaire CRFK (ATCC, CCL-94) et (ii) sur les flacons utilisés pour les expérimentations de culture cellulaire. Différents temps de contact ont été testés au préalable, le protocole final utilisé pour l'étude de l'adhésion du virus MNV sur les cellules RAW 264.7 est représenté sur la **Figure A3**. Ce protocole permet de déterminer la quantité de MNV adhérent aux cellules RAW 264.7 par la quantification de l'ARN viral avant et après exposition du virus MNV à différents traitements. La variation de la capacité d'adhésion de MNV à ces cellules hôtes est estimée selon le calcul décrit pour le phage MS2.

## VI. Etude de l'adhésion du bactériophage MS2 et de MNV sur des supports hydrophobes ou chargés

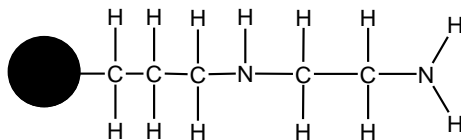
### VI.1. Etude de l'adhésion sur des supports hydrophobes

Des billes hydrophobes magnétiques (Polysciences, réf. 19133) de 1 à 2  $\mu$ m de diamètre avec une surface en polystyrène ont été choisies pour étudier l'hydrophobie du bactériophage MS2 et de MNV par des tests d'adhésion. Les billes sont préalablement lavées deux fois avec 1 mL de tampon PBS (pH

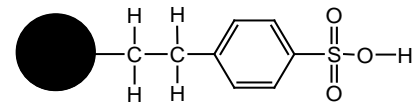
7,0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM et NaCl 150 mM). Elles sont ensuite mises en suspension dans 1,8 mL du même tampon et 200  $\mu\text{L}$  de suspension virale sont ajoutés. Les concentrations finales sont d'environ  $10^7$  à  $10^8$  billes/mL et de  $10^6$  UFP/mL ou  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL pour, respectivement, le bactériophage MS2 et le MNV. Le tube est placé dans un agitateur rotatif (50 rpm) pendant 10 minutes à température ambiante. Les billes sont ensuite récupérées grâce à un aimant pour une quantification du génome viral par RT-qPCR. Un prélèvement du milieu (150  $\mu\text{L}$ ) est effectué pour déterminer les quantités de virus non adhérents par RT-qPCR et titrage. Le reste du surnageant (1,85 mL) est remis en contact avec de nouvelles billes hydrophobes pour un deuxième passage. L'analyse du titre infectieux et du génome viral dans le milieu à l'issue des différents passages sur les billes nous renseigne sur la capacité d'adhésion des phages infectieux et non infectieux. La quantification du génome viral sur les billes confirme l'adhésion des phages à ces billes et permet de réaliser un bilan matière de l'expérience.

## VI.2. Etude de l'adhésion sur des supports chargés

Des billes échangeuses d'anions possédant une amine secondaire, dont le  $pK_a$  est proche de 10 (Bioclone, réf. FM-105), représentées **Figure 24** et des billes échangeuses de cations possédant un acide sulfonique, de  $pK_a$  2,3 (Bioclone, réf. FV-101), représentées **Figure 25** sont utilisées pour évaluer la charge électrostatique globale du MNV et du bactériophage MS2. Ces billes d'un diamètre de 1  $\mu\text{m}$  sont magnétiques. Des tests d'adhésion sont réalisés pour différents pHs : 7,0, 4,0, 3,0 et 2,5.



**Figure 24. Bille échangeuse d'anions.**



**Figure 25. Bille échangeuse de cations.**

Les billes sont lavées deux fois avec 500  $\mu\text{L}$  de tampon (PBS 50 mM et NaCl 20 mM) au pH adéquat. Elles sont ensuite mises en suspension dans 1,8 mL du même tampon et 200  $\mu\text{L}$  de suspension virale à  $10^6$  UFP/mL ou  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL sont ajoutés. La concentration finale en billes est d'environ  $10^8$  billes/mL. Le tube est placé dans un agitateur rotatif (50 rpm) pendant 10 minutes à température ambiante. Les billes sont ensuite séparées du tampon grâce à un aimant. Les billes et le surnageant sont analysés comme décrit dans le paragraphe précédent pour les billes hydrophobes.

## VII. Observations des bactériophages MS2 au Microscope Electronique à Transmission

Les observations au microscope électronique à transmission sont réalisées à l'Institut Jean Lamour (UMR 7198, CNRS et Université de Lorraine). Les particules virales sont mises en contact avec une solution d'acide phosphotungstique à 2%, à pH 7,4, sur une grille de carbone pendant 1 minute. Le surplus de liquide est absorbé par un papier filtre et la grille est séchée à l'air libre pendant 5 minutes avant observation. Cette observation s'effectue sur un appareil Philips CM200 à 200 kV à différents grossissements (x 38 000, x 50 000 et x 66 000). Un exemple de bactériophage MS2 natif (plein) ou considéré comme vide après traitement est présenté **Figure 26**.



**Figure 26.** Représentation d'un bactériophage MS2 natif, plein (A) ou considéré comme vide (B) à un grossissement de x 66 000. Barre d'échelle : 20 nm.

## VIII. Mesures de taille et de mobilité électrophorétique au Zetasizer Nano ZS

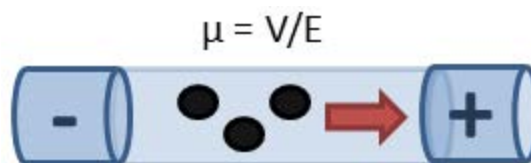
Les mesures de taille et de mobilité électrophorétique sont réalisées avec le Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) au LIEC (UMR 7360, CNRS et Université de Lorraine) représenté sur la **Figure 27**. Pour effectuer les mesures de taille, cet appareil observe le mouvement brownien des particules. Ainsi, en analysant la diffraction de la lumière du laser par les particules et en déterminant le coefficient de diffusion, la taille des particules est obtenue grâce à la relation de Stokes-Einstein. Cette méthode est appelée diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering ou DLS) ou spectroscopie par corrélation de photons. Comme la diffusion dynamique de la lumière est sensible à l'intensité de la lumière diffusée par les particules et que les particules les plus grandes dispersent plus de lumière que les petites, alors la DLS est très sensible à la présence d'agrégats. La résolution de l'appareil se situe entre 0,3 nm et 10  $\mu\text{m}$  pour la mesure de taille, elle est comprise entre 3,8 nm et 100  $\mu\text{m}$  pour celle de la mobilité électrophorétique. Les concentrations minimales en bactériophages MS2 nécessaires à ces expérimentations sont de  $10^{11}$  et  $10^{12}$  UFP/mL. Ces expérimentations n'ont pas pu être réalisées avec le MNV puisque les concentrations maximales obtenues sont de  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL. Des solutions à différents pH (de pH 2 à pH 7,4) ou forces ioniques (PBS 0,01X, PBS 0,1X et PBS 1X), sont préparées la veille ou le jour même puis filtrées sur filtre-

seringue de porosité 0,22  $\mu\text{m}$  avant leur utilisation. Les mesures de taille et de mobilité électrophorétique sont effectuées dans des cuves DTS1061 ou DTS1070 (Malvern Instruments). Ces cuves en polycarbonate, représentées **Figure 27**, se présentent sous la forme d'un capillaire en forme de U, d'un volume minimal d'environ 750  $\mu\text{L}$  et renfermant deux électrodes béryllium-cuivre plaquées or.



**Figure 27.** Représentation du Zetasizer Nano ZS et d'une cuve de mesure DTS1070.

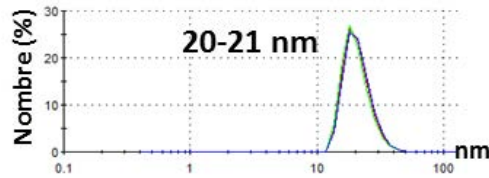
Les mesures de taille peuvent être réalisées en fonction du pH et de la force ionique du milieu pour évaluer l'agrégation des particules virales en fonction des conditions physico-chimiques. Lors des mesures de mobilité électrophorétique ( $\mu$  en  $10^{-8}$   $\text{m}^2/\text{V}/\text{s}$ ), l'appareil mesure la vitesse de migration ( $V$  en  $\mu\text{m}/\text{s}$ ) des particules virales soumises à un courant électrique ( $E$  en  $\text{V}/\text{cm}$ ), avec la formule suivante :  $\mu = V/E$ , présenté **Figure 28**. Les mesures de mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique apportent des informations sur le ratio entre la densité de charge interne et la densité de charge externe du virus par la pente de la courbe, ainsi que sur la perméabilité de la particule virale (Langlet *et al.*, 2008b). Les mesures de mobilité électrophorétique en fonction du pH apportent des informations sur la charge globale et le  $pI$  du virus.



**Figure 28.** Représentation schématique de la mobilité électrophorétique du bactériophage MS2.

Après ajout de l'échantillon à analyser, la cuve est placée dans l'appareil. Pour chaque condition de pH ou de force ionique, les mesures de taille ou de mobilité électrophorétique sont réalisées en trois expériences indépendantes, avec trois mesures successives effectuées pour chaque expérience pour s'assurer de la reproductibilité et de la répétabilité des mesures. L'utilisation du logiciel Zetasizer Software (auparavant DTS Nano) permet l'analyse et l'interprétation des résultats en termes de taille des particules et de mobilité électrophorétique. Un exemple de résultat de

mesure de taille obtenu avec cet appareil est présenté sur la **Figure 29**. Il est néanmoins impossible de dénombrer la quantité de particules d'une taille donnée. Des profils similaires sont observés pour la mobilité électrophorétique.



**Figure 29.** Exemple d'un profil obtenu pour la mesure de la distribution de taille des bactériophages MS2 natifs (en nm) en fonction du nombre de particules virales mesurées.

## IX. Etude de l'hydrophobie en fonction des changements conformationnels via la sonde SYPRO

La sonde SYPRO Orange 5 000X (S-6650, Life Technologies) est une sonde fluorescente spécifique des domaines hydrophobes des protéines. La concentration minimale en bactériophages MS2 nécessaire à ces expérimentations est de  $10^{12}$  UFP/mL. De même que pour les mesures de taille, ces expérimentations ne pourront pas être réalisées avec le MNV. Une température croissante est appliquée afin de modifier la conformation de la protéine. Ces modifications sont mises en évidence grâce à l'émission de fluorescence due à la fixation de la sonde SYPRO. Cette méthode permet de déterminer, d'une part la température de fusion ( $T_m$ ) pour laquelle 50% de la totalité des zones hydrophobes sont accessibles et d'autre part la température permettant d'atteindre le maximum de fluorescence qui correspond à une accessibilité maximale des zones hydrophobes. Le volume réactionnel est de 25  $\mu$ L. Il contient 5  $\mu$ L de tampon (Tris-HCl 150 mM pH 8), 2  $\mu$ L de suspension virale, 16  $\mu$ L d'eau distillée et 2  $\mu$ L de sonde SYPRO 62,5X (concentration finale 5X). Des mesures continues de fluorescence sont réalisées avec une augmentation de la température de 1°C par minute entre 20 et 95°C.

## X. Traitements appliqués pour l'inactivation virale

L'inactivation obtenue par ces différentes conditions correspond à la diminution de la concentration en virus infectieux, elle est estimée par le calcul suivant :  $\log \frac{C}{C_0}$

$C_0$  est la concentration en phages MS2 ou MNV infectieux avant traitement (UFP/mL ou TCID<sub>50</sub>/mL).

$C$  est la concentration en phages MS2 ou MNV infectieux après traitement thermique, par chloration ou par ozonation (UFP/mL ou TCID<sub>50</sub>/mL).



### X.1. Chaleur

Le premier traitement est la chaleur. Le bactériophage MS2 est exposé à des températures de 55°C, 60°C ou 72°C pendant 10 à 60 minutes au bain-marie. Le MNV est lui exposé à des températures de 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 72°C ou 80°C pendant 10 minutes au bain-marie. Dans les deux cas, un préchauffage des micro-tubes (Protein LoBind, Eppendorf, réf. 0030108132) est réalisé. A la fin du temps d'exposition, les micro-tubes sont refroidis rapidement dans la glace puis stockés à 4°C en attente de l'analyse.

### X.2. Hypochlorite de sodium

Le second traitement utilisé est l'hypochlorite de sodium (5%, Acros, réf. 419550250). L'ensemble des solutions nécessaires pour le dosage de l'hypochlorite de sodium est représenté dans le **Tableau A4**. Le dosage de l'hypochlorite de sodium libre/total en solution est réalisé suivant la norme européenne (EN ISO 7393-2, 1985) par colorimétrie de la DPD (diéthyl-p-phénylènediamine, Acros, réf. 407390250) à 515 nm, à l'aide d'une gamme étalon d'iodate ioduré présentée dans le **Tableau A5**. Des concentrations de 100 ou 200 mg/L d'hypochlorite de sodium pendant 10 minutes pour le bactériophage MS2 et de 20 ou 50 mg/L pendant 15 minutes pour le MNV, à une température de 4°C sont utilisées. Après traitement, l'hypochlorite de sodium restant est neutralisé par l'ajout d'un équivalent de 2 moles de thiosulfate de sodium pour une mole d'hypochlorite de sodium. Les stocks viraux ainsi traités sont stockés à 4°C avant les différentes analyses.

### X.3. Ozone

Le dernier traitement étudié est l'ozone. Le pilote d'ozonation provient de la société Alphatech (France), il est équipé d'un générateur d'ozone de type LAB2B 5 (Triogen Ltd, France). Il permet la production d'ozone à partir de l'oxygène de l'air selon le principe électrique de décharge-corona, représenté **Figure A4**. L'ozone utilisé sous forme gazeux, dosé à 5 ppm, est injecté par bullage directement dans la suspension virale réalisée dans du tampon PBS (0,1X, pH 7,4). Le dosage de l'ozone résiduel dans le PBS s'effectue de la même façon que pour l'hypochlorite de sodium, par colorimétrie de la DPD. La dose de 1 à 5 ppm d'ozone est appliquée de 1 à 5 minutes à température ambiante. L'ozone résiduel restant en milieu aqueux est ensuite neutralisé par l'ajout de l'équivalent de 2 moles de thiosulfate de sodium pour une mole d'ozone libre. Les stocks viraux ainsi traités sont stockés à 4°C avant les différentes analyses.

***Partie 3 : Résultats***

## I. Inactivation et évolution des propriétés de surface du bactériophage MS2 au cours des traitements thermiques

### Contexte :

La chaleur est reconnue comme un paramètre majeur de l'inactivation virale. Ses effets semblent essentiellement localisés au niveau de la capsid des virus. En fonction de la température, une déstructuration complète de la particule virale ou de simples changements de conformation sont décrits. Le génome viral, quant à lui, est peu ou pas impacté après un traitement thermique. L'interprétation de la présence de génome viral détecté par RT-PCR comme danger viral après un traitement thermique est par conséquent impossible. Le génome persiste même en l'absence de tout caractère infectieux.

### Objectifs :

L'objectif de la première publication est d'une part de suivre l'impact de la chaleur sur l'intégrité de la particule du bactériophage MS2 et d'autre part de mettre en évidence les éventuels changements de conformation des protéines qui composent cette particule. Les changements de conformation pourraient modifier la charge de surface, l'hydrophobie et/ou la perméabilité de la particule virale.

### Méthodes :

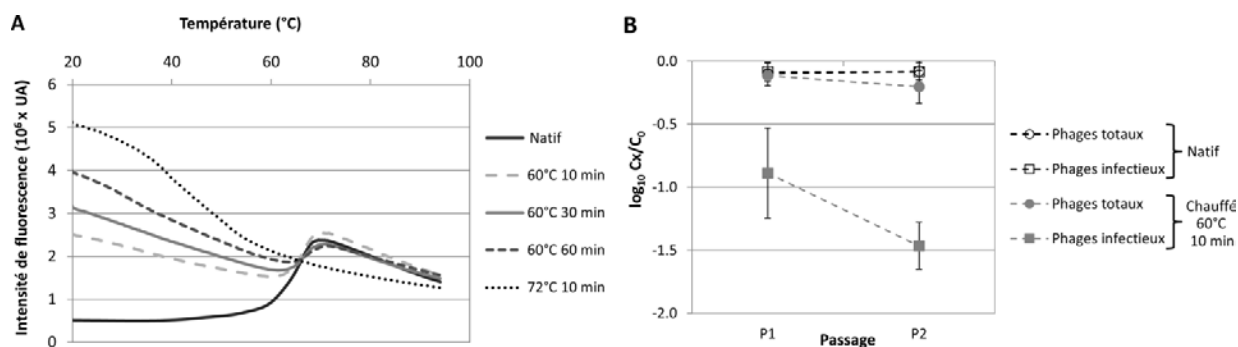
La quantification du nombre de particules est réalisée par culture pour les infectieuses et par RT-qPCR pour les totales (infectieuses et non-infectieuses). L'intégrité physique des particules virales est évaluée par l'aspect (MET), la mesure de la taille (DLS) et l'accessibilité du génome à la RNase. Les modifications conformationnelles sont étudiées au travers de la reconnaissance au récepteur cellulaire (adhésion sur cellule hôte), la charge (mobilité électrophorétique, adhésion sur supports chargés) et l'hydrophobie (adhésion sur supports hydrophobes et fixation de la sonde SYPRO spécifique des domaines hydrophobes).

### Résultats :

Deux méthodes de purification par gradient de densité (CsCl et Iodixanol) ont été comparées en termes de ratio Génome/Infectieux et d'impact sur les propriétés de surface du bactériophage MS2. Ceux-ci apparaissent similaires avec ces deux méthodes. L'iodixanol étant une molécule non toxique et non chargée, il a été choisi pour la purification des suspensions de travail pour l'ensemble des expérimentations concernant le bactériophage MS2 (Résultats non présentés).

Deux températures (60°C et 72°C) avec un temps d'exposition identique (10 minutes) ont été utilisées. Après exposition à 60°C, l'aspect et la taille des phages MS2 sont identiques aux phages avant traitement (natifs). Par contre, une température de 72°C aboutit à une modification de l'aspect en microscopie du phage avec très peu de particules intactes. La capacité d'adhésion spécifique à *E. coli* diminue avec le temps d'exposition à 60°C et cette diminution est similaire à l'inactivation. En revanche, bien qu'une forte inactivation ( $-8 \log_{10}$ ) à 72°C soit observée, celle-ci n'a pas été comparée à la capacité d'adhésion spécifique à *E. coli* au vu du peu de particules intactes. Par ailleurs, aucune dégradation du génome avec ou sans l'utilisation de la RNase n'a été observée suite aux traitements thermiques à 60°C. Au contraire, à 72°C, une forte dégradation du génome par la RNase est observée confirmant les observations de MET. Les expérimentations ont alors été poursuivies principalement à 60°C.

Les éventuelles modifications des propriétés de surface ont été évaluées par les différentes méthodes choisies. Globalement, la charge électrostatique est identique entre les phages natifs et chauffés. A  $\text{pH} \geq 4$ , les virus exposés à la chaleur et ayant conservé leur caractère infectieux, posséderaient une charge globale négative moins importante que les virus natifs infectieux. Les expérimentations réalisées avec la sonde SYPRO nous ont permis d'étudier le  $T_m$ , qui est la température de dénaturation des protéines de capsid. Celle-ci est de 66-67°C pour les phages natifs et reste identique après exposition à 60°C aux trois temps d'exposition (10, 30 et 60 minutes) (**Figure 30A**). On peut également noter l'absence de  $T_m$  pour les phages chauffés à 72°C confirmant les observations en MET. Les résultats obtenus avec cette sonde suggèrent également une augmentation de l'hydrophobie du phage MS2 exposé à la chaleur liée au temps d'exposition. L'hydrophobie augmente avec la température et avec le temps d'exposition à une température donnée (60°C). Les tests d'adhésion sur les billes hydrophobes montrent également une fixation significative mais uniquement pour les phages MS2 restés infectieux (**Figure 30B**).



**Figure 30. Evaluation de l'hydrophobie des bactériophages natifs ou chauffés (A) par la réalisation de profils SYPRO ou (B) par adhésion sur des billes hydrophobes.**

### Conclusion :

L'exposition à une température de 60°C entraîne une légère diminution de la charge globale négative et une augmentation de l'hydrophobie des particules restées infectieuses. La présence de particules non-infectieuses contenant du génome inaccessible à la RNase a été prouvée. Ce sont certainement ces dernières qui participent à la surestimation des particules virales infectieuses par biologie moléculaire. A 72°C, la plupart des particules virales sont détruites et le génome devient accessible aux RNases. Une température critique où la déstructuration de la capsid e s'opère a été définie pour le bactériophage MS2, elle serait supérieure à 66°C. Ces notions de température critique, de modification de la perméabilité et de l'hydrophobie des particules virales doivent être approfondies avec des virus entériques modèles ou pathogènes. Des prétraitements, préalables aux outils de biologie moléculaire, capables de discriminer les virus infectieux des non-infectieux pourront alors être appliqués.

Article accepté dans Food and Environmental Virology le 14/06/2016

### The effect of heat on the physicochemical properties of bacteriophage MS2

Adrien Brié<sup>1,2,3</sup>, Isabelle Bertrand<sup>1,2</sup>, Marie Meo<sup>1,2</sup>, Nicolas Boudaud<sup>3</sup>, Christophe Gantzer<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lorraine, LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

<sup>2</sup>CNRS, LCPME, UMR 7564, Institut Jean Barriol, Nancy, France

<sup>3</sup>ACTALIA, Food Safety Department, Saint Lô, France.

\*Corresponding author: Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Albert Lebrun, Nancy F-54000, France.

E-mail: christophe.gantzer@univ-lorraine.fr

Phone: 33 (0)3 83 68 22 91

#### Abstract

The differences in physicochemical characteristics between infectious and non-infectious viral particles are poorly known. Even for heat, which is known as one of the most efficient treatments to inactivate enteric viruses, the global inactivation mechanisms have not been described yet. Such knowledge would help distinguish between both types of particles and therefore clarify the interpretation of the presence of viral genomes in food after heat treatment. In this study, we examined in particular the differences in electrostatic charge and hydrophobicity between the two particle types. MS2 phage, a common surrogate for enteric viruses, was used as a model virus. The heat-induced inactivation process of the infectious phages caused hydrophobic domains to be transiently exposed and their charge to become less negative. The particles also became progressively permeable to small molecules such as SYPRO Orange dye. The presence of non-infectious phage particles in which the genome was not accessible to RNases has been clearly demonstrated. These observations were done for MS2 phages exposed to a temperature of 60°C. When exposed to a temperature higher than their critical temperature (72°C), the particles were disrupted and the genome became available for RNases. At lower temperatures, 60°C in this study, the transient expression of hydrophobic domains of remaining infectious phages appeared as an interesting parameter for improving their specific detection.

Keywords: MS2 bacteriophage, heat, surface properties, hydrophobicity, charge

---

## Introduction

In the last century, environmental virologists were interested in the behaviour and survival of infectious viruses only. The latter are defined as viruses able to complete their entire infectious life cycle inside their host cells. The reference method for their detection is therefore cell culture. The gradual discovery of non-culturable pathogenic viruses (e.g. norovirus, hepatitis E virus) and the use of molecular approaches (e.g. RT-PCR) for the detection of viral genomes in the environment and food commodities have completely changed the frame of reference. Detection of viral genomes includes infectious viruses, but also non-infectious viruses and even naked viral genomes. The latter two were at first neglected because since RNA was considered as not stable, the detected genomes were assumed to be linked to infectious viruses protected by a capsid. Today, such an assumption is no longer acceptable because it has been largely demonstrated that the persistence of the genome is much greater than that of the corresponding infectious virus in most cases (Gassilloud et al. 2003; Ogorzaly et al. 2010; Prevost et al. 2016; Seitz et al. 2011; Simonet and Gantzer 2006). Gaining knowledge about the characteristics of non-infectious viral particles, or more broadly about the molecular mechanisms of viral inactivation, has become a major objective for food and environmental virologists.

Little is known about the mechanisms of inactivation of enteric viruses. Temperature is recognized as one of the main viral inactivation factors (Bertrand et al. 2012). In the case of poliovirus, temperature has been shown to cause structural and conformational changes of its capsid, whose rate depends on the temperature applied. Poliovirus in its native state has a sedimentation coefficient of 160S (Belnap et al. 2000). Two different types of particles, distinguished by their sedimentation coefficients, have been identified after heat treatment: the 135S form followed by the 80S form (Belnap et al. 2000). The 135S particles - also known as "A particles" - have lost  $\approx 73\%$  of their viral protein 4 (VP4) and externalized the N-terminus of viral protein 1 (VP1), but still contain viral RNA, which is not sensitive to RNase treatment (Curry et al. 1996). Interestingly, VP1 N-terminus externalization is directly linked to an increase in the hydrophobicity of the A particles (Fricks and Hogle 1990). Curry et al. (1996) suggested that despite an increase in hydrophobicity, infectivity is maintained for CHO cells or Murine L cells which are non-permissive to native poliovirus. The 80S particles described as empty capsids from transmission electron microscopy (TEM) experiments are not infectious and have lost mostly their viral RNA and VP4 (Breindl 1971; Levy et al. 2010). The 135S and 80S forms exhibited a 4% larger size compared to the native poliovirus (Belnap et al. 2000). More recently, Wigginton et al. (2012) showed that temperature has an effect on the capsid because MS2 phage, one of the main surrogates of enteric viruses, lost its ability to recognize its receptor after heat treatment. The 72°C heat treatment that was applied led to modifications of the capsid. On the other hand, it has been amply demonstrated that genome detection by RT-PCR is not markedly affected by heat (Baert et al. 2008; Wigginton et al. 2012). When considering all the data available, we can hypothesize that heat-inactivated viruses exhibit structural differences in their capsids which may contribute to the loss of infectivity. If so, the physicochemical properties of the viral capsid should be affected.

Thus, the purpose of our work was to evaluate the physicochemical changes that heat treatment induces in MS2 phage. MS2 phage was used as a model because of its similar size ( $\approx 22 - 29$  nm), the presence of a positive-sense RNA genome, and an overall structure of the capsid close to enteric pathogenic viruses (Bae and Schwab 2008; Boudaud et al. 2012; Bozkurt et al. 2015; Deboosere et al. 2012; Shirasaki et al. 2009; Sidhu and Toze 2009; Valegård et al. 1990). This phage is non-pathogenic

for humans and easy to culture in laboratory. Moreover, a high phage concentration is easily achieved which was essential for some of the methods used in the present study. The first step was to confirm the presence of non-infectious particles still possessing a genome protected inside the capsid. In a second step, surface property modifications were compared before and after heat treatment by different methods. The selected strategy was to evaluate the changes in charge (electrophoretic mobility and adhesion to charged beads) and hydrophobicity (hydrophobic fluorescent dye labelling and adhesion to hydrophobic beads) that heat induced in infectious phages and in total phage particles (i.e. the whole viral genome detected by RT-PCR corresponding to infectious particles as well as non-infectious ones).

## **Materials and Methods**

### **Production and purification of phages**

Replication of MS2 bacteriophage (ATCC, 15597-B1) was done according to the procedure ISO 10705-1 (ISO 1995) without the CHCl<sub>3</sub> lysis step, using *Escherichia coli* Hfr K12 (ATCC, 23631) as host cells. The produced phages were twice centrifuged (8,000 g, 20 min, 4°C, Beckman Avanti J-E) and the supernatant was filtered using a 0.22 µm filter unit (Stericup GP, Millipore, SCGPU05RE). The viral suspension was stored at 4°C before proceeding to the purification steps. MS2 phages were pelleted upon ultracentrifugation of large volumes (≈ 1 L) of the phage suspension (42,500 g, 18 h, 4°C, Thermo Scientific Sorvall WX Ultra 80, A-621 fixed rotor). The pellets were resuspended in iodixanol solution (20% final, Axis-Shield, Optiprep) and laid on a 40% iodixanol layer in a tube (Cone-Top PA tube 14 x 47 mm, Thermo Fisher Scientific, 75000454). The density gradient was formed upon centrifugation at 160,000 g and 15°C for 7 h (Thermo Scientific Sorvall WX Ultra 80, TH-641 swing rotor). The band corresponding to the position of the phages was then gently removed from the tube with a syringe. This solution was finally dialysed (Float-A-Lyzer G2 dialysis device, 100 kDa, 1 mL, Spectra/Por, G235035) twice (one overnight, the other for 7 h) in phosphate-buffered saline (PBS Fisher Bioreagents, BP2944-100) with a concentration of 1 mM (1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 14 mM NaCl). The working suspensions of MS2 phages were kept at 4°C before use.

### **Infectivity assay**

Infectious MS2 phages were enumerated by plaque assay method using the double-agar-layer technique according to the ISO 10705-1 (ISO 1995). Ten-fold serial dilutions of the MS2 stock solutions were made to the appropriate dilution in PBS (for phage enumeration). Infective MS2 phage concentrations were measured as the number of plaque-forming unit per mL (PFU/mL). The final concentration of purified phages was ≈ 10<sup>14</sup> PFU/mL.

### **Viral genome extraction and quantification**

Viral RNA was extracted from 50 µL samples using the QIAamp viral RNA kit (Qiagen, 52906) and eluted in 100 µL of elution buffer. The extracts were immediately stored at -80°C before quantification. Reverse transcription was performed according to the manufacturer's recommendations from 7.5 µL of RNA using 20 pmol of reverse primer (5'-ACCCCGTTAGCGAAGTTGCT), 100 U of SuperScript III (Life Technologies, 18080085) and 20 U of RNaseOUT (Life Technologies, 10777019) in a 20 µL reaction volume. RT step was performed at 50°C for 60 min and 70°C for 15 min. Quantitative PCR (Life Technologies, StepOne Plus) was then carried out from 5 µL of cDNA with TaqMan universal PCR master mix (Life Technologies, 4318157) according to the manufacturer's recommendations in a 25 µL reaction volume, with reverse and forward (5'-TCGATGGTCCATACCTTAGATGC) primers at a concentration of 1 µM and the TaqMan MGB probe (5'-FAM-CTCGTCGACAATGG-MGBNFQ) at a concentration of 0.3 µM. PCR amplification was performed at 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The primers and probe used in the RT-qPCR (Life Technologies, StepOne Plus) were as described by Ogorzaly et al. (2006). Two negative controls were included in each



experiment. One positive control of known quantity of phages was also included to ensure good reproducibility of extractions and RT-qPCR steps. The efficiency of the RT-qPCR stayed between 80 and 95 %.

Determination of MS2 genome copies per mL (gc/mL) used for the standard curve was performed using an MS2 extract quantified by a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, NanoDrop 2000). Integrity of the MS2 RNA was checked by electrophoresis (Agilent , 2100 Bioanalyzer). The calculation for the genome copy per volume was performed with a genome of 3,569 nucleotides. The final concentration of purified phages was around  $10^{15}$  gc/mL.

### Heat treatment

Purified phages at a concentration of  $10^{14}$  PFU/mL (250  $\mu$ L in 1 mM PBS solution with 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 14 mM NaCl) were exposed to different temperature and time conditions – 72°C for 10 min, 60°C for 10, 30 or 60 min – in prewarmed Protein LoBind tubes (Eppendorf, 0030108132) in a water bath. Samples were immediately placed on ice after heat treatment to prevent further inactivation.

### RNase assay

Suspensions of MS2 phage, with a final concentration of  $10^7$  gc/mL, were treated with RNase A (1  $\mu$ g/mL final, AppliChem, A3832) at 37°C for 60 min. Efficiency of the RNase treatment was estimated using RNA extracted from MS2 phage as positive control. MS2 phage suspensions without RNase treatment were used as negative controls for RT-qPCR and plaque assay. Control of the efficiency removal of the RNase was performed by a one tenfold dilution of samples which gave us between 80% to 120% of the undiluted RNA concentration from RNase assays.

### Transmission electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM) experiments, the samples were adsorbed on grids and negatively stained with 2% of phosphotungstic acid at pH 7.4 for 1 min which had been previously filtered with a 0.22  $\mu$ m membrane filter. These stained samples were examined using a Philips CM20 electronic microscope operating at 200 kV and with  $\times 50,000$  magnification.

### Binding of MS2 phages to E. coli

Binding assays of MS2 phage to its host cell were carried out as described by Wigginton et al. (2012). In short, E. coli Hfr K12 was grown to an optical density of 0.3 according to the procedure ISO 10705-1 (ISO 1995) and then placed on ice. MS2 phages were next added to the bacterial suspension to a final concentration of  $10^6$  PFU/mL corresponding to a multiplicity of infection (MOI) of  $\approx 0.01$  in a 2 mL final volume in each Protein LoBind tube. The samples were incubated at 4°C for 90 min using Dynal MX1 Mixer (Life Technologies) and then centrifuged at 3,000 g and 4°C for 15 min. The pelleted bacteria were washed twice in their culture medium. Viral RNAs were then extracted from the pellet and supernatant (50  $\mu$ L) using the QIAamp Viral RNA kit, and the RT-qPCR assay was used to quantify the number of phages bound to the bacteria and in the supernatant. The binding capacity of MS2 phage was estimated by  $\log \frac{Q}{Q_0}$  where Q is the viral RNA found on the bacteria after heat treatment (60°C for 10, 30 and 60 min) and  $Q_0$  before heat treatment.

### Size and electrophoretic mobility measurements

Size and electrophoretic mobility measurements were performed in disposable capillary cells (Malvern Instruments, DTS1061) at  $23^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$  using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, He-Ne red laser, wavelength 633 nm).

Experiments were driven by Dispersion Technology Software (Malvern Instruments, DTS) as described by Dika et al. (2011). Briefly, electrophoretic mobility measurements were obtained using laser Doppler electrophoresis also known as phase analysis light scattering. The rate of change of the phase shift between the scattered light and a reference beam is correlated with the particle velocity and thus allows for measurement of the electrophoretic mobility. The size distribution of the viral suspensions under investigation was determined using Dynamic Light Scattering (DLS). As a first approximation, the diffusion coefficient was converted into particle size using Stokes–Einstein equation.

The viral concentration used in these experiments ranged from  $10^{11}$  to  $10^{12}$  PFU/mL to get enough signal from the Zetasizer instrument. Size and electrophoretic mobility were measured either as a function of pH (from 2 to 7.4 in 1 mM PBS solution with 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 14 mM NaCl) or as a function of ionic strength 1.95, 19.5 and 195 mM (in 0.1, 1 and 10 mM PBS solutions, which contained 0.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 1.4 mM NaCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 14 mM NaCl, and 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 140 mM NaCl, respectively). All solutions were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter prior to use. For one pH or ionic strength, size and electrophoretic mobility measurements were obtained by means of three independent experiments with triplicate measures in each to ensure repeatability of the measurements.

### **Binding of MS2 phages to hydrophobic or ion exchange beads**

Two types of beads were used to evaluate binding of the viral particles. Hydrophobic magnetic beads are coated with polystyrene (PolySciences, 19133). Ion exchange beads are either BcMag PSA (Bioclone, FM-105) for anion exchange or BcMag SCX (Bioclone, FV-101) for cation exchange.

Prior to the experiments, the beads were washed twice in the buffer to be used in the assay, which was either 10 mM PBS (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 150 mM NaCl) at pH 7 for hydrophobic beads or 50 mM PBS (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 20 mM NaCl) at different pH (2.5, 3.0, 4.0, 7.0) for ion exchange beads, as indicated by the manufacturers. The binding assays were performed with a viral concentration of  $10^6$  PFU/mL and 108 beads/mL, in a 2 mL final volume in each Protein LoBind tube. The binding assay using hydrophobic beads was carried out twice for 2 h at room temperature using Dynal MX1 Mixer (Life Technologies). New washed beads were used for the second run. With ion exchange beads, only one run was done for 10 min at room temperature using Dynal MX1 Mixer too. Then, the beads were separated from the supernatant with a magnet for 2 to 3 min. Supernatants were analysed by both plaque assay (infectious phages) and RT-qPCR (total phages) methods and beads were analysed only by RT-qPCR. The binding capacity of MS2 phage on beads was estimated by  $\log \frac{C_x}{C_0}$  where  $C_x$  is the concentration of either infectious phages or viral RNA after binding assay in suspension and  $C_0$  the initial concentration of either infectious phages or viral RNA in suspension.

### **Differential scanning fluorimetry**

Differential scanning fluorimetry (DSF) was performed as previously described with some modifications (Subba-Reddy et al. 2012; Walter et al. 2012). Briefly, thermal melting curves of heated and unheated MS2 phages were obtained in 96-well plates using StepOne Plus qPCR System (Life Technologies) and the fluorescent dye SYPRO Orange, 5,000 $\times$  concentrate, supplied in DMSO (Life Technologies, S-6650). The final reaction volume was 25  $\mu\text{L}$  with 5  $\mu\text{L}$  of buffer (150 mM Tris-HCl, pH 8), 2  $\mu\text{L}$  of viral suspension from stock or after heat treatment ( $5.10^{14}$  to  $10^{15}$  gc/mL), 16  $\mu\text{L}$  of ultrapure water ( $> 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ) and 2  $\mu\text{L}$  of SYPRO 62.5 $\times$  (final concentration = 5 $\times$ ). The experiments were ramped from 20 $^\circ\text{C}$  to 95 $^\circ\text{C}$  on a 1% stepwise gradient corresponding to  $\approx 1^\circ\text{C}/\text{min}$  with fluorescence measurements. Fluorescence intensity was determined by the sum of the readings in all channels of our qPCR system.

### **Statistical analysis**

---

Data from the RNase treatment were entered into Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) and analysed in StatEL 2.7 (Ad Science). Significant differences between groups were analysed by the Kruskal-Wallis test. A p value of  $< 0.05$  was considered as significant.

## Results

### Overall effects of heat on MS2 phage

The overall effects of heat on the structure and infectivity of MS2 phage were estimated for 60°C (10, 30 and 60 min) and 72°C (10 min).

The effect on the structure was evaluated by monitoring the capsid integrity, the size, as well as the persistence of the genome and its resistance to RNase treatment (Table 1). First, as shown by TEM, capsid integrity was not affected by any of the 60°C treatments. In contrast, a 72°C heat treatment for 10 min was found to disrupt the phage capsid as only a very small number of phage particles could be observed. Secondly, the mean size of MS2 phages did not change at 60°C compared to the native phages ( $22 \pm 1$  nm) but increased at 72°C to  $37 \pm 4$  nm. The size distribution was also much larger for 72°C with the presence of particles up to 100 nm in diameter. Thirdly, the persistence of the genome, estimated by RT-PCR, did not exhibit any significant changes for any of the conditions. Finally, RNase treatment did not alter the genome of native phages ( $- 0.1 \log_{10}$  degradation, Table 1), thus meaning that the difference between infectious and total RNA of 1/5 to 1/10 observed in stock suspensions was mainly due to the presence of the genome protected inside a capsid and not to the presence of naked RNA. The efficiency of the RNase treatment was checked on extracted MS2 RNA and a decrease of  $- 2.9 \pm 0.4 \log_{10}$  was obtained. After 10 min heating at 60°C, a transient  $- 0.8 \log_{10}$  increase in RNase sensitivity ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test) may be observed. This was not confirmed for either 30 or 60 min heat treatment ( $- 0.2 \log_{10}$ ). After 10 min heating at 72°C, high degradation ( $- 2.1 \log_{10}$ ) was observed confirming capsid disruption with such a treatment. An incomplete digestion of the MS2 RNA by the enzyme considering the small size of the RT-qPCR product (169 bp on 3,569 bp) may explain the RNase inability to completely eliminate RNA amplification as previously proposed (Yang and Griffiths 2014).

The inactivation rate during heat treatment was evaluated by plaque assay and by the capacity of MS2 phage to bind to its receptor (F-pili of *E. coli*). The results are given in Table 1. Infectivity decreased as temperature increased:  $- 1 \pm 0.1 \log_{10}$  at  $60 \pm 0.2^\circ\text{C}$  and  $- 8 \log_{10}$  at  $72 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . The inactivation rate was also correlated with contact time at 60°C:  $- 1.0 \pm 0.1 \log_{10}$  for 10 min,  $- 2.0 \pm 0.2 \log_{10}$  for 30 min and  $- 2.7 \pm 0.4 \log_{10}$  for 60 min. The reduction in the binding capacity to the host cells correlated fairly well with that in infectivity, except for 60 min where a slight difference was observed. Since disruption of the MS2 phage capsid was observed for viral particles at 72°C using TEM assays, the binding assays were not performed at this temperature.

To sum up, the 60°C heat treatments had no effect on the structure of MS2 phage (capsid aspect, size, and genome), except for a suspected transient permeability to RNase after 10 min exposure. Moreover, it can be assumed with confidence that some changes occurred at the capsid level since high inactivation was observed, possibly due to the reduction in the capacity of the phage to bind to its host cell. As for the 72°C heat treatment applied for 10 min, it disrupted the phage capsid. This led us therefore to use the 60°C heat treatments only to evaluate the differences in charge and hydrophobicity between native and heat-inactivated phages.

---

### Effect of heat on the charge of MS2 phage particles

The charge of MS2 phage was evaluated by electrophoretic mobility ( $\mu$ ) and by its adhesion capacity to positively or negatively charged beads.

Electrophoretic mobility experiments were performed on native and heated phage particles. These experiments were carried out as a function of ionic strength or of pH. No difference in behaviour was noted between native and heated particles whatever the conditions (Fig. 1A and 1B). The very same electrophoretic mobility profile was obtained after heating at 60°C for 10, 30 and 60 min. The isoelectric points (IEP) for native and heated phage particles were between pH 3.0 and 3.5. These results showed that electrophoretic mobility was not suitable to identify charge differences for the total particles in suspension. It is important to note that total particles include infectious as well as non-infectious particles.

The capacity of the phages to adhere to charged beads was assessed by plaque assay (PFU) and RT-qPCR. The two methods, as opposed to the electrophoretic mobility assay, allowed the charge of the infectious phages (PFU) and that of the total phages (RT-qPCR) to be estimated independently.

Two types of ion exchange magnetic beads were used in our experiments: one was negatively charged with a pKa of  $\approx 2.3$  and the other was positively charged with a pKa of  $\approx 10$ . The experiments were performed in triplicate in 50 mM PBS for different pH, for the two bead types, as well as for native and heated phages. Only one heating condition was selected: 60°C for 10 min. Binding profiles of the native and heated phages were obtained on the positively and negatively charged beads (Fig. 2A and Fig. 2B, respectively).

For both native and heated phages, the lowest adhesion capacity was obtained on negatively charged beads above the IEP (pH 4 and 7) and on positively charged beads below the IEP (3.0 and 2.5). Inversely, the highest adhesion capacity was obtained on negatively charged beads below the IEP and on positively charged beads above the IEP. It clearly confirmed that the IEP was between 3.0 and 4.0 for all types of particles as previously determined. For pH 7, differences in negative charge were observed between infectious ( $- 2.6 \log_{10} \pm 0.1$ ) and non-infectious ( $- 1.6 \log_{10} \pm 0.1$ ) phages in the native suspension. After heating, the negative charge of the infectious phages decreased, approaching the adhesion capacity of the non-infectious particles. For pH 3.0 and 2.5, results were more difficult to analyse because of (i) the proximity of the IEP of the phage particles, (ii) the possible aggregation of the phages and (iii) the proximity to the pKa of the negatively charged beads.

Overall, both native (infectious and non-infectious) and heated phages (infectious and non-infectious) had a negative charge for pH above 4 but native infectious phages had the highest negative charge.

### Effect of heat on the hydrophobicity of MS2 phage particles

The hydrophobicity of MS2 phage was evaluated by differential scanning fluorimetry (DSF) and by its adhesion capacity to hydrophobic or hydrophilic beads.

DSF experiments were performed with SYPRO Orange, a small dye with affinity for the hydrophobic regions of the proteins that become exposed upon heating. This method was able to measure the temperature at which proteins unfold (Niesen et al. 2007; Subba-Reddy et al. 2012; Walter et al. 2012). The DSF profile (fluorescence as a function of temperature) permitted the determination of the temperature at which the viral hydrophobic domains were accessible and therefore the melting temperature ( $T_m$ ) of the phage particles. For native MS2 phages,  $T_m$  was estimated to be 66°C - 67°C meaning that significant conformational changes occurred around such temperatures (Fig. 3). After exposure to 60°C (i.e. from 10 to 60 min), the initial fluorescence of the DSF profile progressively increased with heating time (Fig. 3). It meant that the dye was in part initially fixed on hydrophobic domains which could be located either on the capsid surface or/and inside the viral particle thus implying possible dye penetration. On the DSF profile, the decrease in fluorescence between 20°C and 60°C for heated phages could be due to probe quenching by water (Cimpmperman and Matulis 2011). The  $T_m$  value of 66°C - 67°C was still observed on the DSF profile after a 60°C treatment. On the other hand, no  $T_m$  could be determined after a 72°C treatment which was certainly due to the low concentration of remaining intact phage particles. Such an observation confirmed the results obtained with TEM and RNase treatment regarding the disruption of the viral particles after exposure to 72°C.

The binding capacity to hydrophobic beads was compared between native and heated phages (Fig. 4). To minimize the influence of charge, hydrophobicity was studied at pH 7 and high ionic strength (10 mM PBS with 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 150 mM NaCl). As described above on global charge, binding assays allowed the determination of hydrophobicity of the infectious phages (PFU) and that of the total phages (RT-qPCR) to be estimated independently. Due to the ratio of infectious phages on total phages of 1/5 to 1/10, total phages represented before and after heat treatment mainly non-infectious phages. For native phages, no adhesion was observed on these beads for both total and infectious phages. Therefore, few hydrophobic domains were expressed on the surface of MS2 particles as previously described (Dika et al. 2013). Subjecting phages to 60°C for 10 min (Fig. 4) highly increased the binding of the remaining infectious phages (initially in suspension, 105 PFU/mL). The adhesion level reached  $0.9 \pm 0.4 \log_{10}$  in the first run and  $1.5 \pm 0.2 \log_{10}$  in the second run. For total phages, detected by RT-qPCR, no adhesion was observed during the two runs. Thus, the hydrophobicity of heat-inactivated phages was the same as that of native phages. It meant that heat treatment transiently increased the hydrophobicity of infectious MS2 phages before inactivating them.

To conclude, these approaches showed a transitory increase in hydrophobicity at the surface of MS2 particles induced by heating at 60°C for infectious particles only. An increase in permeability may have also contributed to the increase in hydrophobicity that was shown by the DSF profile. Heat treatment may, therefore, induce the expression of hydrophobic domains at the surface of infectious MS2 phages and increase permeability of the particles due to modifications of the phage capsid.

## Discussion

The purpose of this study was to identify possible differences in surface properties between native and heated MS2 phages. To do so, overall charge and hydrophobicity were evaluated before and after heat treatment at 60°C and 72°C. We also studied the structure of the phage particles (physical

---

aspect, size, genome degradation and resistance to RNase treatment) and their inactivation (loss of infectivity and host cell binding capacity).

For such a purpose, it was essential to carefully characterize the native MS2 phages prior to any treatment. In our study, infectious phages accounted for only 10% to 20% of the total phages (i.e. genomes of infectious and non-infectious phages estimated by RT-qPCR using standard curve). The difference was not due to free viral RNA since our RNase treatment had no influence on native MS2 phages. Such a ratio could therefore be explained by the presence of incomplete and non-infectious phages that may not have been removed by the density gradient purification protocol. However, TEM observation results showed homogenous particles with a diameter of 22 nm. Previous studies had already identified such different particles (Krahn and Paranchych 1971; Paranchych et al. 1970). As observed after CsCl density gradient purification,  $\approx$  10% to 20% of phages R17 were infectious for *E. coli* (Paranchych et al. 1970). A 10% fraction of these non-infectious phages failed to bind to the F-pilus of *E. coli* due to a lack of the maturation protein (Krahn and Paranchych 1971). On the other hand, we could not exclude overestimation of the number of genome copies in the MS2 extract used for the standard curve and quantified by UV-Vis spectrophotometry, which measures all RNA including fragmented RNA. However, our initial phage suspension contained homogenous particles without free RNA but some of them were non-infectious for undefined reasons.

The first issue discussed here is the destruction of the phage particles by heat treatment. Heat is known to inactivate viruses but the conditions needed to disrupt the capsid still need to be specified. In this study, disruption is defined as a modification of the capsid that makes its observation by TEM impossible or the genome accessible to large molecules like RNase. Three major conclusions from our work allow identifying heat treatment conditions that disrupt the capsid: (i) few phage particles were observed by TEM after heating at 72°C for 10 min, (ii) the sensitivity of the genome to RNase after heating at 72°C was similar to that of the genome chemically extracted by nucleic acid extraction procedure, and (iii) the DSF profile ( $\approx$  1°C/min) showed only one major conformational change for a  $T_m$  of  $\approx$  66°C - 67°C for native MS2 phages. Taking into account that heating at 60°C did not disrupt the phage capsid whatever the exposure time (10 to 60 min), the critical temperature at which MS2 phage particles were disrupted may have been near 66°C - 67°C but surely strictly above 60°C. Some literature data confirm such a conclusion but only for MS2 VLPs (Virus-Like Particles). Using differential scanning calorimetry (DSC), performed with a temperature increase of 5°C/min, Bundy et al. (2008) and Ashcroft et al. (2005) obtained  $T_m$  values of 72.3°C and 68.8°C, respectively. In the case of Norwalk VLPs, similar temperature disruption was reported by TEM at 65°C with an increase in temperature of 15°C/h (Ausar et al. 2006). For bacteriophage  $\lambda$ , the release of its DNA was observed at  $\approx$  68°C and seemed to follow the loss of the phage tail (Qiu 2012). Exposure to 72°C led to genome accessibility to RNases for viruses such as hepatitis A virus or poliovirus (Nuanualsuwan and Cliver 2002; Pecson et al. 2009). For other viruses, the critical temperature seemed lower. Such was the case for echovirus 1, which was disrupted at 60°C for 10 min (Ruokola et al. 2014), as well as for Feline Calicivirus, whose genome became accessible to RNases after a treatment at 60°C for 2 min (Topping et al. 2009).

To sum up, above the critical temperature, non-infectious particles were mainly represented by free genomes. As a consequence, discrimination between the genome of infectious and non-infectious viruses can easily be obtained by an RNase treatment. Such treatment reduces false positive up to 3

$\log_{10}$  of genome. The critical temperature seemed to be strictly over 60°C for the previous cited viruses, including for MS2 phage.

For temperatures lower than the critical limit (60°C in our experiments), the presence of non-infectious structured particles in which the genome was still protected inside the capsid was clearly shown. Even after 60 min heating at 60°C no effect was identified on the overall particle structure (TEM), size (DLS) or genome (RT-PCR), or on the accessibility of the genome to RNase. On the other hand, inactivation of MS2 phage was significant and the capsid lost its capacity to bind to the host cell. A correlation between loss of infectivity and loss of host cell binding was observed as previously noted (Wigginton et al. 2012). This shows that modifications of the capsid were the cause of heat inactivation. Conformational changes at the capsid level could modify the charge or hydrophobicity of the particle.

The overall charge of the viruses could be determined by measuring their electrophoretic mobility and their adhesion to positively or negatively charged beads. Such an approach allowed monitoring, by a plaque assay, infectious phages among the total particles whose genomes were quantified by RT-qPCR. The electrophoretic mobility results concerning the IEP and overall charge of MS2 phages were in full agreement with literature data in the field (Dika et al. 2011; Langlet et al. 2008). No differences were observed using this method whatever the used conditions (i.e. as a function of ionic strength or of pH) which concerned mainly non-infectious phages. Nevertheless, other studies reported drastic changes. For example, heat treatment caused the IEP of native poliovirus to decrease from 7.5 to 4.5 (O'Brien and Newman 1979). This IEP decrease could have been related to a loss of VP4 and viral genomes and might have corresponded to the conversion from the 160S to the 80S form (Breindl 1971; O'Brien and Newman 1979). The capsid rearrangement after the loss of VP4 and genomes might have led to this lower IEP. In our study, the adhesion profiles of the total particles (mainly non-infectious) also confirmed the IEP of MS2 phage. They also showed that the charge did not change at pH 7 after heating at 60°C for 10 min. They confirmed that the IEP of MS2 phage was between 3.0 and 4.0 as well. More interestingly, the results clearly showed that before heating, infectious phages exhibited higher adhesion capacity to positively charged beads than that of total phages which were mainly non-infectious phages. This modification of the charge density for infectious viruses was never described until yet.

With respect to the determination of the particle hydrophobicity, different approaches were used: interaction with a fluorescent probe and adhesion to hydrophobic support (Dika et al. 2013). Our results confirm data found in the literature saying that MS2 phage expresses relatively low hydrophobicity (Dika et al. 2013), but they also provide new knowledge on MS2 hydrophobicity through comparison between native and heated phages. The adhesion experiments showed that a 60°C heat treatment leads to an increase in the hydrophobicity of the remaining infectious MS2 phages compared to the native infectious phages. Interestingly, non-infectious phages had low hydrophobicity like native phages. Therefore, a transient higher hydrophobic but still infectious state could be hypothesized. We propose a transient state between low hydrophobic infectious particles and low hydrophobic non-infectious particles composed of particles still infectious but with higher hydrophobicity than the other two particle types. This transitory state may potentially explain the facilitated accessibility of RNase to viral genome for the latter particles after 10 min heating at 60°C. The DSF profile gave additional information as the initial fluorescence was found to correlate with the heat exposure time at 60°C. The more the heat exposure time was increased the more the

hydrophobic domains were accessible to the probe. Nevertheless, this relationship was not gradual for adhesion capacity to hydrophobic beads so it may have been due to the diffusion of the SYPRO probe inside the capsid (SYPRO probe is smaller than RNase). Disruption of the capsid was still observed on the DSF profile at 66°C - 67°C whatever the heating time.

In the light of our results, this study demonstrated that heating at 60°C slightly decreases the negative charge of the remaining infectious phages and transiently increases their hydrophobicity. The permeability to small molecules such as SYPRO probe, but not RNase, may be increased by heat exposure, thus establishing the existence of non-infectious particles in which the genome is still protected from RNases. At 72°C the particles are disrupted and the genome becomes accessible to RNase. Critical temperatures, permeability and expression of hydrophobic domains should now be explored for other enteric viruses to determine the application range of pretreatments able to discriminate infectious from non-infectious viruses prior to their detection by molecular tools. Nonetheless, some of the method used in this study will not be applicable to the low concentration of enteric viruses found in food samples.

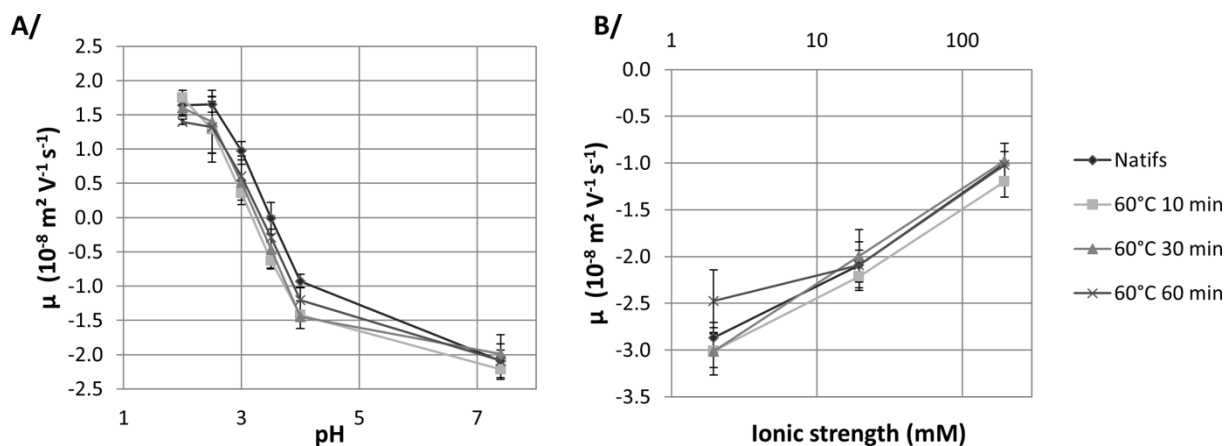
### **Acknowledgments**

The results of this study were obtained within the scope of CapsiVir, a project coordinated by ACTALIA and funded by the “Conseil Régional de Basse Normandie”. This study, labelled by the competitiveness cluster VALORIAL, was also supported by the Joint Technical Unit ACTIA VIROcontrol and the “Syndicat des Fabricants des Produits Frais Prêts à l’Emploi” (cluster of ready-to-eat food industries: Florette, Bonduelle, Crudettes and Rosée des Champs). We thank Sylvie Migot (IJL, UMR 7198, Nancy, France) and Dr. Céline Caillet (LIEC, UMR 7360, Vandoeuvre-les-Nancy, France) for their help and support with TEM and DLS/electrophoretic mobility experiments, respectively.

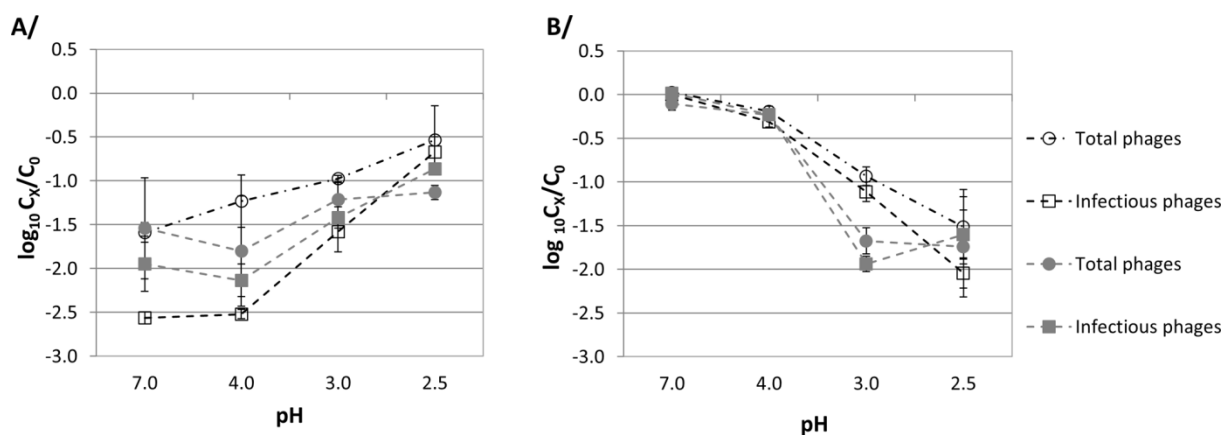


**Table 1** Effects of exposure to 60°C for 10, 30 and 60 min, and to 72°C for 10 min on the integrity of MS2 phage, as well as on its size, infectivity, host cell binding capacity, and genome without or with RNase treatment. Samples were observed at  $\times 50,000$  magnification (bar, 50 nm). Experiments were performed in triplicate for 60°C and in duplicate for 72°C (except for RNase treatment in triplicate). ND = Not Determined, SD = Standard Deviation,  $\infty$  = infeasible, a =  $10^{12}$  PFU/mL, b =  $10^{14}$  PFU/mL, c =  $10^7$  gc/mL

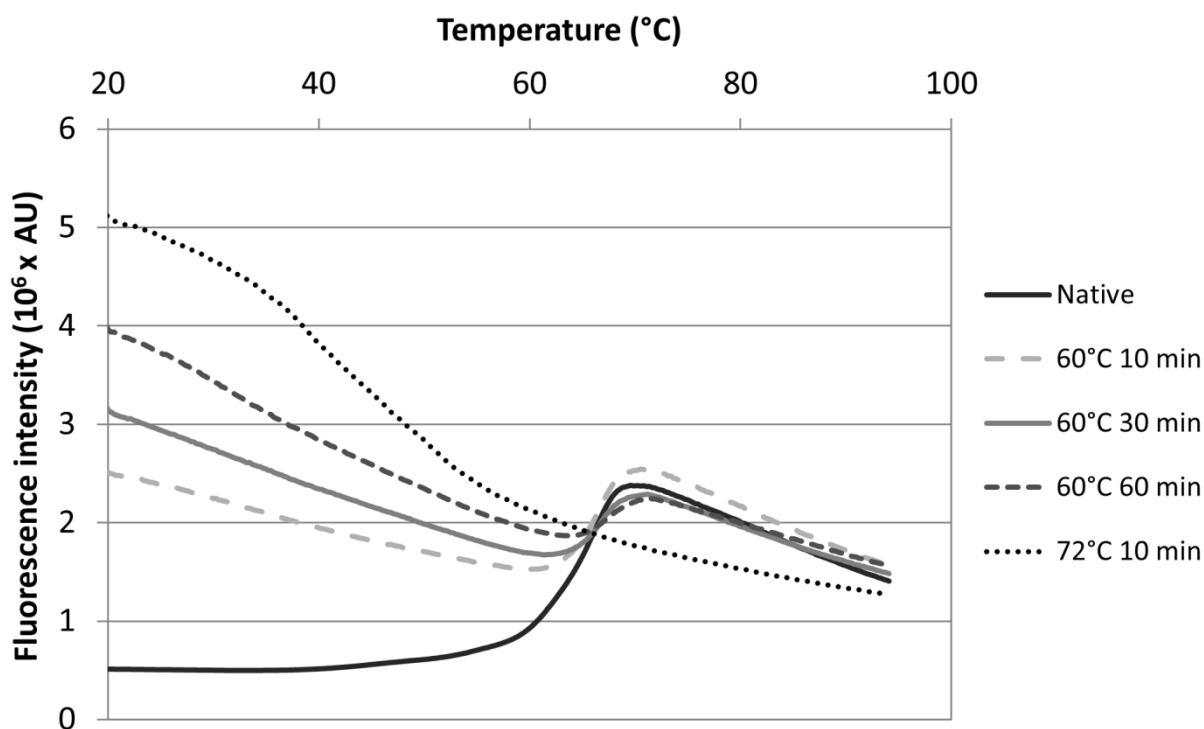
Heat treatment	Untreated	60°C, 10 minutes	60°C, 30 minutes	60°C, 60 minutes	72°C, 10 minutes
Size (nm $\pm$ SD) <sup>a</sup>	22 $\pm$ 1	21 $\pm$ 1	22 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2	37 $\pm$ 4
Loss of infectivity (log <sub>10</sub> $\pm$ SD) <sup>b</sup>	$\infty$	- 1.0 $\pm$ 0.1	- 2.0 $\pm$ 0.2	- 2.7 $\pm$ 0.4	- 8
Loss of host cell binding (log <sub>10</sub> $\pm$ SD) <sup>c</sup>	$\infty$	- 1.1 $\pm$ 0.2	- 1.8 $\pm$ 0.2	- 2.0 $\pm$ 0.3	ND
Loss of genome (log <sub>10</sub> $\pm$ SD) <sup>c</sup>	$\infty$	- 0.1 $\pm$ 0.1	- 0.5 $\pm$ 0.4	- 0.5 $\pm$ 0.4	- 0.4
Loss of genome with RNase treatment (log <sub>10</sub> $\pm$ SD) <sup>c</sup>	- 0.1 $\pm$ 0.1	- 0.8 $\pm$ 0.2	- 0.2 $\pm$ 0.1	- 0.2 $\pm$ 0.3	- 2.1 $\pm$ 0.4



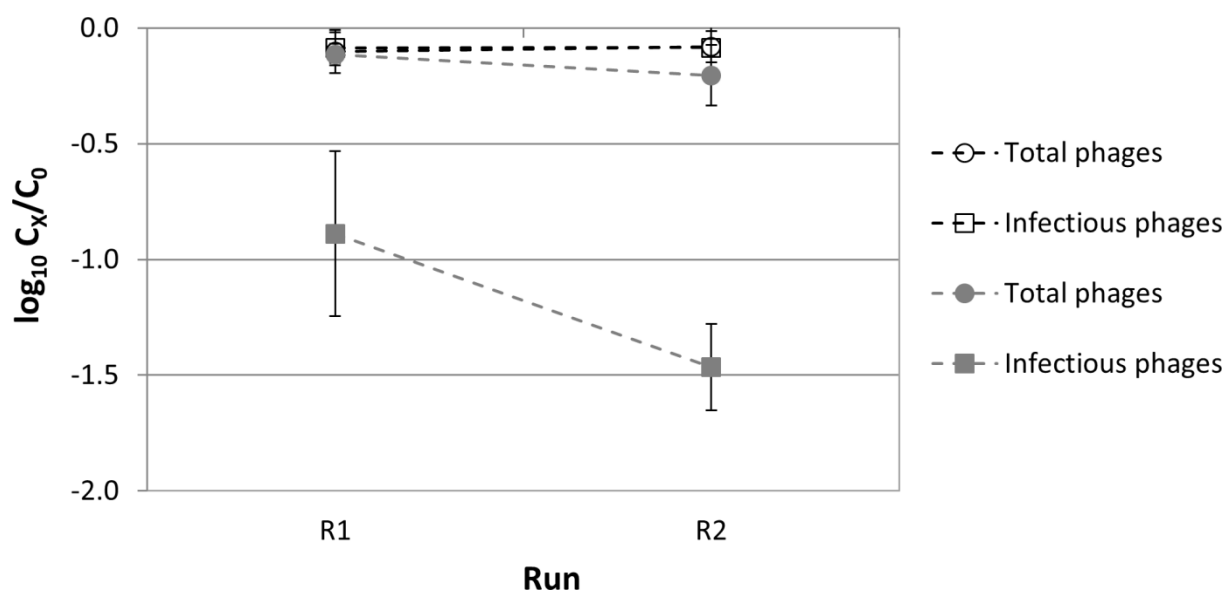
**Fig. 1** Electrophoretic mobility ( $\mu$ ) of MS2 bacteriophage (A) as a function of pH in 15 mM PBS or (B) as a function of the ionic strength (mM) at pH 7.4. The solid lines are only guides to the eye. Three independent experiments were performed, each time with three measurements. Error bars indicate standard deviations



**Fig. 2** Binding assay of MS2 bacteriophage to charged beads in the case of native phages (empty forms) or heated phages (full forms) at 60°C for 10 min in 50 mM PBS. The results obtained with positively and negatively charged beads are represented in A and B, respectively. The circle forms represent the total phages detected by RT-qPCR and the square forms the infectious phages detected by plaque assay. The dotted lines are only guides to the eye. Three independent experiments were performed. Error bars indicate standard deviations.  $C_x$ , concentration after binding assay,  $C_0$ , initial concentration



**Fig. 3** SYPRO Orange signature of MS2 phage before and after heat treatment at 60°C or 72°C. The curve represents one of three independent experiments. Fluorescence intensity is given in arbitrary units ( $10^6 \times AU$ )



**Fig. 4 Binding of native (empty forms) or heated (full forms) MS2 phages to hydrophobic, magnetic beads at pH 7 in 10 mM PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 150 mM NaCl) after 10 min heating at 60°C. The circle forms represent the total phages detected by RT-qPCR and the square forms the infectious phages detected by plaque assay. Three independent experiments were performed. Error bars indicate standard deviations. C<sub>x</sub>, concentration after binding assay, C<sub>0</sub>, initial concentration**

#### References:

- Ashcroft, A. E., Lago, H., Macedo, J. M. B., Horn, W. T., Stonehouse, N. J., & Stockley, P. G. (2005). Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 5(12), 2034–41. doi:10.1166/jnn.2005.507
- Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S., & Middaugh, C. R. (2006). Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *The Journal of biological chemistry*, 281(28), 19478–88. doi:10.1074/jbc.M603313200
- 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), 477–84. doi:10.1128/AEM.02095-06
- Baert, L., Wobus, C. E., Van Coillie, E., Thackray, L. B., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2008). Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Applied and environmental microbiology*, 74(2), 543–6. doi:10.1128/AEM.01039-07
- Belnap, D. M., Filman, D. J., Trus, B. L., Cheng, N., Booy, F. P., Conway, J. F., et al. (2000). Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *Journal of virology*, 74(3), 1342–54. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=111469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bertrand, I., Schijven, J. F., Sánchez, 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), 1059–74. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x
- 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), 2651–64. doi:10.1016/j.watres.2012.02.020
- Bozkurt, H., D'Souza, D. H., & Davidson, P. M. (2015). Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. *Journal of food protection*, 78(8), 1597–617. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-487

- Breindl, M. (1971). The structure of heated poliovirus particles. *The Journal of general virology*, 11(3), 147–56. doi:10.1099/0022-1317-11-3-147
- Bundy, B. C., Franciszkowicz, M. J., & Swartz, J. R. (2008). Escherichia coli-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1), 28–37. doi:10.1002/bit.21716
- Cimpmperman, P., & Matulis, D. (2011). Protein thermal denaturation measurements via a fluorescent dye. *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement and Modelling*, (22), 247–273. <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849730099-00247/978-1-84973-009-9>
- Curry, S., Chow, M., & Hogle, J. M. (1996). The poliovirus 135S particle is infectious. *Journal of virology*, 70(10), 7125–31. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=190765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 5 December 2014
- 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
- 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(14), 4939–48. 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
- Fricks, C. E., & Hogle, J. M. (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *Journal of virology*, 64(5), 1934–45. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=249347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 5 December 2014
- 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), 3965–9. doi:10.1128/AEM.69.7.3965
- ISO. (1995). ISO 10705-1. Water quality: detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages.
- Krahn, P. M., & Paranchych, W. (1971). Heterogeneous distribution of A protein in R17 phage preparations. *Virology*, 43(2), 533–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5543844>
- 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 research*, 42(10-11), 2769–77. doi:10.1016/j.watres.2008.02.007
- Levy, H. C., Bostina, M., Filman, D. J., & Hogle, J. M. (2010). Catching a virus in the act of RNA release: a novel poliovirus uncoating intermediate characterized by cryo-electron microscopy. *Journal of virology*, 84(9), 4426–41. doi:10.1128/JVI.02393-09
- Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols*, 2(9), 2212–21. doi:10.1038/nprot.2007.321
- Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2002). Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of virological methods*, 104(2), 217–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088831>
- O'Brien, R. T., & Newman, J. (1979). Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(6), 1034–1039. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=291240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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(24), 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(1-2), 131–9. doi:10.1016/j.jviromet.2006.08.004
- Paranchych, W., Krahn, P. M., & Bradley, R. D. (1970). Stages in phage R17 infection. *Virology*, 41(3), 465–473. doi:10.1016/0042-6822(72)90552-1
- Pecson, B. M., Martin, L. V., & Kohn, T. (2009). Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Applied and environmental microbiology*, 75(17), 5544–54. doi:10.1128/AEM.00425-09
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F. S., Joyeux, M., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2016). Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water research*, 91, 68–76. doi:10.1016/j.watres.2015.12.049
- Qiu, X. (2012). Heat induced capsid disassembly and DNA release of bacteriophage λ. *PloS one*, 7(7), e39793. doi:10.1371/journal.pone.0039793
- Ruokola, P., Dadu, E., Kazmertsuk, A., Häkkänen, H., Marjomäki, V., & Ihalainen, J. a. (2014). Raman spectroscopic signatures of echovirus 1 uncoating. *Journal of virology*, 88(15), 8504–13. doi:10.1128/JVI.03398-13
- Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., et al. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and environmental microbiology*, 77(19), 6884–8. doi:10.1128/AEM.05806-11
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., & Ohno, K. (2009). Comparison of behaviors of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Qbeta and MS2, during the aluminum coagulation process. *Water research*, 43(3), 605–12. doi:10.1016/j.watres.2008.11.002
- Sidhu, J. P. S., & Toze, S. G. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environment international*, 35(1), 187–201. doi:10.1016/j.envint.2008.07.006
- Simonet, J., & Gantzer, C. (2006). Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *Journal of applied microbiology*, 100(4), 862–70. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02850.x
- Subba-Reddy, C. V., Yunus, M. a., Goodfellow, I. G., & Kao, C. C. (2012). Norovirus RNA Synthesis Is Modulated by an Interaction between the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase and the Major Capsid Protein, VP1. *Journal of Virology*, 86(18), 10138–10149. doi:10.1128/JVI.01208-12
- Topping, J. R., Schnerr, H., Haines, J., Scott, M., Carter, M. J., Willcocks, M. M., et al. (2009). Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity. *Journal of virological methods*, 156(1-2), 89–95. doi:10.1016/j.jviromet.2008.10.024
- Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K., & Unge, T. (1990). The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature*, 345(6270), 36–41. doi:10.1038/345036a0
- Walter, T. S., Ren, J., Tuthill, T. J., Rowlands, D. J., Stuart, D. I., & Fry, E. E. (2012). A plate-based high-throughput assay for virus stability and vaccine formulation. *Journal of Virological Methods*, 185(1), 166–170. doi:10.1016/j.jviromet.2012.06.014
- Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Bosshard, F., Kohn, T., & Sigstam, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental science & technology*, 46(21), 12069–78. doi:10.1021/es3029473
- Yang, Y., & Griffiths, M. W. (2014). Enzyme Treatment Reverse Transcription-PCR To Differentiate Infectious and Inactivated F-Specific RNA Phages. *Applied and environmental microbiology*, 80(11), 3334–40. doi:10.1128/AEM.03964-13

## II. Inactivation et évolution des propriétés de surface du norovirus murin au cours de traitements par la chaleur ou la chloration

### Contexte :

L'hypochlorite de sodium est l'agent désinfectant le plus couramment utilisé par l'industrie agro-alimentaire. Celui-ci semble agir à la fois sur la capsidite et sur le génome viral au contraire de la chaleur qui agit principalement sur la capsidite. Après chloration, une modification de la capsidite virale est observée avec la formation de groupements carbonyle à sa surface (Sano *et al.*, 2010) et une perte de fonctionnalité de celle-ci. Le génome est également impacté après chloration avec certaines régions sont plus touchées que d'autres. Comme dans le cas de la chaleur, le signal de RT-PCR peut donc persister après chloration en l'absence de caractère infectieux.

### Objectifs :

L'objectif premier est d'évaluer l'impact de la chaleur et de l'hypochlorite de sodium sur l'intégrité de la particule du MNV, le deuxième de mettre en évidence les éventuels changements de conformation des protéines qui composent cette particule. Les changements de conformation pourraient modifier la charge de surface, l'hydrophobie et/ou la perméabilité de la particule virale.

### Méthodes :

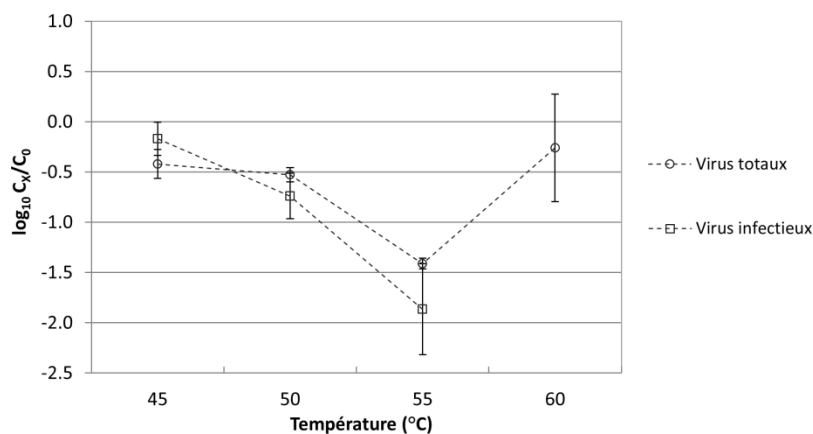
La quantification du nombre de particules est réalisée par culture pour les infectieuses et par RT-qPCR pour les totales (infectieuses et non-infectieuses). La plus faible concentration en virus infectieux pour le MNV fait que certaines méthodes comme le MET ou la DLS ne peuvent être utilisées. L'intégrité de la capsidite du MNV n'a donc pu être évaluée que par l'utilisation de la RNase. Les modifications conformationnelles ont été étudiées par la reconnaissance au récepteur cellulaire (adhésion sur cellule hôte), la charge (adhésion sur supports chargés) et l'hydrophobie (adhésion sur supports hydrophobes).

### Résultats :

Différentes températures (de 45°C à 80°C) pendant 10 minutes et deux concentrations d'hypochlorite de sodium (20 mg/L et 50 mg/L) ont été testées. A partir de 72°C et 50 mg/L l'intégrité de la capsidite semble altérée d'après les résultats de dégradation du génome de MNV par la RNase. Ainsi, ces conditions apparaissent comme critiques pour les particules de MNV. Au contraire, entre 45°C et 60°C et à 20 mg/L, l'intégrité de la capsidite paraît conservée. La perte

partielle de la capacité d'adhésion à la cellule hôte après ces traitements indique néanmoins une altération de ses fonctionnalités voire de sa conformation.

Aucune différence de charge n'a été observée après traitement par la chaleur ou l'hypochlorite de sodium. Le *pI* du MNV avant et après traitement se situerait entre pH 3 et pH 4. Les tests d'adhésion sur les billes hydrophobes ont été réalisés pour des températures comprises entre 45°C et 60°C (**Figure 31**). Les MNV natifs et chauffés à 45°C ou 60°C ont une adhésion minimale donc une hydrophobie faible. Par contre, à 55°C, une augmentation de l'hydrophobie est observée pour les MNV infectieux et les non-infectieux. Une expérience complémentaire, comportant un premier chauffage à 60°C (10 minutes) puis un second à 45, 50 et 55°C (10 minutes), a été réalisée. Le taux d'adhésion des MNV est resté faible et identique à celui obtenu après exposition à 60°C. Ces résultats suggèrent que l'exposition de MNV à une température de 60°C entraîne des modifications irréversibles de la conformation des protéines des particules virales inactivées. Par contre, pour des particules de MNV ayant conservé leur caractère infectieux après exposition à 60°C pendant une minute, une seconde exposition à 55°C pendant 10 minutes permet d'augmenter leur hydrophobie. Ainsi, après exposition à 60°C, les particules inactivées ont une faible hydrophobie mais leur conformation est irréversible alors que l'hydrophobie des particules infectieuses peut être augmentée par exposition à 55°C.



**Figure 31. Evaluation de l'hydrophobie des MNV natifs ou chauffés (de 45°C à 60°C, 10 minutes) par adhésion sur des billes hydrophobes.**

#### Conclusion :

La présence de particules virales non-infectieuses dont le génome est inaccessible à la RNase a été démontrée pour le MNV avec traitement par la chaleur ou l'hypochlorite de sodium. Pour une température de 72°C et une concentration en hypochlorite de sodium de 50 mg/L, l'atteinte de la

capside du MNV permet la détection spécifique d'ARN de MNV infectieux par l'utilisation de RNases. Pour des températures de 50°C et 55°C, l'hydrophobie est augmentée pour les particules infectieuses et inactivées. Par contre, pour une température de 60°C, l'hydrophobie est faible et identique aux virus natifs. Toutefois, cet état n'est stable que pour les particules inactivées. Les particules infectieuses après exposition à 60°C peuvent être mises en évidence par l'augmentation de leur hydrophobie par exposition secondaire à une température de 55°C. Pour l'hypochlorite de sodium utilisé à une concentration de 20 mg/L, la charge et l'hydrophobie ne sont pas modifiées, mais la capacité d'adhésion à la cellule hôte est diminuée. Si des phénomènes d'oxydation ont lieu au niveau de la capsid ce qui pourrait fragiliser les particules virales et les rendre ainsi plus sensible à un traitement thermique par exemple.



Article accepté dans *Food and Environmental Virology* le 25/11/2016

**The Effect of Heat or Free Chlorine Treatment on the Surface Properties of Murine Norovirus**

Adrien Brié<sup>1,2,3</sup>, Ravo Razafimahefa<sup>3</sup>, Julie Loutreul<sup>3</sup>, Aurélie Robert<sup>1,2,3</sup>, Christophe Gantzer<sup>1,2</sup>, Nicolas Boudaud<sup>3</sup>, Isabelle Bertrand<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Lorraine, LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

<sup>2</sup>CNRS, LCPME, UMR 7564, Institut Jean Barriol, Nancy, France

<sup>3</sup>ACTALIA, Food Safety Department, Saint Lô, France.

\*Corresponding author: Isabelle Bertrand, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Albert Lebrun, Nancy F-54000, France.

E-mail: isabelle.bertrand@univ-lorraine.fr

**ABSTRACT**

Heat and free chlorine are among the most efficient and commonly used treatments to inactivate enteric viruses, but their global inactivation mechanisms have not been elucidated yet. These treatments have been shown to affect at least the capsid proteins of viruses and thus may affect the surface properties (i.e. electrostatic charge and hydrophobicity) of such particles. Our aim was to study the effects of heat and free chlorine on surface properties for a murine norovirus chosen as surrogate for human norovirus. No changes in the surface properties were observed with our methods for murine norovirus exposed to free chlorine. Only the heat treatment led to major changes in the surface properties of the virus with the expression of hydrophobic domains at the surface of the particles after exposure to a temperature of 55°C. No modification of the expression of hydrophobic domains occurred after exposure to 60°C and the low hydrophobic state exhibited by infectious and inactivated particles after exposure to 60°C appeared to be irreversible for inactivated particles only, which may provide a means to discriminate infectious from inactivated murine noroviruses. When exposed to a temperature of 72°C or to free chlorine at a concentration of 50 mg/L, the genome became available for RNases.

Keywords: Murine norovirus; Heat; Free chlorine; Surface properties; Hydrophobicity; Charge

**INTRODUCTION**

Pathogenic enteric viruses are commonly involved in waterborne and foodborne diseases in Europe and in the USA (EFSA 2016; Hall et al. 2014). Among them, human noroviruses (HuNoVs) are a leading cause of acute gastroenteritis worldwide (Verhoef et al. 2015) and two cell culture methods have recently been proposed for the detection of their infectious forms (Ettayebi et al. 2016; Jones et al. 2015). These methods are far from being immediately usable in routine analysis and standardized RT-PCR methods targeting viral genomes (ISO/TS 15216 standard, 2013) are currently used by control laboratories (ISO 2013). However, the persistence of the genome is much greater than that of the corresponding infectious virus in most cases (de Roda Husman et al. 2009; Gassilloud et al. 2003; Prevost et al. 2016; Seitz et al. 2011). This makes questionable the use of viral genome data for risk assessment in food and environmental virology. Thus, it appears that knowledge about the differences between infectious and non-infectious viral particles, and more broadly about the mechanisms of inactivation, is crucial to improve the analysis of viruses in food and environmental matrices.

Numerous studies have been conducted on the mechanisms of virus inactivation which depend on the inactivation treatment. Moreover, the virus composition, structure and function surely affect the mechanisms of virus disinfection (Wigginton and Kohn 2012). The detection of a small fragment of genome by RT-PCR methods and the variation in susceptibility of some regions of the genome (Wigginton et al. 2012) have led to the development of methods focusing on the capsid integrity in terms of permeability and functionalities over the last ten years. Enzymatic treatments such as RNases limit the detection to genomes coming from intact particles under conditions leading to the disruption of the capsid (Brié et al. 2016) and have largely proven effective under very high temperature conditions (Nuanualsuwan and Cliver 2002; Pecson et al. 2009; Topping et al. 2009). Pre-treatment with the intercalating dyes ethidium monoazide or propidium monoazide coupled with molecular detection could allow better assessment of the viral risk in water when multiple disinfection treatments such as ozonation and chlorination are used (Prevost et al. 2016). The capacity of the virus to bind to its host cell, or to its receptor, reflects the preservation of this major function of the viral capsid. However, the loss of this function depends on the inactivation treatment. For example, the binding capacity of free chlorine-inactivated poliovirus and MS2 phage did not seem to be affected (O'Brien and Newman 1979; Wigginton et al. 2012), whereas a correlation between loss of infectivity and loss of this function was reported with heat treatment (Brié et al. 2016; Wigginton et al. 2012). Besides, permissive cell lines, or at least virus receptors, should be identified prior to applying such a method. New approaches evaluating the oxidation effect of free chlorine on viral capsid proteins with the use of a biotin-avidin system have concluded that the number of

carbonyl groups on the viral capsid proteins of human and murine noroviruses increased with increasing free chlorine dose (Sano et al. 2010, 2015; Tojo et al. 2013). Beyond the permeability or the specific functionalities of the capsid, the surface properties of viral particles such as electrostatic charge and hydrophobicity seem to be affected during inactivation. Indeed, an increase in hydrophobicity was observed for poliovirus exposed to 50°C, which was found to be linked to the externalization of the N-terminus part of the viral protein VP1 (Curry et al. 1996; Fricks and Hogle 1990). Recently, the expression of hydrophobic domains was also demonstrated for MS2 phage and this phenomenon was reported to be specific of particles remaining infectious after exposure to 60°C (Brié et al. 2016). Concerning the electrostatic charge of viral particles, a decrease in the isoelectric point (IEP) was observed for poliovirus inactivated by heat (O'Brien and Newman 1979).

Thus, the aim of the present work was to evaluate the effect of heat and free chlorine on the surface properties of viral particles using a surrogate for HuNoVs. Heat and free chlorine are among the most cost-effective and easiest to apply processes and sanitizers in the food and water industries. Heat remains the most studied of the virucidal techniques for enteric viruses with studies focusing on poliovirus (Belnap et al. 2000; Breindl 1971; Curry et al. 1996; Fricks and Hogle 1990) and more recently on the F-specific RNA phage MS2 (Brié et al. 2016; Pecson et al. 2009; Wigginton et al. 2012). Less data is available about the mechanisms of inactivation induced by chlorine with few studies focusing on pathogenic enteric viruses but also on their surrogates such as MS2 phage or murine norovirus (MNV) (Li et al. 2002; Lim et al. 2010; O'Brien and Newman 1979; Sano et al. 2010, 2015; Sigstam et al. 2013; Tojo et al. 2013; Wigginton et al. 2012). Among norovirus surrogates, MNV and Tulane virus have recently been described as the best ones for the evaluation of inactivation and disinfection treatments (Cromeans et al. 2014). Although the application of HuNoV surrogates has been challenged because they may not mimic the viruses they represent (Knight et al. 2016; Richards 2012), MNV is widely used in areas of applied and fundamental virology such as the evaluation of food processing technologies (Hirneisen and Kniel 2013), agricultural practices (Wang and Kniel 2016), or the understanding of infection mechanisms (Karst and Wobus 2015). The first objective was to evaluate the effects of heat and free chlorine on infectivity, host cell binding capacity, genome stability and capsid permeability to RNase. RNase treatment was used to demonstrate the presence of non-infectious viruses still possessing a genome protected by the capsid after both heat and free chlorine treatments. The global electrostatic charge and hydrophobicity of MNV were then monitored for several temperatures and free chlorine concentrations.

---

## MATERIALS AND METHODS

### Cell line, virus and purification

RAW 264.7 cells (ATCC TIB-71) were used in this study between passages 15 and 30. They were cultured in DMEM-10 which was Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, ThermoFisher Scientific), 1% non-essential amino acids (NEAA, ThermoFisher Scientific) and 1% HEPES solution (1 M, Dominique Dutscher). RAW 264.7 cells were grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

MNV-1 strain S99 was kindly provided by the Friedrich Loeffler Institute (Germany). RAW 264.7 cells were infected with MNV-1 S99 at an MOI of 0.1 for 2 days. Three freeze/thaw cycles and centrifugation (400g for 15 min) were then performed to remove cell debris from the viral lysate as previously described (Wobus et al. 2004). The supernatant was collected, aliquoted (1 mL) and stored at -80°C.

Prior to each experiment, an MNV-1 aliquot was thawed, dialysed (Float-A-Lyzer G2 dialysis device 100 kDa 1mL, Spectra/Por) overnight against phosphate-buffered saline (PBS) at a concentration of 1 mM (1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> with 14 mM NaCl, Fisher Bioreagents) and kept at 4°C before use.

### Infectivity Assay

The TCID<sub>50</sub> (tissue culture infectious dose<sub>50</sub>) assay was used to determine infectious virus titres (Hwang et al. 2015). RAW 264.7 cells were seeded into a 96-well plate at a density of  $3 \times 10^4$  per well, the day before MNV titration. Serial 10-fold dilutions of the working suspension of the virus were made in DMEM-2 which was DMEM supplemented with 2% FBS, 1% NEAA, 1% HEPES solution and 1% sodium pyruvate (ThermoFisher Scientific). Aliquots (100 µL) of each dilution were then inoculated into 16 wells of the 96-well plate with the RAW 264.7 cell monolayer. The plates were incubated for 3-5 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The titre of the virus was then calculated by using Spearman-Kärber's method (Karber 1931). The final concentration of infectious particles in dialysed MNV was around  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL.

### Genome extraction and quantification

Viral RNA was extracted from 50 µL samples using the QIAamp viral RNA kit (Qiagen) and eluted in 100 µL of the appropriate buffer, according to the manufacturer's instructions. The extracts were immediately stored at -80°C. According to the manufacturer's recommendations, reverse transcription (RT) was performed from 7.5 µL of extracted RNA using a reverse primer (5'-CCATATCCAACCTCGAGGTTGGT) at a final concentration of 0.4 µM, 100 U of SuperScript III (Life Technologies) and 20 U of RNaseOUT (Life Technologies) in a 20-µL reaction volume. The RT step was performed at 50°C for 60 min, then at 70°C for 15 min. Quantitative PCR (Life Technologies, StepOne Plus) was then carried out from 5 µL of cDNA with the TaqMan universal PCR master mix (Life Technologies) in a 25-µL reaction volume, with reverse and forward (5'-CCTGACATTGTGATGCAAGAATC) primers at a final concentration of 0.4 µM and the TaqMan MGB probe (5'-FAM-CGTCATCACCATAGAAG-MGBNFQ) at a concentration of 0.2 µM. PCR amplification was performed at 50°C

for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. The primers and probe used in the RT-qPCR (Life Technologies, StepOne Plus) were as previously defined (Belliot et al. 2008). Negative and positive controls (with known quantities of MNV) were included in each experiment to ensure no contamination and good reproducibility of the extractions and RT-qPCR steps. During the experiments, RT-qPCR efficiency ranged between 85% and 95%.

Determination of the number of MNV genome copies per mL (gc/mL) used for the standard curve was performed using an RNA transcript from a plasmid (Eurofins, pEX-A-A228235-MNV) quantified by a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, NanoDrop 2000). No DNA contamination was detected in our RNA transcript solution. The calculation for the gc/mL was performed with a size of 286 nucleotides corresponding to the transcript size. The final number of genome copies in dialysed MNVs was around  $5 \times 10^7$  gc/mL.

### **Inactivation of MNV by heat and free chlorine**

Dialysed viruses ( $\approx 250 \mu\text{L}$ ) were used at a concentration of  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL in 1 mM PBS (1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> with 14 mM NaCl) for heat and free chlorine treatments.

MNV-1 was exposed to different temperatures - 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 72°C, and 80°C - for 10 min in prewarmed Protein LoBind tubes (Eppendorf) in a water bath. Heated samples were immediately placed on ice to avoid further inactivation.

To prepare our free chlorine stock solution, concentrated sodium hypochlorite solution (5%, Acros) was used and diluted using ultrapure water ( $> 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ). Determination of free chlorine concentration was performed according to the ISO 7393-2 (ISO 1985) procedure with the use of diethyl-p-phenylenediamine (DPD, Acros). The working concentrations of free chlorine were 20 mg/L and 50 mg/L with a contact time of 15 min at 4°C. Residual free chlorine was immediately quenched by adding two moles of sodium thiosulfate equivalent to one mole of free chlorine.

For the following experiments, MNV was 10-fold diluted in the appropriate buffer corresponding to the assay.

### **RNase assay**

Suspensions of MNV-1 (final concentration of  $10^7$  gc/mL) were treated with RNase A (final concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , AppliChem) at 37°C for 60 min as previously described for MS2 phage (Brié et al. 2016). MNV-1 suspensions without RNase treatment were used as negative controls for both TCID<sub>50</sub> and RT-qPCR assays. The efficiency of the treatment was estimated using RNA extracted from MNV-1 ( $10^7$  gc/mL) as positive control. The removal of RNase during the genome extraction procedure was assessed by a 10-fold dilution of the samples which gave similar results (i.e. between 75% and 110%) to those of the undiluted samples.

### **Binding of MNV to RAW 264.7 cells**

Binding assays of MNV to its host cells, RAW 264.7, were performed in 24-well plates ( $5 \times 10^5$  cells/well in 1 mL DMEM-10). The medium was removed prior to adding 500  $\mu\text{L}$  of viral suspension in DMEM-2. To allow viral

particles to adsorb, the plate was incubated for 2 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Next, each well was washed twice with 1 mL of DMEM-2. Lysis was carried out twice for 10 min with 250 µL of lysis buffer. The viral genome was then extracted and quantified by RT-qPCR. The modification of the binding capacity of MNV to RAW 264.7 cells was modelled as  $\log \frac{Q}{Q_0}$ , where Q is the viral RNA of MNV found on the cells after treatment and Q<sub>0</sub> before treatment.

#### **Binding of MNV to hydrophobic or positively charged beads**

Two types of magnetic beads were used to evaluate the hydrophobicity and the negative global charge of MNV (Brié et al. 2016). Hydrophobic beads and positively charged beads were coated with polystyrene (PolySciences) and primary secondary amine (PSA, Bioclone), respectively.

Briefly, prior to the experiments, the beads were washed twice in the corresponding buffer, which was either 10 mM PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> with 150 mM NaCl) for hydrophobic beads or 50 mM PBS (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> with 20 mM NaCl) at different pH levels (7.0, 4.0, 3.0 and 2.5) for ion exchange beads. The binding assays were performed in Protein LoBind tubes with a viral concentration of 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL and around 10<sup>8</sup> beads/mL, in a final volume of 2 mL. The binding assay using hydrophobic beads was carried out twice for 2 h at room temperature using Dynal MX1 Mixer (Life Technologies). New washed beads were used for the second run. With ion exchange beads, only one run was done for 10 min at room temperature using Dynal MX1 Mixer too. Then, the beads were separated from the supernatant with a magnet for 2 to 3 min. Supernatants were analysed by both TCID<sub>50</sub> (infectious MNV) and RT-qPCR (total MNV) methods and beads were analysed by RT-qPCR method only. The modification of the binding capacity of MNV to beads was estimated by  $\log \frac{C_x}{C_0}$ , where C<sub>x</sub> is the concentration of either infectious MNV or MNV RNA after treatment and C<sub>0</sub> before treatment in suspension.

#### **Statistical Analysis**

Data were entered into Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation) and analysed in StatEL 2.7 (Ad Science). Significant differences between groups were analysed by Kruskal-Wallis test. A p value of <0.05 was considered as significant.

### **RESULTS**

MNV production resulted in a viral stock of 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, with no free genome since no changes in the RT-qPCR signal were detected after RNase treatment. Different levels of heat and free chlorine were applied on MNV to monitor their effects on infectivity, genome persistence, capsid integrity and binding capacity to host cells. The conditions allowing preservation of the capsid integrity of inactivated MNVs were then selected to evaluate their impact on both global charge and hydrophobicity.

### Global effects of heat and free chlorine on MNV particles

MNV was exposed to various temperature conditions, from 45°C to 80°C, for 10 min (Fig. 1). As expected, infectivity decreased as temperature increased:  $-0.4 \pm 0.1 \log_{10}$  at 45°C,  $-1.1 \pm 0.2 \log_{10}$  at 50°C,  $-2.6 \pm 0.6 \log_{10}$  at 55°C and  $-5.6 \pm 0.3 \log_{10}$  at 60°C. Complete inactivation, above  $6 \log_{10}$ , was observed at 72°C and 80°C. The RT-qPCR signal slightly decreased for temperatures above 55°C:  $-0.5 \pm 0.3 \log_{10}$  at 60°C,  $-0.6 \pm 0.2 \log_{10}$  at 72°C and  $-0.4 \pm 0.2 \log_{10}$  at 80°C. Therefore, heat exposure did not involve an effective loss of the RT-qPCR signal since the decrease was not temperature dependent. Next, MNV capsid integrity was evaluated by performing RNase treatment after heat exposure. The efficiency of the RNase treatment was checked on extracted MNV RNA and a decrease of over  $3 \log_{10}$  was obtained. An increase in RNase sensitivity was then noticed only for MNV exposed to 72°C or 80°C with an additional genome decay of  $-1.5 \log_{10}$  for 72°C and  $-2.3 \log_{10}$  for 80°C, suggesting impairment of the capsid integrity. Only the three temperatures at which the capsid integrity was conserved (i.e. 50°C, 55°C, and 60°C) were kept for the binding assays to RAW 264.7 host cells. The binding capacity to RAW 264.7 cells decreased very slowly when temperature increased:  $-0.6 \pm 0.1 \log_{10}$  at 50°C,  $-0.8 \pm 0.3 \log_{10}$  at 55°C, and  $-1.0 \pm 0.1 \log_{10}$  at 60°C. Nevertheless, these results showed that the loss of infectivity was related at least to the loss of binding capacity to the host cells for 75% to 90% of the MNV particles (Wigginton et al., 2012).

For MNV exposed to free chlorine, inactivation rates of  $-1.6 \pm 0.4 \log_{10}$  for 20 mg/L and  $-4.2 \pm 0.8 \log_{10}$  for 50 mg/L were observed (Fig. 2). A decrease in the RT-qPCR signal was noted only for 50 mg/L, reaching  $-1.3 \pm 0.6 \log_{10}$ . An increase in RNase sensitivity ( $-1.1 \log_{10}$ ) was observed only with 50 mg/L. This suggested impairment of the capsid integrity by the highest concentration of free chlorine. Decreases in the binding capacity of  $-0.4 \pm 0.1 \log_{10}$  for 20 mg/L and  $-1.4 \pm 0.1 \log_{10}$  for 50 mg/L were observed, meaning that the loss of infectivity by chlorine was related at least to the loss of binding capacity to the host cells for 60% of the MNV particles (Wigginton et al., 2012).

### Effect of heat and free chlorine on the charge of MNV particles

Based on the results of a previous study (Brié et al. 2016) and on the concentration of our MNV suspension, the effect of heat and free chlorine on the global charge of MNV was estimated by adhesion to positively charged beads only. These beads allowed the global charge of infectious viruses (determined by TCID<sub>50</sub> assay) and that of total viruses (determined by RT-qPCR) to be evaluated separately. Experiments were done for one temperature condition (55°C for 10 min) and one concentration of free chlorine (20 mg/L) at which sufficient inactivation of around 1 log was reached, while keeping enough infectious particles to compare their surface properties to those of inactivated ones. Adhesion experiments were performed in triplicate in 50 mM PBS for different pH

levels (2.5, 3.0, 4.0 and 7.0) for native and treated MNVs. The profile of adhesion to the positively charged beads was compared between native viruses and heated (Fig. 3A) or chlorinated (Fig. 3B) viruses. For native viruses, slight adhesion was observed at pH 7.0, which increased at pH 4.0. No adhesion was observed at pH 3.0 and 2.5. For heated MNVs, greater adhesion was observed at pH 7.0 when compared to native MNVs ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test). No difference in the adhesion profile was observed between native MNVs and those exposed to free chlorine ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test). Overall, the IEP of native MNVs and MNVs exposed to heat or free chlorine was estimated to be between 3 and 4. Moreover, heat and free chlorine did not seem to affect the global charge of MNV.

### **Effect of heat and free chlorine on the hydrophobicity of MNV particles**

The effect of heat or free chlorine on the hydrophobicity of MNV was studied by binding assays to hydrophobic beads. The experiments were performed at pH 7 and higher ionic strength than that used for positively charged beads (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 150 mM NaCl) in order to maximize hydrophobic interactions. For native MNVs, no adhesion was observed on these beads for both total ( $-0.1 \pm 0.1 \log_{10}$ ) and infectious ( $-0.2 \pm 0.2 \log_{10}$ ) viruses (Fig. 4). The hydrophobicity of MNV particles was not affected by both concentrations of free chlorine, 20 mg/L and 50 mg/L (Data not shown). The binding capacity to hydrophobic beads was then evaluated for MNV exposed to 45°C, 50°C, 55°C and 60°C for 10 min (Fig. 4). Interestingly, subjecting MNV to 55°C highly increased the binding capacity to hydrophobic beads ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test). A temperature of 60°C for 10 min inactivated almost all viruses as described above, which exhibited a low level of hydrophobicity similar to that of native viruses. These inactivated viruses were then exposed again to 55°C for 10 min. Contrary to the results obtained with native particles, no increase in hydrophobicity was then observed suggesting that the capsid proteins of inactivated particles had reached an irreversible conformation when exposed to 60°C. We then investigated whether this low hydrophobic stable state was also reached by MNV remaining infectious after a 60°C heat treatment. In order to obtain a sufficient concentration of infectious MNV after such a heat treatment, it was performed for only 1 min instead of 10 min. A concentration of infectious MNVs of  $4.5 \times 10^5 \pm 2.7 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$  ( $n=3$ ) was obtained. The adhesion test performed immediately after this heat treatment resulted in no adhesion of infectious MNV particles onto hydrophobic beads showing that infectious as well as inactivated MNVs exhibited a low level of hydrophobicity after exposure to 60°C. These MNVs were then exposed to 55°C for 10 min and a second adhesion test on hydrophobic beads was done. An increase in adhesion corresponding to  $6 \times 10^5$  genome copies was noted; this value was equivalent to that of infectious particles. Moreover, a very low concentration of infectious MNVs ( $4.3 \pm 0.6 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ ) was detected in suspension at the end of the entire experiment confirming that all



infectious MNV particles had adsorbed onto hydrophobic beads. In conclusion, after 60°C heat treatment, infectious and inactivated MNVs exhibited a low hydrophobic state which was irreversible for inactivated particles only.

## **DISCUSSION**

MNV is increasingly used as a cultivable surrogate for human noroviruses in numerous areas such as evaluation of food processing technologies (Girard et al. 2016; Hirneisen and Kniel 2013; Predmore et al. 2015) and sanitization of contact surfaces (Park et al. 2015; Yeap et al. 2016). Heat and free chlorine are quite easy to apply in those contexts, but the distinction between inactivated viruses and those remaining infectious after such a kind of treatment is still challenging.

In that context, we aimed to determine if heat and free chlorine affect the surface properties of MNV particles and thus could allow methods based on surface properties to be developed for the specific detection of infectious MNV. Prior to any inactivation experiments, the surface properties of native MNV should be defined. The adhesion experiments performed with native MNV using positively-charged beads at different pH levels allowed approaching its IEP which may be estimated between 3 and 4. To our knowledge, only a theoretical IEP value of around 4.8 has previously been described for MNV considering the major capsid protein (Bolton et al. 2013). IEP values of around 4 have recently been described for VLPs (Virus-like particles) of human norovirus GI.1 and GII.4 and feline calicivirus (Samandougou et al. 2015). Few hydrophobic domains appeared to be expressed at the surface of native MNV as previously described for native poliovirus and MS2 phage through adhesion to liposomes or hydrophobic supports, respectively (Curry et al. 1996; Dika et al. 2013).

The first issue discussed here is the preservation of the virus structure under our conditions of inactivation by heat or free chlorine. Indeed, heat has previously been shown to disrupt viral particles for temperatures ranging from 60°C to 72°C (Ausar et al. 2006; Brié et al. 2016; Ruokola et al. 2014). RNase and transmission electronic microscopy were in agreement in determining the critical temperature leading to the disruption of the capsid of MS2 phage (Brié et al. 2016). In the present study RNase was the only relevant method, due the concentration of MNV in our working suspension. From our results, it appeared that the critical temperature for MNV leading, at least, to its sensitivity to RNase is strictly above 60°C and below or equal to 72°C. Exposure to 72°C led to genome accessibility to RNase for poliovirus and hepatitis A virus (Nuanualsuwan and Cliver 2002; Pecson et al. 2009), whereas 60°C was sufficient for feline calicivirus (Topping et al. 2009). Free chlorine has been shown to target both the viral capsid and the genome (Nuanualsuwan and Cliver 2003; Wigginton et al. 2012). Between the two concentrations of free chlorine, only the highest (50 mg/L) led to a decrease in the RT-qPCR signal of around 1 log<sub>10</sub> and to an additional 1-log<sub>10</sub> reduction

by RNase; these conditions resulted in a 4 log<sub>10</sub> reduction in the infectivity of MNV. Similarly, for MNV suspended in natural seawater, a more than 4 log<sub>10</sub> reduction in infectivity was obtained with 2.5 mg of free chlorine/L over 60 min; the subsequent use of RNase yielded genome copy numbers closer to those of infectious particles than to those of the genome copies obtained without enzymatic treatment (de Abreu Corrêa et al. 2012).

Thus, RNase could be used to reduce false positives of up to 2 log<sub>10</sub> of genome copies after heat exposure for temperatures strictly above 60°C. This enzyme may also be useful after free chlorine exposure, but its conditions of use need to be more clearly defined.

Under inactivation conditions that preserve the impermeability of the viral capsid to RNase, a decrease in the host cell binding capacity was observed when temperature or free chlorine concentration increased. However, no explicit correlation between inactivation and decrease in the host cell binding capacity was found for these two inactivation parameters. Previous studies have shown that heat-inactivated poliovirus, hepatitis A virus and MS2 phage lost their ability to attach to host cells after exposure to heat (Brié et al. 2016; Nuanualsuwan and Cliver 2003; Wigginton et al. 2012). Some studies have concluded that free chlorine did not alter the host cell binding capacity of poliovirus, adenovirus and MS2 phage (O'Brien and Newman 1979; Page et al. 2010; Wigginton et al. 2012), whereas another study has shown that all inactivated poliovirus and hepatitis A virus particles failed to attach to their host cells (Nuanualsuwan and Cliver 2003). For MS2 phage in particular, the inactivation by free chlorine has been related to a loss in injection and replication of its genome (Wigginton et al. 2012). The binding capacity to host cells did not appear to be relevant for the detection of infectious MNVs, especially for those exposed to free chlorine. Nevertheless, this functionality of the capsid was affected by heat and free chlorine, suggesting that changes in global charge or hydrophobicity could also occur.

Free chlorine seemed to have no effect on the global charge and hydrophobicity of MNV. The impact of free chlorine on the surface properties of viral particles remains poorly described. A previous study concluded only that free chlorine did not affect the IEP of poliovirus (O'Brien and Newman 1979). Heat seemed to impact the surface properties of MNV more deeply than free chlorine. Contradictory effects of heat on the global charge have been described for enteric viruses. Indeed, no change in the IEP has been observed for MS2 phage exposed to heat (Brié et al. 2016), whereas a drastic decrease in the IEP from 7.5 to 4.5 has been noted for poliovirus and related to a loss of the capsid protein VP4 (Breindl 1971; O'Brien and Newman 1979). The slight increase in adhesion capacity to positively charged beads at pH 7.0 observed for MNV heated at 55°C may be explained by the ionic strength applied during adhesion experiments which could favour the detection of hydrophobic domains

expressed after this heat treatment. Indeed, subjecting MNV to 55°C led to an increase in hydrophobicity for both infectious and inactivated viruses. Interestingly, MNVs exposed to 60°C showed a very low level of hydrophobicity, similar to that of native particles. For MS2 phage exposed to 60°C for 10 min, an increase in hydrophobicity was observed for remaining infectious phages only (Brié et al. 2016). A transient hydrophobic state has also been observed for poliovirus 1 exposed to heat (Fricks and Hogle 1990; Tuthill et al. 2010); nevertheless, these hydrophobic particles remained infectious only for Chinese Hamster Ovary and murine L cells which are not susceptible to infection by native poliovirus (Curry et al. 1996). More interestingly, the low hydrophobic state reached by MNVs after exposure to 60°C seemed to be irreversible for inactivated viruses only and may provide prospects for discriminating between infectious and inactivated viruses.

In light of our results, it appeared that above the critical temperature, which is probably around 72°C for MNV, treatment with RNase improved the specific detection of RNA from infectious MNV. For heat treatments performed below 60°C, the main effect on the surface properties of MNV was shown for hydrophobicity. Exposure to 55°C led to the expression of hydrophobic domains at the surface of MNV particles for both infectious and inactivated particles. No expression of hydrophobic domains was observed after exposure to 60°C, but this low hydrophobic state appeared to be irreversible for inactivated particles only. Indeed, we succeeded in increasing the hydrophobicity of MNV remaining infectious after a first exposure to 60°C by a second exposure to 55°C. Critical temperatures, permeability to RNase, and expression of hydrophobic domains should now be explored for pathogenic enteric viruses prior to their detection by molecular methods. Free chlorine did not seem to affect the surface properties of MNV, but the permeability to RNase and the decrease in host cell binding capacity suggested at least the weakening of the capsid structure. Thus, this oxidant may increase the efficiency of other inactivating treatments such as temperature.

### **Acknowledgements**

The results of this study were obtained within the scope of CapsiVir, a project coordinated by ACTALIA and funded by the “Conseil Régional de Basse Normandie”. This study, labeled by the competitiveness cluster VALORIAL, was also supported by the Joint Technical Unit ACTIA VIROcontrol and the “Syndicat des Fabricants des Produits Frais Prêts à l’Emploi” (cluster of ready-to-eat food industries: Florette, Bonduelle, Crudettes, and Rosée des Champs).

## References

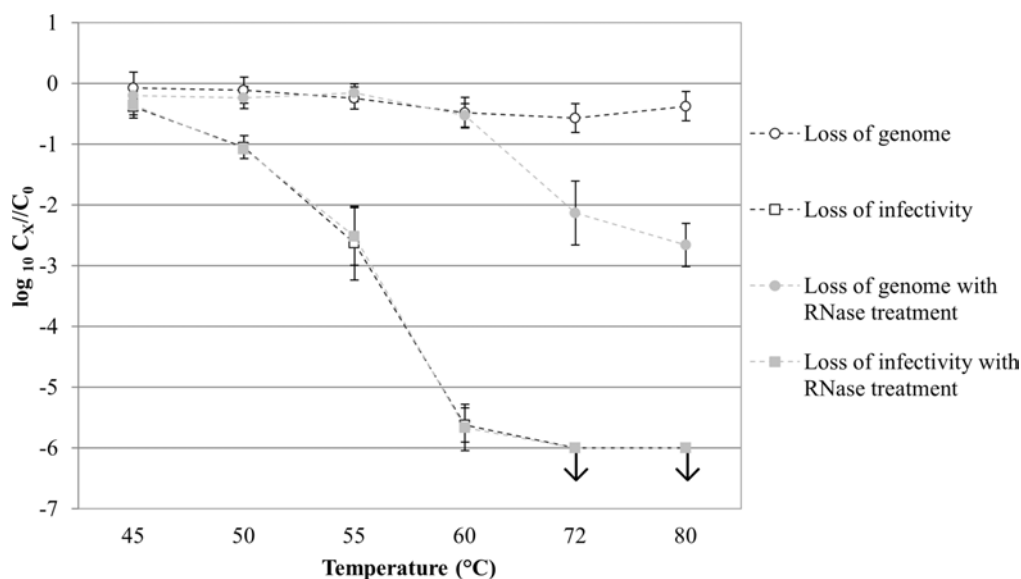
- Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S., & Middaugh, C. R. (2006). Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *The Journal of biological chemistry*, 281(28), 19478–88. doi:10.1074/jbc.M603313200
- Belliot, G., Lavaux, A., Souihel, D., Agnello, D., & Pothier, P. (2008). Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 3315–8. doi:10.1128/AEM.02148-07
- Belnap, D. M., Filman, D. J., Trus, B. L., Cheng, N., Booy, F. P., Conway, J. F., et al. (2000). Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *Journal of virology*, 74(3), 1342–54.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=111469&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bolton, S. L., Kotwal, G., Harrison, M. A., Law, S. E., Harrison, J. A., & Cannon, J. L. (2013). Sanitizer efficacy against murine norovirus, a surrogate for human norovirus, on stainless steel surfaces when using three application methods. *Applied and environmental microbiology*, 79(4), 1368–77. doi:10.1128/AEM.02843-12
- Breindl, M. (1971). The structure of heated poliovirus particles. *The Journal of general virology*, 11(3), 147–56. doi:10.1099/0022-1317-11-3-147
- 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
- Cromeans, T., Park, G. W., Costantini, V., Lee, D., Wang, Q., Farkas, T., et al. (2014). Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Applied and environmental microbiology*, 80(18), 5743–51. doi:10.1128/AEM.01532-14
- Curry, S., Chow, M., & Hogle, J. M. (1996). The poliovirus 135S particle is infectious. *Journal of virology*, 70(10), 7125–31.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=190765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.  
 Accessed 5 December 2014
- de Abreu Corrêa, A., Carratala, A., Barardi, C. R. M., Calvo, M., Girones, R., & Bofill-Mas, S. (2012). Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Applied and environmental microbiology*, 78(18), 6450–7. doi:10.1128/AEM.01059-12
- de Roda Husman, a M., Lodder, W. J., Rutjes, S. a, Schijven, J. F., & Teunis, P. F. M. (2009). Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwaters, using PCR and cell culture. *Applied and environmental microbiology*, 75(4), 1050–7. doi:10.1128/AEM.01750-08
- 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
- EFSA. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. 191p. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329

- Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., et al. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, 5211(August). doi:10.1126/science.aaf5211
- Fricks, C. E., & Hogle, J. M. (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *Journal of virology*, 64(5), 1934–45. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=249347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed 5 December 2014
- 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), 3965–9. doi:10.1128/AEM.69.7.3965
- Girard, M., Mattison, K., Fliss, I., & Jean, J. (2016). Efficacy of oxidizing disinfectants at inactivating murine norovirus on ready-to-eat foods. *International journal of food microbiology*, 219, 7–11. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.015
- Hall, A. J., Wikswa, M. E., Pringle, K., Gould, L. H., & Parashar, U. D. (2014). Vital signs: foodborne norovirus outbreaks - United States, 2009-2012. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 63(22), 491–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24898166>. Accessed 12 September 2014
- Hirneisen, K. A., & Kniel, K. E. (2013). Norovirus surrogate survival on spinach during preharvest growth. *Phytopathology*, 103(4), 389–94. doi:10.1094/PHYTO-09-12-0231-FI
- Hwang, S., Alhatlani, B., Arias, A., Caddy, S. L., Christodoulou, C., Cunha, J. B., et al. (2015). Murine norovirus: propagation, quantification, and genetic manipulation. *Current protocols in microbiology*, 33(2), 15K.2.1-61. doi:10.1002/9780471729259.mc15k02s33
- ISO. (1985). ISO 7393-2. Water quality: Determination of free chlorine and total chlorine. Part 2: Colorimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes.
- ISO. (2013). ISO/TS 15216-1: Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification.
- Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., de Graaf, M., Freiden, P., et al. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nature protocols*, 10(12), 1939–47. doi:10.1038/nprot.2015.121
- Karber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162(4), 480–483. doi:10.1007/BF01863914
- Karst, S. M., & Wobus, C. E. (2015). A Working Model of How Noroviruses Infect the Intestine. *PLOS Pathogens*, 11, e1004626. doi:10.1371/journal.ppat.1004626
- Knight, A., Haines, J., Stals, A., Li, D., Uyttendaele, M., Knight, A., & Jaykus, L.-A. (2016). A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *International journal of food microbiology*, 216, 40–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.015
- Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L., & Chao, F. H. (2002). Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 4951–5. doi:10.1128/AEM.68.10.4951

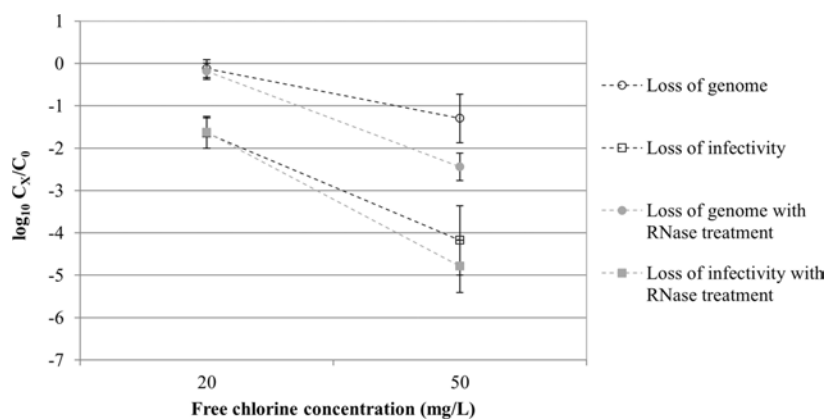
- Lim, M. Y., Kim, J.-M., & Ko, G. (2010). Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water research*, 44(10), 3243–51. doi:10.1016/j.watres.2010.03.003
- Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2002). Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of virological methods*, 104(2), 217–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088831>
- Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2003). Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 350–7. doi:10.1128/AEM.69.1.350
- O'Brien, R. T., & Newman, J. (1979). Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(6), 1034–1039. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=291240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Page, M. a, Shisler, J. L., & Mariñas, B. J. (2010). Mechanistic aspects of adenovirus serotype 2 inactivation with free chlorine. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 2946–54. doi:10.1128/AEM.02267-09
- Park, S. Y., Kim, A.-N., Lee, K.-H., & Ha, S.-D. (2015). Ultraviolet-C efficacy against a norovirus surrogate and hepatitis A virus on a stainless steel surface. *International journal of food microbiology*, 211, 73–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.006
- Pecson, B. M., Martin, L. V., & Kohn, T. (2009). Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Applied and environmental microbiology*, 75(17), 5544–54. doi:10.1128/AEM.00425-09
- Predmore, A., Sanglay, G., Li, J., & Lee, K. (2015). Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiology*, 50, 118–125. doi:10.1016/j.fm.2015.04.004
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F. S., Joyeux, M., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2016). Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water research*, 91, 68–76. doi:10.1016/j.watres.2015.12.049
- Richards, G. P. (2012). Critical Review of Norovirus Surrogates in Food Safety Research : Rationale for Considering Volunteer Studies, 6–13. doi:10.1007/s12560-011-9072-7
- Ruokola, P., Dadu, E., Kazmertsuk, A., Häkkänen, H., Marjomäki, V., & Ihalainen, J. a. (2014). Raman spectroscopic signatures of echovirus 1 uncoating. *Journal of virology*, 88(15), 8504–13. doi:10.1128/JVI.03398-13
- Samandougou, I., Fliss, I., & Jean, J. (2015). Zeta Potential and Aggregation of Virus-Like Particle of Human Norovirus and Feline Calicivirus Under Different Physicochemical Conditions. *Food and environmental virology*, 7(3), 249–60. doi:10.1007/s12560-015-9198-0
- Sano, D., Ohta, T., Nakamura, A., Nakagomi, T., Nakagomi, O., & Okabe, S. (2015). Culture-independent evaluation of non-enveloped virus infectivity reduced by free chlorine disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), AEM.03802-14. doi:10.1128/AEM.03802-14
- Sano, D., Pintó, R. M., Omura, T., & Bosch, A. (2010). Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environmental science & technology*, 44(2), 808–12. doi:10.1021/es9018964

- Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., et al. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and environmental microbiology*, 77(19), 6884–8. doi:10.1128/AEM.05806-11
- Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Pecson, B. M., Wigginton, K. R., & Kohn, T. (2013). Subtle differences in virus composition affect disinfection kinetics and mechanisms. *Applied and environmental microbiology*, 79(11), 3455–67. doi:10.1128/AEM.00663-13
- Tojo, K., Sano, D., Miura, T., Nakagomi, T., Nakagomi, O., & Okabe, S. (2013). A new approach for evaluating the infectivity of noncultivable enteric viruses without cell culture. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 67(10), 2236–40. doi:10.2166/wst.2013.114
- Topping, J. R., Schnerr, H., Haines, J., Scott, M., Carter, M. J., Willcocks, M. M., et al. (2009). Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity. *Journal of virological methods*, 156(1–2), 89–95. doi:10.1016/j.jviromet.2008.10.024
- Tuthill, T. J., Gropelli, E., Hogle, J. M., & Rowlands, D. J. (2010). Picornaviruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 343, 43–89. doi:10.1007/82\_2010\_37
- Verhoef, L., Hewitt, J., Barclay, L., Ahmed, S. M., Lake, R., Hall, A. J., et al. (2015). Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999-2012. *Emerging infectious diseases*, 21(4), 592–9. doi:10.3201/eid2104.141073
- Wang, Q., & Kniel, K. E. (2016). Survival and Transfer of Murine Norovirus within a Hydroponic System during Kale and Mustard Microgreen Harvesting. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 705–713. doi:10.1128/AEM.02990-15
- Wigginton, K. R., & Kohn, T. (2012). Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. *Current opinion in virology*, 2(1), 84–9. doi:10.1016/j.coviro.2011.11.003
- Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Bosshard, F., Kohn, T., & Sigstam, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental science & technology*, 46(21), 12069–78. doi:10.1021/es3029473
- Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., et al. (2004). Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS biology*, 2(12), e432. doi:10.1371/journal.pbio.0020432
- Yeap, J. W., Kaur, S., Lou, F., Dicaprio, E., Morgan, M., & Linton, R. (2016). Inactivation Kinetics and Mechanism of a Human Norovirus Surrogate on Stainless Steel Coupons via Chlorine Dioxide Gas. *Applied and environmental microbiology*, 82(1), 116–123. doi:10.1128/AEM.02489-15.Editor

FIGURE LEGENDS

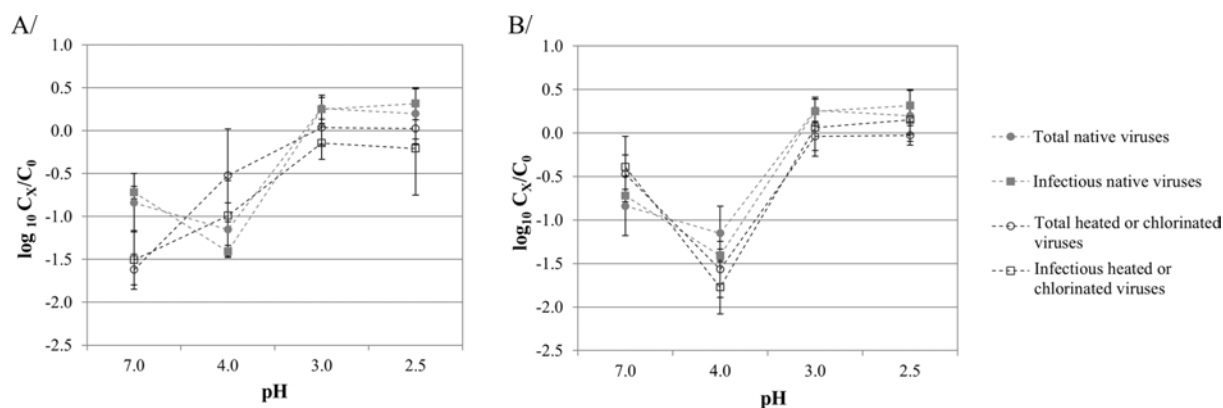


**Fig. 1** Decay of MNV concentration [ $\log_{10} (C_x/C_0)$ ] after exposure to different temperatures for 10 min as determined by RT-qPCR (circle forms) and TCID (square forms) assays without (empty forms) or with (full forms) RNase treatment. The dotted lines are only guides to the eye. In the molecular assay, decay was calculated using the threshold cycle (CT) values and the slope of the standard curve:  $\log_{10} (C_x/C_0) = (CT_0 - CT_x) / \text{slope}$ . Three independent experiments were performed for each point (n=3). Error bars indicate standard deviations. ↓, below the detection limit;  $C_x$ , concentration after inactivation;  $C_0$ , initial concentration

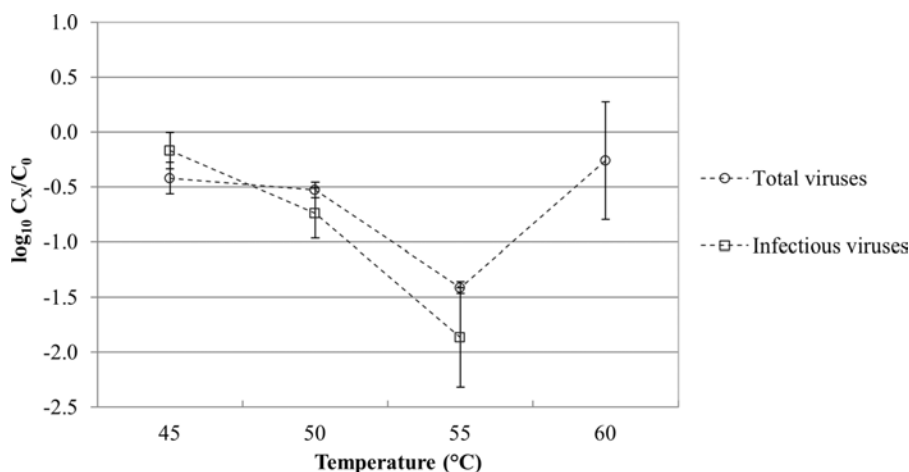


**Fig. 2** Decay of MNV concentration [ $\log_{10} (C_x/C_0)$ ] after exposure to 20 and 50 mg free chlorine/L for 15 min at 4°C as determined by RT-qPCR (circle forms) and TCID<sub>50</sub> (square forms) assays without (empty forms) or with (full forms) RNase treatment. The dotted lines are only guides to the eye. In the molecular assay, decay was calculated using the threshold cycle (CT) values and the slope of the standard curve:  $\log_{10} (C_x/C_0) = (CT_0 - CT_x) / \text{slope}$ . Three independent experiments were performed for each point (n=3). Error bars indicate standard deviations.  $C_x$ , concentration after inactivation;  $C_0$ , initial concentration





**Fig. 3** Binding assay to positively-charged beads of MNV [ $\log_{10} (C_x/C_0)$ ] in 50 mM PBS in the case of (A) heated viruses (empty forms) at 55°C for 10 min, and (B) chlorinated viruses (empty forms) at 20 mg/L for 15 min at 4°C. Native viruses (full forms) were used as reference in both cases. The circle forms and the square forms represent the total viruses detected by RT-qPCR and the infectious viruses detected by TCID<sub>50</sub> assay, respectively. The dotted lines are only guides to the eye. In the molecular assay, binding was calculated using the threshold cycle (CT) values and the slope of the standard curve:  $\log_{10} (C_x/C_0) = (CT_0 - CT_x) / \text{slope}$ . Three independent experiments were done for each point (n=3). Error bars indicate standard deviations.  $C_x$ , concentration after the binding assay;  $C_0$ , initial concentration



**Fig. 4** Binding of heated MNV (from 45°C to 60°C for 10 min) [ $\log_{10} (C_x/C_0)$ ] to hydrophobic beads at pH 7 in 10 mM PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> with 150 mM NaCl). The circle forms and the square forms represent the total phages detected by RT-qPCR and the infectious phages detected by plaque assay, respectively. At 60°C, no infectious viruses were present. The dotted lines are only guides to the eye. In the molecular assay, binding was calculated using the threshold cycle (CT) values and the slope of the standard curve:  $\log_{10} (C_x/C_0) = (CT_0 - CT_x) / \text{slope}$ . Three independent experiments were done for each point (n=3). Error bars indicate standard deviations.  $C_x$ , concentration after the binding assay;  $C_0$ , initial concentration

---

### III. Inactivation et évolution des propriétés de surface du bactériophage MS2 lors de traitements par chloration seule ou par chloration suivie de la chaleur

**Contexte :**

D'après nos deux précédentes études, l'exposition à la chaleur entraîne une augmentation de l'hydrophobie du bactériophage MS2. Concernant l'hypochlorite de sodium, aucune modification des propriétés de surface n'a été observée pour le MNV. Cet agent oxydant est connu pour entraîner des dommages au niveau du génome viral avec des sensibilités variables des différentes régions du génome. Toutefois, cet agent oxydant pourrait entraîner une fragilisation de la capsidie protéique accentuant les effets d'autres agents inactivants tels que la chaleur.

**Objectifs :**

Cette étude vise tout d'abord à étudier les effets de l'hypochlorite de sodium sur le bactériophage MS2 et plus précisément sur son caractère infectieux, l'intégrité de sa capsidie et ses propriétés de surface. En fonction des résultats obtenus, des expérimentations visant à associer l'hypochlorite de sodium à un autre traitement inactivant seront envisagées.

**Méthodes :**

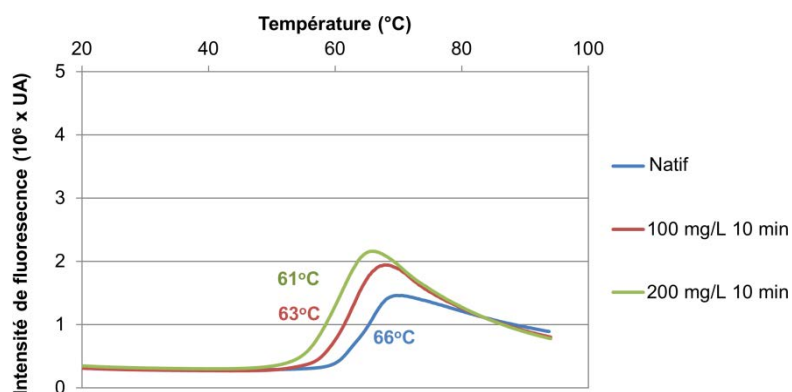
De la même manière que précédemment, la quantification du nombre de particules est réalisée par culture pour les infectieuses et par RT-qPCR pour les totales (infectieuses et non-infectieuses). L'intégrité physique des particules virales est évaluée par leur morphologie (MET), la mesure de la taille (DLS) et l'accessibilité du génome à la RNase. Les modifications conformationnelles concernent la reconnaissance au récepteur cellulaire (adhésion sur cellule hôte), la charge (mobilité électrophorétique, adhésion sur supports chargés) et l'hydrophobie (adhésion sur supports hydrophobes et fixation de la sonde SYPRO spécifique des domaines hydrophobes).

**Résultats :**

Deux concentrations d'hypochlorite de sodium (100 mg/L et 200 mg/L) avec un temps d'exposition identique (10 minutes) à 4°C ont été utilisées. Ces deux concentrations d'hypochlorite de sodium ne modifient ni la morphologie ni la taille des bactériophages MS2. La capacité d'adhésion à *E. coli* ne diminue que faiblement dans les deux cas. De plus, aucune dégradation du génome avec ou sans l'utilisation de la RNase n'a été observée après ces deux concentrations d'hypochlorite de sodium.

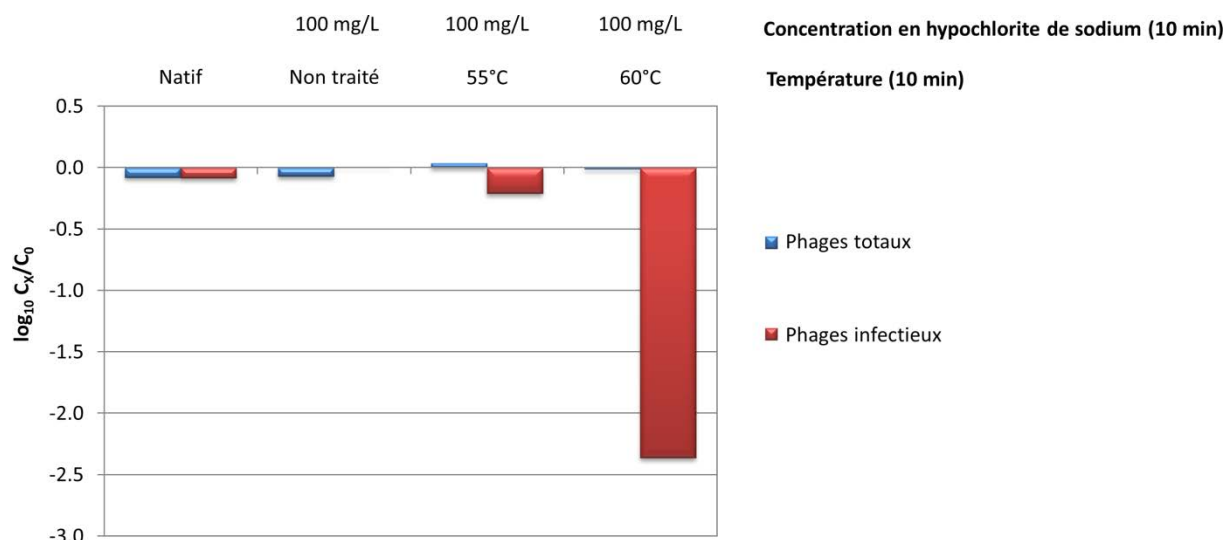
Les éventuelles modifications des propriétés de surface ont été évaluées par nos différentes méthodes. La chloration augmente la charge négative globale du phage MS2. Par contre, l'hydrophobie du phage MS2 n'est pas modifiée suite à l'exposition à ces deux concentrations en

hypochlorite de sodium. L'utilisation de la sonde SYPRO a néanmoins apporté des informations intéressantes avec une diminution du  $T_m$  de 66°C à 63°C et 61°C après exposition à 100 mg/L et 200 mg/L d'hypochlorite de sodium respectivement (**Figure 32**). Cette diminution du  $T_m$  suggère une fragilisation de la capsid et nous a amené à étudier les effets de l'hypochlorite de sodium suivi de la chaleur sur le bactériophage MS2.



**Figure 32. Evaluation de l'hydrophobie des bactériophages natifs ou chlorés par profils SYPRO.**

Les conséquences d'une exposition à l'hypochlorite de sodium (100 mg/L) puis à la chaleur (55°C ou 60°C pendant 10 minutes) ont alors été étudiées. La préservation de la morphologie du phage, examinée par MET, est confirmée pour ces deux conditions. Un effet synergique sur l'hydrophobie du phage MS2 est également noté avec la sonde SYPRO et les billes hydrophobes. La sonde SYPRO montre une augmentation du nombre de domaines hydrophobes après exposition aux deux températures. Par contre, les billes hydrophobes ne mettent en évidence une augmentation de l'hydrophobie que pour l'association hypochlorite de sodium puis 60°C. De façon intéressante et en accord avec les précédents résultats obtenus avec le phage MS2, cette augmentation de l'hydrophobie n'est observée que pour les phages ayant conservé leur caractère infectieux (**Figure 33**).



**Figure 33. Conséquences de l’hypochlorite de sodium et de la chaleur sur l’hydrophobie du bactériophage MS2.**

**Conclusion :**

L’hypochlorite de sodium est un agent oxydant qui entraîne une augmentation de la charge globale négative du bactériophage MS2. Aucun effet sur l’hydrophobie du phage n’a été constaté, mais une fragilisation de la capsid est suggérée par les expérimentations avec la sonde SYPRO. Ceci nous a amené à tester les effets de l’hypochlorite de sodium suivi par la chaleur. Un effet synergique a alors été noté sur l’inactivation, la sensibilité à la RNase et l’hydrophobie. De façon intéressante, l’augmentation de l’hydrophobie n’est observée que pour les particules ayant conservé leur caractère infectieux.

Article soumis dans *Food Control* le 20/10/2016

**Synergistic Effect of Free Chlorine and Heat on the Inactivation and Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2**

Adrien Brié<sup>1,2,3</sup>, Christophe Gantzer<sup>1,2</sup>, Nicolas Boudaud<sup>3</sup>, Isabelle Bertrand<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement), Faculté de Pharmacie, UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine, 5 Rue Albert Lebrun, Nancy 54000, France*

<sup>2</sup>*CNRS LCPME UMR 7564, Institut Jean Barriol, Nancy, France*

<sup>3</sup>*Food Safety Department, ACTALIA, Saint Lô, France.*

\*Corresponding author: Isabelle Bertrand, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Albert Lebrun, Nancy F-54000, France.

E-mail: [isabelle.bertrand@univ-lorraine.fr](mailto:isabelle.bertrand@univ-lorraine.fr)

**Abstract**

Heat and free chlorine are the most commonly used sanitizers and processes in the water and food industries. Although their virucidal effect has been widely described in water and food products, their inactivation mechanisms are poorly understood, especially for free chlorine. Both treatments have been described to affect, at least, the viral capsid and thus may affect the surface properties (i.e. electrostatic charge and hydrophobicity) of such particles. In that context, we aimed to evaluate the effect of chlorination used alone or followed by a heat treatment on MS2 phages used as surrogates for pathogenic enteric viruses such as human noroviruses and hepatitis A virus. Free chlorine was applied at concentrations of 100 mg/L or 200 mg/L and heat treatment was performed at 55 °C or 60 °C. Only the negative electrostatic charge seemed to be altered by chlorination. More interestingly, a free chlorine-induced weakening of the capsid was suggested by the hydrophobicity profiles obtained using differential scanning fluorimetry. This observation was confirmed when chlorination was followed by heat treatment. Synergistic effects were then observed on the inactivation of MS2 phages, the sensitivity of their genome to RNases and the increase in hydrophobicity of remaining infectious particles. Such synergistic effects could contribute to both the specific detection of infectious particles and the improvement of virucidal processes.

Keywords: Free chlorine; Heat; Virus; Surface properties; Hydrophobicity.

**Highlights:**

- Free chlorine increased the negative charge of MS2 phage and weakened its capsid.
- Synergistic effect of chlorine and heat on the loss of infectivity of MS2 phage.
- Increase in hydrophobicity of infectious phages after chlorine and heat treatments.

**1. Introduction**

The detection of pathogenic enteric viruses such as human noroviruses and hepatitis A virus in water and food is currently performed with molecular methods. This should be reinforced by a recently standardized protocol (ISO/TS 15216 standard, 2013) based on RT-PCR although the interpretation of positive results in viral genomes remains difficult in terms of human health risk. Indeed, numerous studies have observed a greater persistence of the viral genome, even for RNA, than that of the corresponding infectious particle (de Roda Husman, Lodder, Rutjes, Schijven, & Teunis, 2009; Gassilloud, Schwartzbrod, & Gantzer, 2003; Prevost et al., 2016; Seitz et al., 2011). The cell culture methods recently proposed for human noroviruses (Ettayebi et al., 2016; Jones et al., 2015) are far from being usable on a routine basis and should not limit the increasing use of molecular analyses in food and environmental virology. Various methods allowing infectious viral particles to be specifically selected prior to molecular analysis have already been proposed. Most of them target capsid damage and are based on an increased permeability to enzymes or intercalating dyes such as RNases, ethidium monoazide (EMA) or propidium monoazide (PMA) (Prevost et al., 2016; Randazzo, López-Gálvez, Allende, Aznar, & Sánchez, 2016) or on the specific detection of oxidative damage (Sano et al., 2015; Sano, Pintó, Omura, & Bosch, 2010; Tojo et al., 2013). The functionalities of the capsid such as the binding capacity to host may also be impaired during virus inactivation, but the detection of such damages requires prior identification of permissive cell lines or at least of virus receptors. Free chlorine and heat are among the most cost-effective and easy-to-apply processes and sanitizers in the food and water industries. However, their mechanisms of inactivation of enteric viruses remain poorly understood.

Free chlorine is widely used in food and water treatment applications for its broad-spectrum antimicrobial activity (Hirneisen et al., 2010; Meireles, Giaouris, & Sim, 2016). It has proved effective against viruses either in water (Abad, Pintó, Diez, & Bosch, 1994; Cromeans, Kahler, & Hill, 2010; Engelbrecht, Weber, Salter, & Schmidt, 1980; Sobsey, Fuji, & Shields, 1988) or on fruit and vegetables (Baert, Debevere, & Uyttendaele, 2009; Butot, Putallaz, & Sánchez, 2008; Fraisse et al., 2011; Girard, Mattison, Fliss, & Jean, 2016). This oxidant has been described to alter the capsid (Nuanualsuwan & Cliver, 2003), the genome (O'Brien & Newman, 1979) and more recently both components of enteric viruses (Wigginton et al., 2012). The binding capacity to host cells does not seem to be altered by free chlorine for MS2 phage and adenovirus (Page et al., 2010; Wigginton et al., 2012). To our knowledge, no modification of the electrostatic charge or hydrophobicity has previously

been described for enteric viruses exposed to free chlorine. Nonetheless, the reaction of free chlorine with amino acids leads to the formation of numerous products such as carbonyl groups resulting from the oxidization of lysine, arginine, threonine and proline. A relationship between the number of carbonyl groups and the rate of free chlorine-induced inactivation has been reported for enteric viruses belonging to *Astroviridae*, *Reoviridae*, *Caliciviridae* and *Picornaviridae* (Sano et al., 2015; Sano, Pintó, Omura, & Bosch, 2010; Tojo et al., 2013). Oxidization of amino acids by chlorine could thus result in modification of the electrostatic charge of viral particles.

Inactivation of enteric viruses by heat has been widely evaluated in food and environmental matrices in which it is considered as one of the main inactivating factors (Bertrand et al., 2012; Hirneisen et al., 2010). Heat induces structural and conformational changes of the capsid proteins leading to at least inactivation through alteration of the binding capacity to host cells, modification of surface properties and increase in the permeability to enzymes and intercalating dyes (Breindl, 1971; Brié, Bertrand, Meo, Boudaud, & Gantzer, 2016; Nuanualsuwan & Cliver, 2003; Pecson, Martin, & Kohn, 2009; Wigginton et al., 2012). Among surface properties, hydrophobicity seemed to be the parameter mostly affected by heat treatment. Indeed, an increase in hydrophobicity has been observed for poliovirus exposed to 50 °C, which has been linked to the externalization of the N-terminal region of viral protein VP1 (Curry, Chow, & Hogle, 1996; Fricks & Hogle, 1990). The expression of hydrophobic domains has also been reported for MS2 phages exposed to heat but for remaining infectious particles only (Brié et al., 2016). Heat-induced modification of the electrostatic charge is less obvious. Indeed, a decrease in the isoelectric point (IEP) has been observed for poliovirus heated at 56 °C and linked to the loss of viral RNA genome and capsid protein VP-4 (Breindl, 1971; O'Brien & Newman, 1979). Only a slight decrease in the global negative charge has been reported for MS2 phages after exposure to 60 °C (Brié et al., 2016).

Both free chlorine and heat have been shown to act on the capsid. It might therefore be expected that their combination would increase their respective effects. The present work aimed first to assess the modifications of the surface properties induced by free chlorine applied alone on MS2 phage because they are poorly described. The changes in the physicochemical properties of the phage, especially its hydrophobicity, caused by free chlorine followed by heat were then evaluated. All these experiments were performed on MS2 phage used as a surrogate for noroviruses and hepatitis A virus. This phage exhibits numerous similarities with these major pathogenic viruses in food and environmental virology in terms of size (22 - 29 nm), genome (positive-sense single stranded RNA) and overall structure of the capsid (Bae & Schwab, 2008; Beck et al., 2015; Boudaud et al., 2012; Bozkurt, D'Souza, & Davidson, 2015; Deboosere et al., 2012; Shirasaki, Matsushita, Matsui, Urasaki, & Ohno, 2009; Sidhu & Toze, 2009; Valegård, Liljas, Fridborg, & Unge, 1990). This easily cultured F-specific RNA phage, which is non-pathogenic in humans, can be produced in high concentrations, an essential prerequisite for some experimental methods such as electron microscopy or electrophoretic mobility. The first objective was to evaluate the effects of two different concentrations of free chlorine on infectivity,

host cell binding capacity, genome stability and capsid permeability to RNase. RNase treatment was used to demonstrate the presence of non-infectious viruses still possessing a genome protected by the capsid. The global electrostatic charge and hydrophobicity of MS2 phages were then monitored. The results obtained when chlorination was applied alone led us to perform further experiments in which heat treatment was applied to MS2 phages exposed to chlorine.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Production and Purification of MS2 phages

Replication of MS2 phage (ATCC, 15597-B1) was done according to the standard procedure (ISO 10705-1, 1995) without the  $\text{CHCl}_3$  lysis step, using *Escherichia coli* Hfr K12 (ATCC, 23631) as host cells. The produced phages were concentrated and purified using iodixanol density gradient followed by dialysis as previously described (Brié et al., 2016). The working suspensions were kept at 4°C before use.

### 2.2. Infectivity Assay

Infectious MS2 phages were enumerated by the plaque assay method using the double-agar-layer technique according to the ISO procedure 10705-1 (ISO, 1995). Infective MS2 phage concentrations were measured as the number of plaque-forming unit per mL (PFU/mL). The final concentration of purified MS2 phages was  $\approx 10^{14}$  PFU/mL.

### 2.3. Viral Genome Extraction and Quantification

Extractions of viral RNA (50  $\mu\text{L}$ ) were performed using the QIAamp viral RNA kit (Qiagen, 52906) according to the manufacturer's recommendations. The extracts (100  $\mu\text{L}$ ) were immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  before quantification. Reverse transcription and quantitative PCR were performed as previously described by Ogorzaly and Gantzer (2006). Two negative controls and one positive control (i.e. known quantity of phages) were added to each experiment. RT-qPCR efficiency ranged from 80% to 95%. Determination of MS2 genome copies per mL (gc/mL) used for the standard curve was performed using an MS2 extract (Brié et al., 2016). The final concentration of purified MS2 phages was  $\approx 10^{15}$  gc/mL.

### 2.4. Free Chlorine and Heat Treatments

Purified phages at a concentration of 1014 PFU/mL (250  $\mu\text{L}$  in 1 mM PBS solution with 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 14 mM NaCl) were exposed either to free chlorine alone or to free chlorine followed by heat. To prepare our free chlorine stock solution, concentrated sodium hypochlorite solution (5%, Acros, 419550250) was diluted using ultrapure water ( $> 18 \text{ M}\Omega/\text{cm}$ ). Determination of free chlorine concentration was performed according to the DPD (N,N-diethyl-p-phenylenediamine, Acros, 407390250) colourimetric method (ISO 7393-2 1985). The working concentrations of free chlorine were 100 mg/L and 200 mg/L with a contact time of 10 min at 4°C. Residual free chlorine was immediately quenched by adding two moles of sodium thiosulfate equivalent to one mole of free chlorine. The 55 °C or 60 °C heat treatments were applied for 10 min in prewarmed Protein LoBind tubes (Eppendorf, 0030108132) in a water bath. Samples were immediately placed on ice after heat treatment to avoid further inactivation.



### 2.5. RNase Assay

Suspensions of MS2 phage, with a final concentration of  $10^7$  gc/mL, were treated with RNase A (final concentration of 1  $\mu$ g/mL, AppliChem, A3832) at 37 °C for 60 min as previously described (Brié et al., 2016).

### 2.6. Transmission Electron Microscopy (TEM)

The samples were adsorbed onto grids and negatively stained for 1 min with 2% phosphotungstic acid at pH 7.4 previously filtered with a 0.22  $\mu$ m membrane filter. The examination was carried out using a Philips CM200 transmission electron microscope operating at 200 kV and with a  $\times 38,000$  magnification.

### 2.7. Binding of MS2 Phages to *E. coli*

Binding assays of MS2 phage to *E. coli* Hfr K12 were performed as previously described (Brié et al., 2016; Wigginton et al., 2012).

### 2.8. Size and Electrophoretic Mobility Measurements

Size and electrophoretic mobility ( $\mu$ ) measurements were achieved in disposable capillary cells (Malvern Instruments, DTS1070) at 23 °C  $\pm$  0.1 °C using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, He-Ne red laser, wavelength 633 nm). Experiments were driven by Dispersion Technology Software (Malvern Instruments) as previously described (Brié et al., 2016; Dika, Duval, Ly-Chatain, Merlin, & Gantzer, 2011).

### 2.9. Binding of MS2 Phages to Hydrophobic or Positively Charged Beads

Magnetic beads were used in these experiments: hydrophobic beads were coated with polystyrene (PolySciences, 19133) and positively charged beads were BcMag PSA (Bioclone, FM-105). The positively charged beads exhibited a pKa of  $\approx$  10. The binding experiments were performed as previously described (Brié et al., 2016).

### 2.10. Differential Scanning Fluorimetry

Differential scanning fluorimetry (DSF) was performed as previously described (Brié et al., 2016) using the fluorescent dye SYPRO Orange, 5,000  $\times$  concentrate, supplied in DMSO (Thermo Fisher Scientific, S6650). The sum of the fluorescence intensities obtained with all filters was plotted against temperature to obtain the maximum fluorescence intensity of SYPRO Orange. Denaturation temperature ( $T_m$ ) was determined by plotting the first derivative of the previous curve (it appeared then as a peak) (Loison, Majou, Gelhaye, Boudaud, & Gantzer, 2016).

### 2.11. Statistical Analysis

Significant differences between groups were analysed by the Kruskal-Wallis or Mann-Whitney test (Ad Science, StatEL 2.7). A p value of  $<0.01$  was considered as significant.

## 3. Results

### 3.1. Effects of Free Chlorine on MS2 Phage

The effects of free chlorine on the infectivity and structure of MS2 phage were evaluated for 100 mg/L and 200 mg/L for 10 min at 4 °C (Table 1). Infectivity decreased by  $-1.2 \pm 0.3 \log_{10}$  for 100 mg/L and

by  $-3.5 \pm 0.9 \log_{10}$  for 200 mg/L. The RT-qPCR signal was not affected for 100 mg/L and decreased only by  $-0.5 \log_{10}$  for 200 mg/L. No modification of the shape of MS2 phage was observed by TEM for these two concentrations of free chlorine. The mean size of MS2 phage did not change after free chlorine exposure with  $20 \pm 2$  and  $21 \pm 1$  nm for 100 and 200 mg/L, respectively, which was similar to that of native phages not submitted to oxidative treatments (Dika et al. 2013; Valegård et al. 1990). Capsid integrity was confirmed by the limited effect of the RNase treatment on the RT-qPCR signal which decreased by less than  $-0.3 \log_{10}$  with both concentrations of free chlorine suggesting that no capsid disruption occurred under our conditions. The binding capacity of MS2 phage to *E. coli* K12 Hfr was not altered after exposure to 100 mg/L ( $-0.1 \pm 0.1 \log_{10}$ ) whereas it decreased by  $-0.8 \pm 0.1 \log_{10}$  after exposure to 200 mg/L.

The effect of free chlorine on the global charge of MS2 phage was then evaluated by electrophoretic mobility ( $\mu$ ) as a function of ionic strength at pH 7.0 only and by its adhesion capacity to positively charged beads at different pHs. Electrophoretic mobility as a function of ionic strength (Fig. 1a) appeared to be different between native MS2 phages and those exposed to free chlorine at ionic strengths of 1.95 and 19.5 mM ( $p < 0.01$ , Kruskal-Wallis test). No difference was observed between native MS2 phages and those exposed to chlorine at an ionic strength of 195 mM ( $p > 0.01$ , Kruskal-Wallis test). Therefore, a lower slope value was observed for chlorinated phages than for native phages suggesting a slight decrease in the negative charge density of MS2 phage after exposure to free chlorine. On a qualitative level, it meant that free chlorine could change the negative charge density of MS2 phage particles by increasing their external negative charge and/or by decreasing their internal negative charge (Langlet et al., 2008). The binding capacity of total phages (i.e. RT-qPCR results) to positively charged beads was then compared between native and chlorinated phage for different pH values (i.e. 7.0, 4.0, 3.0 and 2.5) (Fig. 1b). As previously observed (Brié et al., 2016), the lowest adhesion capacity of both native and chlorinated phages on positively charged beads was obtained at pH 2.5 to 3.0 which are below the IEP of MS2 phage. Conversely, the highest adhesion capacity was obtained at pH above the IEP (i.e. 4.0 and 7.0). These results are in accordance with previous estimation of the IEP of MS2 phage to be between 3 and 4 (Langlet et al., 2008). Interestingly, an increase in the adhesion capacity to positively charged beads was observed for MS2 phages exposed to both concentrations of free chlorine in comparison with native phages ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test). This increase in the negative global charge of MS2 phage after exposure to free chlorine may correspond mainly to an increase in the external negative charge.

The effect of free chlorine on the hydrophobicity of MS2 phage was then evaluated by DSF and by its adhesion capacity to hydrophobic beads. DSF method has previously shown its capacity to measure the temperature at which proteins unfold (Niesen, Berglund, & Vedadi, 2007; Subba-Reddy, Yunus, Goodfellow, & Kao, 2012; Walter et al., 2012). In our study, SYPRO Orange dye was selected for its specific affinity for the hydrophobic regions of the proteins. The DSF profile (i.e. fluorescence as a function of temperature) allowed the melting temperature ( $T_m$ ) of the MS2 phage particles to be

determined. As previously observed for native MS2 phage (Brié et al., 2016), the  $T_m$  was estimated to be around 66 °C (Fig. 2). After exposure to 100 mg/L and 200 mg/L of free chlorine for 10 min, a dose-response effect was observed with a decrease in  $T_m$  value to 63 °C and 61 °C, respectively, suggesting a weakened capsid (Robinson, Jesudhasan, & Pfeiffer, 2014). The initial fluorescence of the DSF profiles of phages exposed to free chlorine was very low and similar to that of native phages meaning that free chlorine did not modify the overall expression of hydrophobic domains of the capsid proteins. The expression of hydrophobic domains on the surface of MS2 particles was then compared between native phages and those exposed to free chlorine using the adhesion ability to hydrophobic beads. The experiments were performed at pH 7 and high ionic strength (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 150 mM NaCl) in order to minimize the influence of the global charge. No adhesion to hydrophobic beads was observed for native phages and those exposed to 100 mg/L (Fig. 4) and 200 mg/L (data not shown) of free chlorine. For native phages, this observation was in agreement with previous studies (Brié et al., 2016; Dika, Ly-Chatain, Francius, Duval, & Gantzer, 2013) showing that few hydrophobic domains were expressed on the surface of native MS2 particles. The results obtained using these two methods suggested that free chlorine did not change the expression of hydrophobic domains of the MS2 capsid proteins.

To summarize, the exposure of MS2 particles to free chlorine led to a slight increase in their negative global charge, whereas no modification of the hydrophobicity of capsid proteins was observed using several and consistent methods. Interestingly, the  $T_m$  value which is the denaturation temperature of MS2 capsids decreased slightly after exposure to chlorine suggesting a potential weakening of the capsid. These results led us to explore the effect of free chlorine followed by heat on MS2 phages.

### 3.2. Effect of Free Chlorine and Heat on MS2 phage

The effects of free chlorine (100 mg/L) followed by heat treatment (55 °C or 60 °C for 10 min) on MS2 phage were first evaluated considering the infectivity and structure of the particles (Table 1). Infectivity decreased by  $-1.9 \pm 0.3 \log_{10}$  for 100 mg/L + 55 °C and by  $-3.2 \pm 0.6 \log_{10}$  for 100 mg/L + 60 °C. A synergistic effect on the inactivation of MS2 phage was observed when the 60 °C heat treatment was applied after chlorination. Indeed, the inactivation rate was found to be  $\approx 1 \log_{10}$  higher than the sum of the inactivation rates each treatment applied separately since the decrease reached  $-1.2 \pm 0.3 \log_{10}$  using 100 mg/L of free chlorine (see above) and  $-1.1 \pm 0.1$  for a 60 °C heat treatment for 10 min. This synergistic effect on inactivation was not observed when the MS2 particles were exposed to free chlorine at 100 mg/L followed by a heat treatment at 55°C. The RT-qPCR signal was not affected whatever the treatment applied since the highest log removal of genome reached  $-0.3 \pm 0.4 \log_{10}$  for 100 mg/L + 60 °C. As observed for free chlorine alone, no modification of the shape of MS2 phage was noted by TEM. Nevertheless, an increase in capsid permeability was suggested by the genome degradation observed in the RNase assay which led to a log removal of genome of  $-1.1 \pm 0.2$

$\log_{10}$  for 100 mg/L + 55 °C and  $-1.7 \pm 0.4 \log_{10}$  for 100 mg/L + 60 °C. As observed for the loss of infectivity, a synergistic effect on the sensitivity of the genome to RNase treatment was observed with the 60 °C heat treatment applied after chlorination, since the decrease reached  $-0.3 \pm 0.1 \log_{10}$  for free chlorine treatment (see above) and  $-0.8 \pm 0.2$  for 60 °C heat treatment (Brié et al., 2016) applied separately. Overall, these results showed a synergistic effect of free chlorine followed by heat, at least with a 60 °C heat treatment, and are in agreement with the free chlorine-induced weakening of the capsid suggested by DSF experiments.

An increase in hydrophobicity has previously been shown for MS2 phage exposed to 60 °C heat treatment by experiments based on DSF and adhesion to hydrophobic beads (Brié et al., 2016). These two methods were used in our context. DSF experiments were carried out after exposure to free chlorine (100 mg/L for 10 min at 4 °C) and heat (55 °C or 60 °C for 10 min) and were compared to 55 °C and 60 °C heat treatments applied alone (Fig. 3). Similar DSF profiles with low initial fluorescence and a  $T_m$  value of 66 °C were obtained for both native MS2 phage and those exposed to the 55 °C heat treatment only. As previously described by Brié et al. (2016), the initial fluorescence of the DSF profile for MS2 phages exposed to the 60 °C heat treatment alone increased in comparison with that of native phages. Moreover, an increase in the initial fluorescence was also observed after exposure to free chlorine followed by heat. The highest initial fluorescence value was observed using 100 mg/L free chlorine followed by 60 °C heat treatment. The decrease in the fluorescence of the DSF profiles observed between 20 °C and 60 °C could have been due to probe quenching by water (Cimpmperman & Matulis, 2011). The increase in the initial fluorescence revealed the presence of hydrophobic domains located on the capsid proteins after exposure to free chlorine and heat. Hydrophobic domains located on the capsid surface have previously been demonstrated for MS2 particles remaining infectious after a 60 °C heat treatment using adhesion to hydrophobic beads (Brié et al., 2016). Using the same method, a noticeable adhesion was observed for phages exposed to free chlorine and to 60 °C heat treatment only (Fig. 4). Remarkably, this increase in the adhesion capacity appeared to be specific to viral particles remaining infectious. The adhesion level was then close to  $2.5 \log_{10}$  and was significantly higher than that of  $1.5 \log_{10}$  previously obtained after a 60 °C heat treatment alone ( $p < 0.01$ , Mann-Whitney test) (Brié et al., 2016). Thus, a synergistic effect of free chlorine followed by heat was observed on the increase in hydrophobicity for remaining infectious MS2 phages.

To summarise, an interesting synergistic effect of free chlorine followed by heat was observed on the loss of infectivity of MS2 phage, but also on the increase in hydrophobicity at the surface of MS2 particles for infectious particles only. The expression of hydrophobic domains induced by heat was enhanced by prior exposure to free chlorine.

#### 4. Discussion

Comparison of the surface properties between infectious and non-infectious viruses may contribute to the development of innovative methods dedicated to the specific detection of infectious particles in

food and water. It may also help improve viral inactivation processes that are used in the food (e.g. vegetables, shellfish) and water industries (e.g. drinking water and wastewater). The purpose of our study was to identify the effect of free chlorine used alone or followed by heat treatment on the loss of infectivity and the surface properties of MS2 phages.

MS2 phages were first exposed to free chlorine alone which has been shown to act on both the capsid and the genomes of enteric viruses (Wigginton et al., 2012). Considering the small amplicon size of about 150 bases detected with our RT-qPCR assay, the genome was not expected to be affected in the present study. A complete signal loss has been observed for MS2 phages used at an initial concentration of  $10^6$  PFU/mL in drinking water and exposed to 4 mg/L of free chlorine at 20 °C using the same RT-qPCR assay as that used in the present study (Pelleieux, Mathieu, Block, Gantzer, & Bertrand, 2016). The absence of genome detection after exposure to free chlorine has also been reported for poliovirus and feline calicivirus used at initial concentrations of 103 PFU/mL exposed to 1.20 or 1.25 mg/L of free chlorine at 5 °C (Nuanualsuwan & Cliver, 2002). However, in both studies, all viral particles had been rapidly and completely inactivated suggesting that experimental conditions including at least chlorine concentration, contact time with the oxidant, matrix and temperature influence the extent of the damage caused to viral genomes. Few studies have shown that some regions of the viral genome could be more sensitive than others to damage caused by free chlorine with significant differences depending on the virus type. Indeed, loss of the 5' nontranslated region (5'NTR) has been described as the cause of hepatitis A virus inactivation (Li, Xin, Wang, Zheng, & Chao, 2002), whereas damage to the VP4 gene of human rotavirus has been associated with its inactivation by this oxidant (Xue et al., 2013). Nevertheless, a study performed on MS2 phage has suggested that the virucidal effect of chlorine is due to the type of modification the virus undergoes rather than to its location (Wigginton et al., 2012). Alterations of the capsid functionalities, decreases in resistance to enzymes (i.e. RNases, proteases) and oxidative damage represent the main effects of free chlorine on the capsid that have been described in the literature. A  $-0.8 \log_{10}$  decrease in the binding capacity to *E. coli* was observed after exposure to 200 mg/L only; the other functions involved in phage replication were not investigated. Genome injection after recognition of host cell has previously been described as the main function of MS2 phages altered by free chlorine (Wigginton et al., 2012). Alterations in endocytosis, endosomal lysis and nuclear delivery of the genome have been reported for adenovirus serotype 2 (Page et al., 2010). MS2 phage did not show any shape and size changes, nor did its permeability to RNase increase thus suggesting that the integrity of the capsid was preserved under our experimental conditions. A simultaneous treatment by both proteinase K and RNase has been previously needed to obtain an RT-PCR signal reduction for HAV exposed to free chlorine (Nuanualsuwan & Cliver, 2002). Both electrophoretic mobility as a function of the ionic strength and adhesion on positively charged beads showed a slight increase in the negative charge of MS2 phages after exposure to 100 and 200 mg/L of free chlorine. As suggested by the adhesion experiments to positively-charged beads, the increase in the negative charge was mainly due to an

increase in the external negative charge. The reactions of hypochlorous acid with amino acids result in a wide variety of products such as sulphinic/sulphonic acids, methionine sulphone and N-chlorinated species (Pattison, Davies, & Hawkins, 2012) which may modify the electrostatic charge of viral particles. Nonetheless, the increase in the electrostatic charge observed in our experiments is too weak to provide the opportunity for discriminating between infectious and inactivated MS2 phages. The IEP of MS2 phage was still estimated to be between 3.0 and 4.0; no change in the IEP has previously been observed for poliovirus exposed to chlorine (O'Brien & Newman, 1979). DSF experiments and adhesion onto hydrophobic beads both concluded to an absence of modification of the hydrophobicity of MS2 phages after exposure to free chlorine alone under our experimental conditions. More interestingly, by comparison with a previous study performed on poliovirus (Robinson, Jesudhasan, & Pfeiffer, 2014), the decrease of the  $T_m$  value observed in the DSF experiments suggested a weakening of the capsid by free chlorine. This phenomenon was then further investigated by studying the effect of chlorination followed by heat treatment on MS2 phages.

When MS2 phages were exposed to free chlorine (100 mg/L) and then to heat (60 °C), a synergistic effect was observed on the inactivation of MS2 phages with up to 1 log<sub>10</sub> additional inactivation in comparison with these treatments applied separately. The damage occurred at least on the capsid with a noticeable increase in its permeability to RNase. This is in agreement with the suitability of the pre-treatments using EMA and PMA intercalating dyes in the detection of infectious adenovirus and coxsackievirus after multiple disinfection treatments such as ozonation and chlorination (Prevost et al., 2016). Previous experiments performed on MS2 have suggested that free chlorine alters the capsid structure in a manner that facilitates access to internal protein structures (Wigginton et al., 2012). The expression of hydrophobic domains at the surface of MS2 phages exposed to a 60 °C heat treatment has previously been demonstrated for remaining infectious particles only (Brié et al., 2016). It appeared that this phenomenon was also enhanced for MS2 phages previously exposed to free chlorine confirming that this oxidant acts on the capsid and facilitates heat-induced modifications of protein conformation. To our knowledge, the virucidal effect of the combination of free chlorine and heat on MS2 phage has not been studied before. The chlorine-induced inactivation of enteric viruses and bacteriophages in suspension in water has only been studied for temperatures ranging from 5 °C to 25 °C (Abad et al., 1994; Cromeans et al., 2010; Kahler, Cromeans, Roberts, & Hill, 2010; Lim, Kim, & Ko, 2010; Schaper, Durán, & Jofre, 2002; Thurston-Enriquez, Haas, Jacangelo, & Gerba, 2003). For other combinations of virucidal treatments, a slight synergistic effect has been reported for MS2 phage exposed simultaneously to heat (59 °C) and solar UV (Theitler, Nasser, Gerchman, Kribus, & Mamane, 2012) and for adenovirus subjected to free chlorine and then to UV disinfection (Rattanukul, Oguma, & Takizawa, 2015). However, no synergistic effect has been noted for adenovirus exposed to UV and then to free chlorine (Lee & Shin, 2011). The combined effect of chlorine and temperature as sanitizers in food items has been studied slightly more on bacteria with an increase in inactivation compared to chlorine applied alone (Choi,

Beuchat, Kim, & Ryu, 2016; Delaquis, Fukumoto, Toivonen, & Cliff, 2004; Huang & Chen, 2011; Klaiber, Baur, Wolf, Hammes, & Carle, 2005). When heat was combined with other oxidizing agents such as hydrogen peroxide or chlorine dioxide, an increase in the bactericidal effect has been reported in comparison with these oxidizers used alone (Choi et al., 2016; Huang & Chen, 2011; Zhou, Orr, Lee, & Zachariah, 2016).

## **5. Conclusion**

The main effects of free chlorine on the surface properties of MS2 phages under our experimental conditions were an increase in their global electronegative charge and a weakening of their capsid. The first effect did not seem to provide new opportunities for discriminating between infectious and inactivated viral particles, whereas the second effect could contribute to the development of combined food processes striking a balance between viral inactivation and maintaining the nutritional and organoleptic characteristics of food which constitutes an ongoing challenge in the food industry (Sánchez, 2015). Finally, a noticeable increase in hydrophobicity was observed for MS2 phages remaining infectious after exposure to free chlorine and then to heat, whereas an increase in sensitivity to RNases was noted for inactivated phages. The latter two main observations should now be explored for pathogenic enteric viruses to determine the range of application of pre-treatments based on hydrophobicity or enzymes prior to their detection by molecular methods.

## **Acknowledgements**

The results of this study were obtained within the scope of CapsiVir, a project coordinated by ACTALIA and funded by the “Conseil Régional de Basse Normandie”. This study, labelled by the competitiveness cluster VALORIAL, was also supported by the Joint Technical Unit ACTIA VIROcontrol and the “Syndicat des Fabricants de Produits Végétaux Frais Prêts à l’Emploi” (cluster of ready-to-eat food industries: Florette, Bonduelle, Crudettes and Rosée des Champs). We thank Dr. Céline Caillet (LIEC, UMR 7360 CNRS Université de Lorraine) for her help and support with size/electrophoretic mobility experiments.

## **References**

- Abad, F. X., Pintó, R. M., Diez, J. M., & Bosch, A. (1994). Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2377–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8074518>
- 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), 477–84. <https://doi.org/10.1128/AEM.02095-06>
- Baert, L., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2009). The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.007>

- Beck, S. E., Rodriguez, R. A., Hawkins, M. A., Hargy, T. M., Larason, T. C., & Linden, K. G. (2015). Comparison of UV-Induced Inactivation and RNA Damage in MS2 Phage across the Germicidal UV Spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(5), 1468–74. <https://doi.org/10.1128/AEM.02773-15>
- Bertrand, I., Schijven, J. F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., ... Gantzer, C. (2012). The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1059–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x>
- Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., ... Gantzer, C. (2012). Removal of MS2, Q $\beta$  and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Research*, 46(8), 2651–64. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.020>
- Bozkurt, H., D'Souza, D. H., & Davidson, P. M. (2015). Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. *Journal of Food Protection*, 78(8), 1597–617. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-487>
- Breindl, M. (1971). The structure of heated poliovirus particles. *The Journal of General Virology*, 11(3), 147–56. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-11-3-147>
- 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*. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9248-2>
- Butot, S., Putallaz, T., & Sánchez, G. (2008). Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1–2), 30–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.033>
- Choi, S., Beuchat, L. R., Kim, H., & Ryu, J. H. (2016). Viability of sprout seeds as affected by treatment with aqueous chlorine dioxide and dry heat, and reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on pak choi seeds by sequential treatment with chlorine dioxide, drying, and dry heat. *Food Microbiology*, 54, 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.007>
- Cimpmperman, P., & Matulis, D. (2011). Protein thermal denaturation measurements via a fluorescent dye. *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement and Modelling*, (22), 247–273. Retrieved from <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849730099-00247/978-1-84973-009-9>
- Cromeans, T. L., Kahler, A. M., & Hill, V. R. (2010). Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1028–1033. <https://doi.org/10.1128/AEM.01342-09>
- Curry, S., Chow, M., & Hogle, J. M. (1996). The poliovirus 135S particle is infectious. *Journal of Virology*, 70(10), 7125–31. Retrieved from [www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=190765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=190765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
- de Roda Husman, a M., Lodder, W. J., Rutjes, S. a, Schijven, J. F., & Teunis, P. F. M. (2009). Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwaters, using PCR and cell culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1050–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.01750-08>



- Deboosere, N., Pinon, A., Caudrelier, Y., Delobel, A., Merle, G., Perelle, S., ... Vialette, M. (2012). Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiology*, 32(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.007>
- Delaquis, P. J., Fukumoto, L. R., Toivonen, P. M. ., & Cliff, M. A. (2004). Implications of wash water chlorination and temperature for the microbiological and sensory properties of fresh-cut iceberg lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 31(1), 81–91. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00134-0)
- 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(14), 4939–48. <https://doi.org/10.1128/AEM.00407-11>
- Dika, C., Gantzer, C., Perrin, a, & Duval, J. F. L. (2013). Impact of the virus purification protocol on aggregation and electrokinetics of MS2 phages and corresponding virus-like particles. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 15(15), 5691–700. <https://doi.org/10.1039/c3cp44128h>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.045>
- Engelbrecht, R. S., Weber, M. J., Salter, B. L., & Schmidt, C. A. (1980). Comparative inactivation of viruses by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(2), 249–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6258473>
- Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., ... Estes, M. K. (2016). Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, 5211(August). <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>
- Fraisse, A., Temmam, S., Deboosere, N., Guillier, L., Delobel, A., Maris, P., ... Perelle, S. (2011). Comparison of chlorine and peroxyacetic-based disinfectant to inactivate Feline calicivirus, Murine norovirus and Hepatitis A virus on lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.011>
- Fricks, C. E., & Hogle, J. M. (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *Journal of Virology*, 64(5), 1934–45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=249347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 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), 3965–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3965>
- Girard, M., Mattison, K., Fliss, I., & Jean, J. (2016). Efficacy of oxidizing disinfectants at inactivating murine norovirus on ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, 219, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.015>
- Hirneisen, K. a., Black, E. P., Cascarino, J. L., Fino, V. R., Hoover, D. G., & Knier, K. E. (2010). Viral Inactivation in Foods: A Review of Traditional and Novel Food-Processing Technologies.

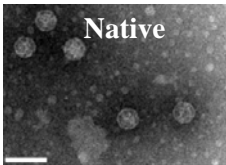
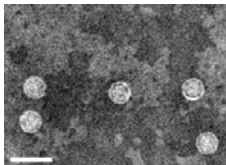
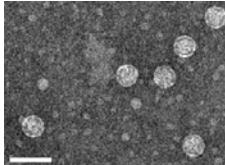
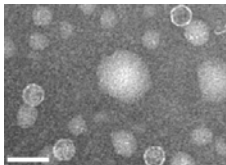
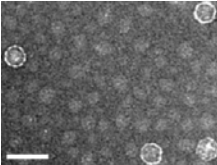
- Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9(1), 3–20. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00092.x>
- Huang, Y., & Chen, H. (2011). Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on baby spinach. *Food Control*, 22(8), 1178–1183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.012>
- ISO. (1985). ISO 7393-2. Water quality: Determination of free chlorine and total chlorine. Part 2: Colorimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes.
- ISO. (1995). ISO 10705-1. Water quality: detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages.
- ISO. (2013). ISO/TS 15216-1: Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification.
- Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., de Graaf, M., Freiden, P., ... Karst, S. M. (2015). Human norovirus culture in B cells. *Nature Protocols*, 10(12), 1939–47. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.121>
- Kahler, A. M., Cromeans, T. L., Roberts, J. M., & Hill, V. R. (2010). Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5159–64. <https://doi.org/10.1128/AEM.00869-10>
- Klaiber, R. G., Baur, S., Wolf, G., Hammes, W. P., & Carle, R. (2005). Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6(3), 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.03.002>
- 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 Research*, 42(10–11), 2769–77. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.02.007>
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C., & Duval, J. F. L. (2008). Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophysical Journal*, 94(8), 3293–312. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.115477>
- Lee, J.-K., & Shin, G.-A. (2011). Inactivation of human adenovirus by sequential disinfection with an alternative UV technology and free chlorine. *Journal of Water and Health*, 9(1), 53–8. <https://doi.org/10.2166/wh.2010.044>
- Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L., & Chao, F. H. (2002). Mechanisms of inactivation of hepatitis a virus by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4951–5. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4951>
- Lim, M. Y., Kim, J.-M., & Ko, G. (2010). Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Research*, 44(10), 3243–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.003>
- Loison, P., Majou, D., Gelhay, E., Boudaud, N., & Gantzer, C. (2016). Impact of reducing and oxidizing agents on the infectivity of Q $\beta$  phage and the overall structure of its capsid. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), fiw153. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw153>
- Meireles, A., Giaouris, E., & Sim, M. (2016). Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, 82, 71–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.021>

- Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, 2(9), 2212–21. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.321>
- Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2002). Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of Virological Methods*, 104(2), 217–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088831>
- Nuanualsuwan, S., & Cliver, D. O. (2003). Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 350–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.350>
- O'Brien, R. T., & Newman, J. (1979). Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(6), 1034–1039. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=291240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ogorzaly, L., & Gantzer, C. (2006). Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods*, 138(1–2), 131–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004>
- Page, M. a, Shisler, J. L., & Mariñas, B. J. (2010). Mechanistic aspects of adenovirus serotype 2 inactivation with free chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2946–54. <https://doi.org/10.1128/AEM.02267-09>
- Pattison, D. I., Davies, M. J., & Hawkins, C. L. (2012). Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids. *Free Radical Research*, 46(8), 975–95. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.667566>
- Pecson, B. M., Martin, L. V., & Kohn, T. (2009). Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), 5544–54. <https://doi.org/10.1128/AEM.00425-09>
- Pelleieux, S., Mathieu, L., Block, J.-C., Gantzer, C., & Bertrand, I. (2016). The effect of chlorination and hydrodynamic shear stress on the persistence of bacteriophages associated with drinking water biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 121(4), 1189–97. <https://doi.org/10.1111/jam.13243>
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F. S., Joyeux, M., Moulin, L., & Wurtzer, S. (2016). Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Research*, 91, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.049>
- Randazzo, W., López-Gálvez, F., Allende, A., Aznar, R., & Sánchez, G. (2016). Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *International Journal of Food Microbiology*, 229, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.010>
- Rattanakul, S., Oguma, K., & Takizawa, S. (2015). Sequential and Simultaneous Applications of UV and Chlorine for Adenovirus Inactivation. *Food and Environmental Virology*, 7(3), 295–304. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9202-8>

- Robinson, C. M., Jesudhasan, P. R., & Pfeiffer, J. K. (2014). Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. *Cell Host and Microbe*, 15(1), 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.004>
- Sánchez, G. (2015). Processing Strategies to Inactivate Hepatitis A Virus in Food Products: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 771–784. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12154>
- Sano, D., Ohta, T., Nakamura, A., Nakagomi, T., Nakagomi, O., & Okabe, S. (2015). Culture-independent evaluation of non-enveloped virus infectivity reduced by free chlorine disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(8), AEM.03802-14. <https://doi.org/10.1128/AEM.03802-14>
- Sano, D., Pintó, R. M., Omura, T., & Bosch, A. (2010). Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environmental Science & Technology*, 44(2), 808–12. <https://doi.org/10.1021/es9018964>
- Schaper, M., Durán, A. E., & Jofre, J. (2002). Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of f-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3702–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3702>
- Seitz, S. R., Leon, J. S., Schwab, K. J., Lyon, G. M., Dowd, M., McDaniels, M., ... Moe, C. L. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6884–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.05806-11>
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T., & Ohno, K. (2009). Comparison of behaviors of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Qbeta and MS2, during the aluminum coagulation process. *Water Research*, 43(3), 605–12. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.002>
- Sidhu, J. P. S., & Toze, S. G. (2009). Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environment International*, 35(1), 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.006>
- Sobsey, M. D., Fuji, T., & Shields, P. A. (1988). Inactivation of Hepatitis a Virus and Model Viruses in Water by Free Chlorine and Monochloramine. *Water Science and Technology*, 20(11–12), 385–391. Retrieved from <http://wst.iwaponline.com/content/20/11-12/385.abstract>
- Subba-Reddy, C. V., Yunus, M. a., Goodfellow, I. G., & Kao, C. C. (2012). Norovirus RNA Synthesis Is Modulated by an Interaction between the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase and the Major Capsid Protein, VP1. *Journal of Virology*, 86(18), 10138–10149. <https://doi.org/10.1128/JVI.01208-12>
- Theitler, D. J., Nasser, A., Gerchman, Y., Kribus, A., & Mamane, H. (2012). Synergistic effect of heat and solar UV on DNA damage and water disinfection of E. coli and bacteriophage MS2. *Journal of Water and Health*, 10(4), 605–18. <https://doi.org/10.2166/wh.2012.072>
- Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J., & Gerba, C. P. (2003). Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 3979–85. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3979>
- Tojo, K., Sano, D., Miura, T., Nakagomi, T., Nakagomi, O., & Okabe, S. (2013). A new approach for evaluating the infectivity of noncultivable enteric viruses without cell culture. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 67(10), 2236–40. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.114>

- Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K., & Unge, T. (1990). The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature*, 345(6270), 36–41. <https://doi.org/10.1038/345036a0>
- Walter, T. S., Ren, J., Tuthill, T. J., Rowlands, D. J., Stuart, D. I., & Fry, E. E. (2012). A plate-based high-throughput assay for virus stability and vaccine formulation. *Journal of Virological Methods*, 185(1), 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.014>
- Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Bosshard, F., Kohn, T., & Sigstam, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental Science & Technology*, 46(21), 12069–78. <https://doi.org/10.1021/es3029473>
- Xue, B., Jin, M., Yang, D., Guo, X., Chen, Z., Shen, Z., ... Li, J. (2013). Effects of chlorine and chlorine dioxide on human rotavirus infectivity and genome stability. *Water Research*, 47(10), 3329–38. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.025>
- Zhou, W., Orr, M. W., Lee, V. T., & Zachariah, M. R. (2016). Synergistic Effects of Ultrafast Heating and Gaseous Chlorine on the Neutralization of Bacterial Spores. *Chemical Engineering Science*, 144, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.01.019>

**Table 1: Effect of chlorine exposure (100 mg/L or 200 mg/L for 10 min at 4 °C) followed or not by heat exposure (55 °C or 60 °C for 10 min) on the integrity of MS2 phage, as well as on its infectivity and genome, with or without RNase treatment. Samples were observed at ×38,000 magnification (bar, 50 nm). Experiments were performed in triplicate. SD = Standard Deviation.**

					
	Native				
Free chlorine treatment (10 min)		100 mg/L	200 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
Heat treatment		None	None	55 °C, 10 min	60 °C, 10 min
<b>Loss of infectivity (log<sub>10</sub> ± SD)</b>		-1.2 ± 0.3	-3.5 ± 0.9	-1.9 ± 0.3	-3.2 ± 0.6
<b>Loss of genome (log<sub>10</sub> ± SD)</b>		0.0 ± 0.0	-0.5 ± 0.2	-0.1 ± 0.4	-0.3 ± 0.4
<b>Loss of genome with RNase treatment (log<sub>10</sub> ± SD)</b>		-0.3 ± 0.1	-0.1 ± 0.1	-1.1 ± 0.2	-1.7 ± 0.4

Figures

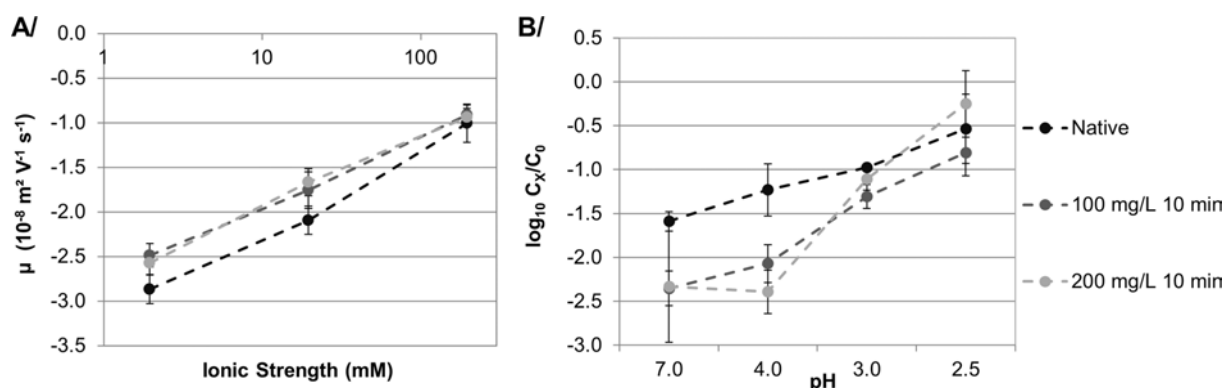


Figure 1: (A) Electrophoretic mobility ( $\mu$ ) of MS2 phage as a function of the ionic strength (mM) at pH 7.4. (B) Binding assay of MS2 phage to positively charged beads. The dotted lines are only guides to the eye. Three independent experiments were performed, each time with three measurements for electrophoretic mobility only. Error bars indicate standard deviations. For adhesion experiments on positively charged beads:  $C_x$ , concentration after binding assay,  $C_0$ , initial concentration.

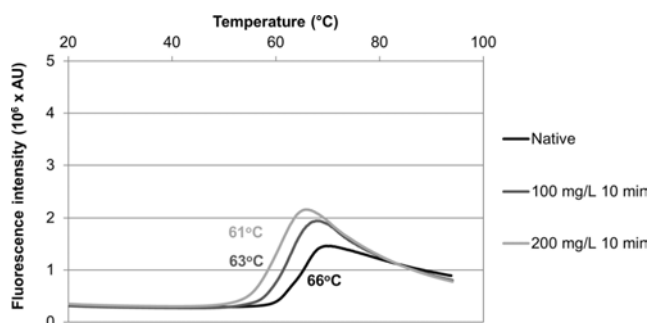
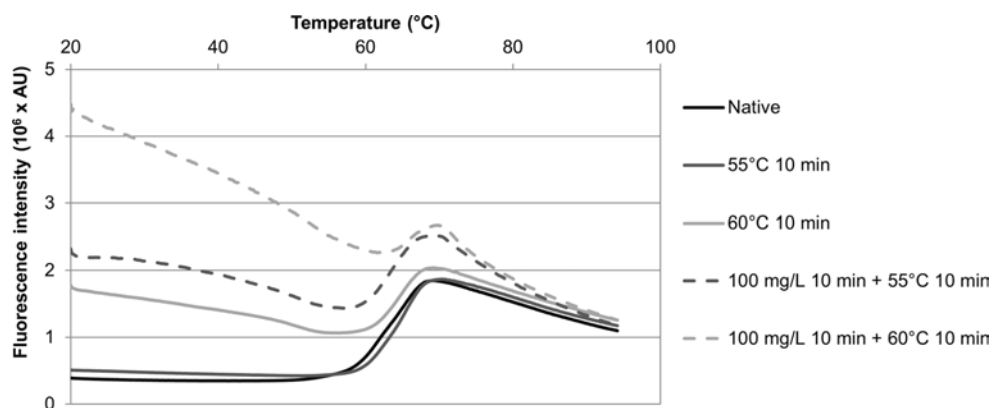
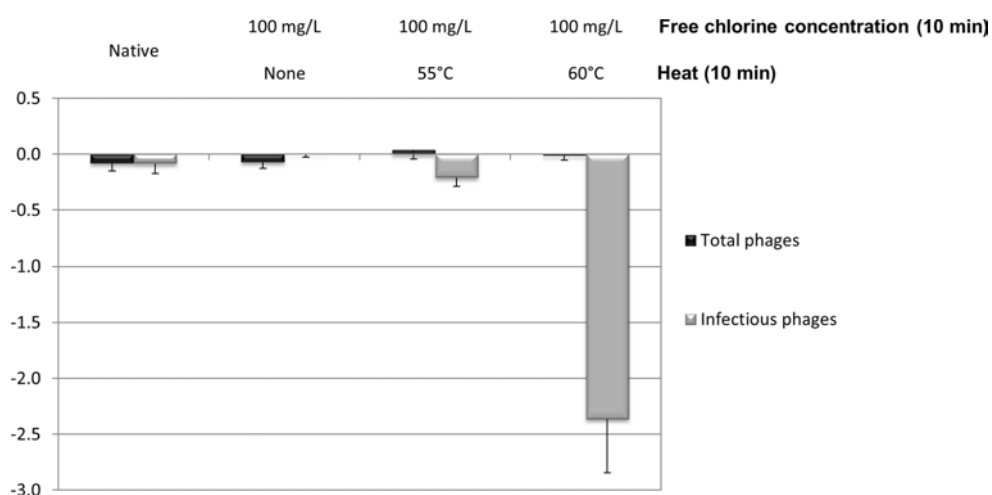


Figure 2: SYPRO Orange signature of MS2 phage before and after free chlorine treatment at 100 mg/L or 200 mg/L for 10 min. The curve represents one of three independent experiments. Melting temperature ( $T_m$ ) is indicated for each condition in bold. Fluorescence intensity is given in arbitrary units ( $10^6 \times \text{AU}$ ).



**Figure 3: SYPRO Orange signature of MS2 phage before and after heat treatment alone (55 °C and 60 °C for 10 min) or chlorine (100 mg/L for 10 min) followed by heat treatment (55 °C or 60 °C for 10 min). The curve represents one of three independent experiments. Fluorescence intensity is given in arbitrary units ( $10^6 \times \text{AU}$ ).**



**Figure 4: Binding to hydrophobic, magnetic beads at pH 7 in 10 mM PBS (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 150 mM NaCl) for native MS2 phages and those exposed to free chlorine alone (100 mg/L for 10 min) or to free chlorine (100 mg/L for 10 min) followed by heat (55 °C or 60 °C for 10 min). Three independent experiments were performed. Error bars indicate standard deviations.  $C_x$ , concentration after binding assay,  $C_0$ , initial concentration.**

## **IV Les effets de l’ozone gazeux sur le norovirus murin et le virus de l’hépatite A sur des framboises**

### **Contexte :**

De nombreuses épidémies virales d’origine alimentaires sont liées à une consommation de fruits rouges en particulier les framboises. Celles-ci, consommées la plupart du temps crues, sont considérées comme des matrices fragiles. Les traitements couramment utilisés par les industriels comme la chaleur ou la chloration ne peuvent donc pas être utilisés sur ce genre de matrice alimentaire. L’ozone gazeux pourrait alors être une alternative pour le traitement des framboises. L’ozone, utilisé dans le cadre du traitement des eaux, s’avère efficace contre les virus entériques. Toutefois, aucune information n’est actuellement disponible sur les effets de l’ozone sur des virus entériques comme le HuNoV ou le VHA présents sur des framboises.

### **Objectifs :**

L’objectif est d’estimer l’efficacité virucide de l’ozone gazeux sur une matrice complexe (framboises) en utilisant deux virus modèles du HuNoV et du VHA : le MNV et la souche vaccinale cultivable du VHA. L’impact sur la matrice et sur sa flore bactérienne naturelle a également été examiné.

### **Méthodes :**

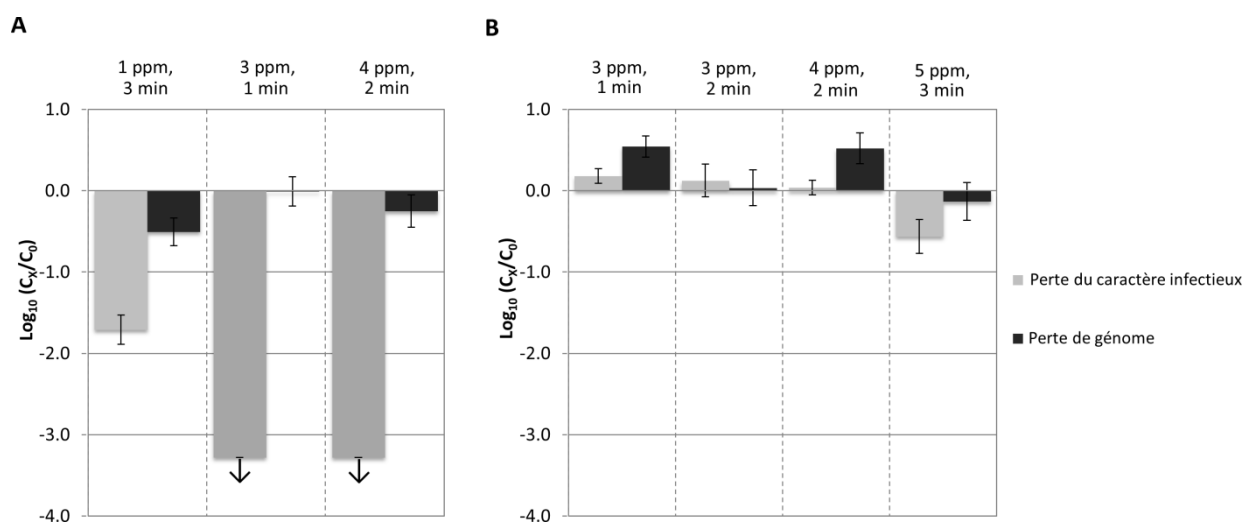
Dans un premier temps, l’effet de l’ozone gazeux sur le MNV en milieu aqueux a été évalué. Une inoculation des deux virus a ensuite été réalisée sur les framboises par dépôt. Elles sont conservées 20 heures à 4°C et à l’obscurité avant traitement. Après traitement à l’ozone gazeux à des doses comprises entre 1 et 5 ppm, les virus adsorbés sur les framboises sont récupérés par la méthode d’élution/concentration de la norme ISO/TS 15216 (2013). Ils sont ensuite quantifiés par TCID<sub>50</sub> (caractère infectieux) et RT-qPCR (génome). Les valeurs retrouvées avec et sans traitement sont ensuite comparées. Une évaluation des conséquences de l’ozone sur l’intégrité de la framboise et sa flore bactérienne naturelle a été effectuée en parallèle.

### **Résultats :**

L’impact de l’ozone gazeux sur le MNV dans du tampon PBS et sur une matrice de framboise fraîche a été mesuré. Une différence d’inactivation entre les deux conditions est observée. Elle est plus importante sur la matrice framboise. L’ozone gazeux n’entraîne ni une perte de la flore bactérienne naturelle ( $< 0,7 \log_{10}$ ), ni une dégradation physique des framboises. Les effets de l’ozone gazeux sur



le MNV ou le VHA déposé sur des framboises fraîches sont très différents. Les abattements en  $\log_{10}(C_x/C_0)$  du caractère infectieux et du génome sont présentés sur la **Figure 34**. Le MNV est apparu très sensible ( $> 3 \log_{10}$ ) à l’ozone au contraire du VHA ( $< 1 \log_{10}$ ) malgré des concentrations et des temps d’exposition plus importants pour ce dernier.



**Figure 34. Inactivation du MNV (A) et du VHA (B) sur des framboises fraîches par ozone gazeux à différentes concentration (ppm) et différents temps d’exposition.**

En gris, la perte du caractère infectieux par  $TCID_{50}$ , en noir la perte de génome par RT-qPCR. ↓: en dessous de la limite de détection.

### Conclusion :

L’ozone gazeux implique une forte inactivation du MNV sur les framboises mais, pour le VHA, une faible inactivation est constatée. Aucune diminution du signal de RT-qPCR par l’ozone gazeux n’a été observée pour les deux virus testés. Une synergie entre l’ozone et la matrice framboise est observée puisque l’inactivation sur les framboises est supérieure à celle observée dans le tampon PBS. Une concentration trop faible en ozone pourrait expliquer que cet effet synergique ne soit pas observé avec le VHA. Le traitement par l’ozone gazeux n’influence ni la flore bactérienne naturelle de ces fruits ni l’intégrité de la matrice alimentaire au cours du temps. Ces résultats constituent des arguments en faveur de l’utilisation de l’ozone comme traitement inactivant pour le HuNoV mais des concentrations plus élevées devraient être testées pour le VHA.

---

Article en révision dans *Food Microbiology* le 15/01/2017

## Inactivation of murine norovirus and hepatitis A virus on fresh raspberries by gaseous ozone treatment

Adrien Brié<sup>a,b,c</sup>, Nicolas Boudaud<sup>a</sup>, Annabelle Mssihid<sup>a</sup>, Julie Loutreul<sup>a</sup>, Isabelle Bertrand<sup>b,c</sup>,  
Christophe Gantzer<sup>b,c\*</sup>

<sup>a</sup> ACTALIA, Food Safety Department, Saint Lô, 50000 France

<sup>b</sup> Université de Lorraine, LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement),  
UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

<sup>c</sup> CNRS, LCPME, UMR 7564, Institut Jean Barriol, Nancy, France

\*Corresponding author: Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Albert Lebrun, Nancy F-54000, France.

E-mail address: christophe.gantzer@univ-lorraine.fr

Phone: 33 (0)3 83 68 22 91

### **Highlights:**

- High inactivation of murine norovirus on raspberries by gaseous ozone at 3 ppm.
- Low inactivation of hepatitis A virus on raspberries by gaseous ozone at 5 ppm.
- Synergistic effect of the raspberry matrix and ozone on norovirus inactivation.
- Ozone does not affect raspberry quality after storage for three days.
- No decrease in RT-qPCR signal after ozone treatment.

### **Abstract (200 words max)**

Raspberries are vulnerable products for which industrial treatment solutions ensuring both food safety and sensory quality are not easily applicable. They have been associated with numerous foodborne outbreaks in recent decades. Ozone has been proven effective as a drinking water treatment against pathogenic microorganisms. Nevertheless, to date, little information is available regarding the effect of gaseous ozone on viruses in food matrices. A comparison of the effect of gaseous ozone on murine norovirus (MNV-1) and hepatitis A virus (HAV) adsorbed on fresh raspberries was performed. MNV-1 was highly inactivated ( $> 3.3 \log_{10}$ ) by ozone (3 ppm, 1 min). The raspberry matrix seems to enhance inactivation by ozone compared to water. The same treatment was observed to have little effect on HAV or on aerobic, mesophilic, naturally occurring bacteria even for the highest dose under the tested conditions (5 ppm, 3 min). Ozone treatment did not affect the appearance of raspberries even after three days post-treatment. No ozone effect was observed on the genomes detected by RT-PCR whatever the virus, matrix, or dose used. Gaseous ozone could therefore be a good candidate for norovirus inactivation on raspberries but new conditions are needed for it to have significant effects on HAV inactivation.

Keywords: Gaseous Ozone, Murine Norovirus, Hepatitis A Virus, Inactivation, Raspberries

### **1. Introduction**

Enteric viruses are the main cause of foodborne outbreaks in the USA (36%) and in Europe (20.4%) (CDC, 2015; EFSA, 2016). Human norovirus (HNoV) is by far the most common viral cause (i.e.

nearly 90% of the viral foodborne outbreaks). Although not as common, Hepatitis A virus (HAV) also causes a large number of diseases that may require hospitalization. Fruit are described as the second main matrices involved in viral outbreaks after shellfish such as oysters or clams (EFSA, 2015; Painter et al., 2013). For example, in the first half of 2013, approximately 1,500 cases of hepatitis A were linked to the consumption of frozen mixed berries in 12 European countries (EFSA, 2014). Raspberries in particular were demonstrated to be highly involved in outbreaks (EFSA, 2015; EFSA, 2014; Falkenhorst et al., 2005; Maunula et al., 2009; Painter et al., 2013).

Due to its low infectious dose, estimated at 10-100 viral particles (Carter, 2005; Caul, 1994; Hirneisen et al., 2010; Koopmans et al., 2002), HNoV requires highly effective treatment. Heat and chlorine, commonly used as inactivating treatments in the food industry (Bozkurt et al., 2015; Hirneisen et al., 2010), have limitations on fragile matrices such as raspberries. Indeed, changes in appearance and sensory quality as well as formation of potentially carcinogenic chlorinated by-products are frequently observed (Guzel-Seydim et al., 2004). Ozone (O<sub>3</sub>) could be used as an alternative treatment option. However, except for its long-standing use in water treatment (Guzel-Seydim et al., 2004; Kim et al., 2003; von Gunten, 2007), it is currently little used in the industry. Yet, ozone has higher oxidizing potential than chlorine. It has a short half-life ( $\approx 20$  min) which allows food or food surfaces to be exposed very briefly (Guzel-Seydim et al., 2004; Kim et al., 2003).

The virucidal efficacy of ozone in water has been largely demonstrated (Finch and Fairbairn, 1991; Herbold et al., 1989; Hirneisen et al., 2011; Lim et al., 2010; Predmore et al., 2015; Roy et al., 1982; Shin and Sobsey, 2003; Thurston-Enriquez et al., 2005). Ozone inactivation of viruses is variable and depends on the (i) ozone concentration, (ii) contact time, (iii) matrix, (iv) experimental conditions (i.e. temperature and pH), and (v) virus that are used (i.e. HNoV, HAV, or poliovirus). Comparisons between enteric viruses have been conducted (Herbold et al., 1989; Roy et al., 1981). HAV appeared sensitive to ozone in water but less than poliovirus (Herbold et al., 1989). Differences in inactivation were also observed between two subgroups of viruses (i.e. poliovirus 1 and poliovirus 2) (Roy et al., 1981). Other studies provided inactivation data of HAV in water (Khadre et al., 2001; Vaughn et al., 1990), where low ozone doses ( $\leq 1$  ppm) applied for 1 min led to a loss of infectivity of  $\approx 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>. Ozone was also reported to inactivate surrogates of HNoV in water such as murine norovirus (MNV), feline calicivirus, or Tulane virus (Hirneisen et al., 2011; Lim et al., 2010; Predmore et al., 2015; Thurston-Enriquez et al., 2005). To date, the inactivation mechanisms of ozone are poorly understood. It has been shown to possibly affect the capsid only (Predmore et al., 2015) or both the capsid and viral genome (Kim et al., 1980; Roy et al., 1981; Shin and Sobsey, 2003). Two studies only have described the effect of gaseous ozone on viruses on food matrices (i.e. lettuce, strawberries, and onions) (Hirneisen et al., 2011; Predmore et al., 2015). They used MNV, feline calicivirus, or Tulane virus as viral surrogates of HNoV. Ozone inactivation of MNV was similar to that of Tulane virus on lettuce, but weaker on strawberries (Predmore et al., 2015). Comparable inactivation was also obtained for MNV and feline calicivirus on lettuce and onions (Hirneisen et al., 2011). Unlike pathogenic

HNoV, these viruses can be cultivated routinely in vitro. Cell culture is the only method for evaluating inactivation (Gassilloud et al., 2003). To date, no data are available regarding inactivation of viruses on raspberries despite many reported cases of raspberry-related viral outbreaks. Moreover, no studies have assessed the effect of gaseous ozone on HAV in food matrices.

The main objective of this study was thus to evaluate the relevance of using gaseous ozone to inactivate viruses on fresh raspberries. Two surrogates were used: MNV-1 and non-pathogenic HAV (vaccine strain). We first compared the inactivation rates of MNV-1 by gaseous ozone in water and on fresh raspberries to assess the matrix effect. We then investigated the effect of the same treatment on the appearance of raspberries and on their mesophilic bacterial flora. Finally, we evaluated the inactivation and degradation of MNV-1 and HAV on raspberries by cell culture and RT-PCR assays.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of viruses

Hepatitis A virus strain HM175/18f (ATTC VR-1402) was propagated in Fetal Rhesus monkey kidney cells (FRhK4, ATCC CRL-1688) using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, ThermoFisher Scientific), 1% non-essential amino acids (NEAA, ThermoFisher Scientific), 1% L-glutamine (ThermoFisher Scientific), and 1% antibiotics (penicillin G, streptomycin, amphotericin B).

Murine norovirus strain MNV-1 S99 was kindly provided by Friedrich Loeffler Institute (Germany). MNV-1 was propagated in the mouse macrophage cell line RAW 264.7 (ATCC TIB-71) using the cell culture method described by Cannon et al. (2006), which was similar to that used for FRhK4 cell culture.

FRhK4 cells and RAW 264.7 cells were infected with HAV and MNV-1, respectively, at a MOI of 0.1 for 2-3 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Three freeze/thaw cycles and centrifugation (400 g for 15 min) were then performed to remove cell debris from the virus lysate as described by Wobus et al. (2004). The supernatant was filtered through a 0.45-µm membrane filter, collected, aliquoted, and stored at - 80°C. The final viral concentrations of the two viruses following this protocol were  $\approx 10^7$  tissue culture infectious dose 50 per mL (TCID<sub>50</sub>/mL) and  $10^7$  plaque forming units per mL (PFU/mL) for MNV-1 and HAV, respectively.

### 2.2. Preparation of food samples: artificial contamination of raspberries by spotting

Fresh raspberries were purchased from a single local store and were used directly without any treatment. Raspberries (25 g) were inoculated by spotting 100 µL of each virus and stored for 20 h before treatment with ozone as described by Butot et al. (2007). Some contaminated raspberries, untreated by gaseous ozone, were used as positive controls in the infectivity assay and in the genome detection by RT-PCR.

### 2.3. Treatment of water and fresh raspberries with gaseous ozone

Gaseous ozone was generated by corona discharge from extra-dry compressed purified air using an ozone generator (LAB2B 5, Triogen Ltd). The pilot system for treatment by gaseous ozone for the decontamination of berries and water was designed and delivered by Alphatech (France). The amount of gaseous ozone in the chamber was displayed using a PortaSens II gas detector (ES, France). Ozone concentrations in water were

determined using the Indigo colorimetric method (Bader and Hoigné, 1981). Prior to treatment with ozone, MNV-1 suspensions were dialyzed overnight in 0.1X PBS (pH 7.4, Fisher Bioreagents). A 1 mL aliquot of MNV-1 was then treated with different doses and contact times of bubbling gaseous ozone. At the end of each treatment time, the residual ozone was quenched with sodium thiosulfate (2 moles of sodium thiosulfate for 1 mole of ozone).

Contaminated raspberries were placed on 316L stainless steel baskets inside the ozone chambers and treated with different doses and contact times. For each condition, C.t values (mg.min.L<sup>-1</sup>) were determined as the ozone concentration (ppm) multiplied by the contact time (min). The relative humidity (%) and the temperature (°C) were also checked. The mean relative humidity and temperature were 52% ± 7% and 17.1°C ± 0.4°C, respectively.

#### *2.4. Virus extraction from raspberries*

After exposure to ozone, MNV-1 or HAV were recovered from raspberries using the elution/concentration method of the ISO/TS 15216 standard (2013). Each sample was transferred into a mesh filter bag with 40 mL of TGBE buffer (Tris-HCl 100 mM, glycine 50 mM, 1% beef extract, pH 9.5) and 30 units of pectinase, and kept constant at pH 9.5 ± 0.2 during incubation with shaking (400 rpm, 20 min, room temperature). The eluate was clarified by centrifugation (10,000 g, 30 min, 4°C). The supernatant pH was immediately adjusted to 7.0 ± 0.2, supplemented with 10% (w/v) polyethylene glycol 6000 (5X) and 300 mM NaCl, and then incubated on a shaking platform (400 rpm) for 1 h at 4°C. The samples were then centrifuged (10,000 g, 30 min, 4°C). The pellets were recovered in PBS (500 µL) and then used to quantify the viruses by infectivity assay and RT-PCR. Controls with untreated contaminated raspberries were done in parallel to allow the viral recovery rate to be determined.

#### *2.5. Infectivity assays*

Quantitative measurement of the infectivity of HAV was done as described by Deboosere et al. (2004). Briefly, plaque assays in six-well cell culture plates with FRhK4 monolayers were infected with sequential 10-fold dilutions of HAV samples. After 11 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, cells were fixed and stained with crystal violet. The average number of PFU obtained from duplicate wells was used to determine the virus titer of the tested samples.

MNV-1 infectivity assays were performed in RAW 264.7 cells as described previously (Hwang et al., 2015). Briefly, 96-well plates were incubated with sequential 10-fold dilutions of MNV-1 samples for 3-5 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The virus titer was calculated based on TCID<sub>50</sub>/mL using the Reed & Muench method (Reed and Muench, 1938).

In the infectivity assays, the recovery rates of both MNV-1 and HAV for all the experiments were above 1%, and were obtained by comparing the number of viruses applied to the raspberries and the number of viruses recovered from the raspberries without ozone treatment.

#### *2.6. Virus extraction and RT-PCR*

Viral RNA was extracted from 50 µL PBS samples using a QIAamp viral RNA kit (Qiagen) and eluted in 100 µL of the appropriate buffer according to the manufacturer's instructions. The extracts were immediately stored at -80°C.

A 100 µL volume of enteric cytopathic bovine orphan (ECBO) virus was added to the samples prior to virus extraction as a control of extraction efficiency. ECBO virus was used to determine the efficiency of the entire extraction procedure which was calculated by comparing the C.t value of the samples with that of the inoculum as described by the ISO/TS 15216 procedure using primers and a probe from Jimenez-Clavero et al. (2005). The supernatants eluted from the raspberries were processed for RNA purification using the NucliSENS® miniMAGTM platform (bioMérieux) according to the manufacturer's instructions and the specifications of the ISO/TS 15216 procedure. Viral RNAs were recovered in 100 µL of elution buffer and stored at -80°C. The extraction efficiency of ECBO virus was ≈ 10% for all the experiments as required by the ISO/TS 15216 procedure.

According to the manufacturer's recommendations, reverse transcription was performed for MNV-1 RNAs from 7.5 µL of extracted RNA using a final concentration of 0.4 µM of reverse primer, 100 U of SuperScript III (Life Technologies), and 20 U of RNaseOUT (Life Technologies) in a 20 µL reaction volume. PCR (Life Technologies) was then carried out from 5 µL of cDNA with TaqMan universal PCR master mix (Life Technologies) in a 25 µL reaction volume, with reverse and forward primers at a final concentration of 0.4 µM and the TaqMan MGB probe at a concentration of 0.2 µM. The primers and probe used in the RT-PCR (CFX96 Touch, Biorad) were as previously described (Belliot et al., 2008).

According to the ISO/TS 15216 procedure, RT-PCR (CFX96 Touch, Biorad) with RNA Ultrasense (Life Technologies) was performed for HAV RNAs from 5 µL of extracted RNA using primers and a probe described previously (Costafreda et al., 2006).

In the RT-PCR assays, the recovery rates of both MNV-1 and HAV for all the experiments were above 1%, and were obtained by comparing the number of viruses applied to the raspberries and the number of viruses recovered from the raspberries without ozone treatment. Determination of the number of both MNV and HAV genome copies per mL (gc/mL) used for the standard curve was performed using an RNA transcript from plasmids, for MNV (Eurofins, pEX-AA228235-MNV) and for HAV (Costafreda et al., 2006), both quantified using a UV-Vis spectrophotometer (Thermo Scientific, NanoDrop 2000).

### *2.7. Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria*

In accordance with the ISO standard 21149 (2006), aerobic mesophilic bacteria (AMB) were counted on fresh raspberries before and after ozone treatment to evaluate the impact of gaseous ozone on the bacterial flora of the fruit. Briefly, this method is based on the count of bacterial colonies by plaque assay on a non-selective agar medium (tryptone 15 g, soytone-enzymatic digest of soybean meal 5 g, sodium chloride 5 g, and agar 15 g for one liter of medium). The AMB concentration is expressed as colony-forming units per gram (CFU/g).

### *2.8. Appearance of raspberries after exposure to gaseous ozone*

The effects of gaseous ozone on the appearance of raspberries were checked after one, two, and three days. Untreated and ozone-exposed raspberries were stored at 4°C in the dark before checking.

### *2.9. Statistical analysis*

Experiments were performed in triplicate on different days, and the results were reported as means and standard deviations. The non-parametric Mann-Whitney test was applied. Differences were considered significant if p was < 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Comparison of MNV-1 resistance in water and on fresh raspberries

In order to evaluate the matrix effect, ozone inactivation of MNV-1 was evaluated on raspberries and in water. The results are presented in Table 1. The recovery rates of both infectious MNV-1 and MNV-1 genome were above 1% as recommended by the ISO/TS 15216 (2013) standard (data not shown) with extraction efficiency of  $\approx 10\%$  with ECBO virus. Differences in MNV-1 inactivation were observed between the two matrices. The inactivation rate of MNV-1 was lower in water ( $- 1.1 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ ) than on fresh raspberries ( $> 3.3 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ ) with a higher ozone concentration in water (5 ppm) than on fresh raspberries (4 ppm). Infectious MNV-1 were no longer detected on fresh raspberries exposed to ozone. Such observations have led us to conclude that the food matrix and the oxidant diffusion in feed or food could contribute to variation in the inactivation rates of MNV-1 by ozone. The effect of ozone on the viral genome for both conditions was also evaluated. The persistence of the genome, estimated by RT-PCR, did not exhibit any significant changes for any of the two matrices after exposure to ozone.

#### 3.2. Effect of gaseous ozone on the appearance of fresh raspberries and their AMB

The effect of ozone on the appearance of raspberries and their AMB was investigated. Changes in the visual quality of raspberries from day 0 to day 3 are shown in Figure 1. Untreated raspberries did not show any significant changes over the three day period at 4°C in the dark. After exposure to the highest dose of ozone (5 ppm for 2 min), treated raspberries were not found to be different from untreated raspberries. The same conclusions were reached with exposure to lower doses of ozone (3 - 4 ppm for 2 min; data not shown).

The initial AMB count was estimated to be  $\approx 10^6$  CFU/g on raspberry surfaces. The reduction in the number of AMB on fresh raspberries remained below  $0.7 \log_{10}$  with 5 ppm of gaseous ozone for 3 min. When the dose was lowest (3 ppm for 1 min), no reduction ( $< 0.1 \log_{10}$ ) in the AMB count was noted. Gaseous ozone seems, therefore, to have little effect on the natural bacterial community of raspberries.

#### 3.3. Effect of gaseous ozone on MNV-1 and HAV on raspberry surfaces

Reduction in the number of MNV-1 and HAV spotted on fresh raspberries was finally tested. The results of MNV-1 and HAV inactivation on fresh raspberries are presented in Figure 2 and 3, respectively. As observed for MNV-1, the recovery rates of both infectious HAV and HAV genome were above 1% as recommended by the ISO/TS 15216 (2013) standard with extraction efficiency of  $\approx 10\%$  with ECBO virus. In the case of MNV-1 (Figure 2), an increase in the inactivation rates was observed between 1 ppm for 3 min and 3 ppm for 1 min. The highest inactivation rate was over  $3.3 \log_{10} \text{TCID}_{50}$  under the tested conditions (i.e. quantification limit). At 4 ppm for 2 min, infectious MNV-1 were no longer detected as noted at 3 ppm for 1 min. Ozone treatment did not alter RT-qPCR

signal whatever the ozone dose used. Decontamination of HAV on raspberries was not effective in terms of viral inactivation ( $< 0.6 \log_{10}$ ) and genome removal ( $< 0.1 \log_{10}$ ) under the conditions tested (Figure 3). Ozone had no effect on the viral genomes detected by RT-qPCR but was found to have different effects on infectious viruses depending on the virus used.

#### 4. Discussion

In recent decades, HNoV and HAV have been recognized as the main causes of foodborne disease outbreaks. Shellfish, vegetables, and fruit have been reported to be most involved (EFSA, 2015; EFSA, 2014; Painter et al., 2013). Moreover, some of them, especially red fruit, are usually eaten raw and are not subjected to any industrial processes allowing virus inactivation or removal. Enteric viruses are generally well known for being resistant to environmental stresses and their infectivity is not affected by freezing or deep-freezing. These elements explain the large number of foodborne outbreaks associated with fruit, especially berries. There is thus a need for new disinfection processes applicable to fragile food matrices. In such a context, the effects of gaseous ozone on surrogates of HNoV and HAV on raspberries were evaluated in order to estimate the virucidal impact and potential input of this novel treatment for the food industry.

We first demonstrated that gaseous ozone preserves the food matrix. No effect on the appearance of raspberries or on their AMB was observed, even after storage at 4°C for three days post-treatment. Comparison with literature data cannot be made because no such information is available for such a matrix. Nevertheless, Predmore et al. (2015) reported a similar observation for strawberries exposed to gaseous ozone, except that their experimental setup did not include the monitoring of the fruit appearance over a few days after treatment. They noted that, even after long exposure time (40 min) to ozone, treated strawberries looked similar to those untreated but with significantly reduced chewiness and gumminess. Besides, our results showed that exposure to ozone had little impact on the AMB of raspberries ( $< 0.7 \log_{10}$ ). This had previously been observed for other matrices such as strawberries, apples, melon, or lettuce (Rodgers et al., 2004). Similarly, inactivation of AMB had also been shown to be between 0.3 and 1.1  $\log_{10}$  for spinach and tomatoes, respectively (Aguayo et al., 2006; Habibi Najafi and Haddad Khodaparast, 2009; Qiang et al., 2005). Our observations, combined with those of other authors on similar fragile matrices, have therefore led to the conclusion that gaseous ozone preserves the appearance of raspberries and their naturally present AMB.

Secondly, our study evaluated ozone inactivation of MNV-1 in water. Three previous studies had reported on such inactivation. Our 1.1  $\log_{10}$  inactivation for a C.t value of 10 mg.min.L<sup>-1</sup> (ozone concentration of 5 ppm) was in accordance with the 4.1  $\log_{10}$  inactivation for a C.t value of 60 mg.min.L<sup>-1</sup> (ozone concentration of 6 ppm) observed by Predmore et al. (2015). Nevertheless, our results were found to be lower than those from two other studies reporting inactivation rates of more than 2.0 log as soon as C.t values reached 2 mg.min.L<sup>-1</sup> (ozone concentrations of 1 or 6.25 ppm) (Hirneisen et al., 2011; Lim et al., 2010). When considering the C.t values applied by these authors,



interpretation of the viral inactivation results should be carried out with care because ozone treatment implies fast oxidative reactions in which concentration has a much greater impact than contact time. Such highly variable results may also be explained by the lower viral concentrations (the latter two authors used) ( $10^4$  or  $10^6$  PFU/mL) compared to that of our study ( $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL). Under our conditions, initial viral stock suspensions were dialyzed against PBS. Some proteins coming from the cell culture lysate may still be present and consume the available ozone in solution. Working at lower concentrations implies higher dilution and less organic matter, thus allowing ozone treatment to be more effective (Guzel-Seydim et al., 2004; Herbold et al., 1989; Hirneisen et al., 2010; Roy et al., 1982). The buffer or residual cell culture medium used before ozone treatment may lead to different MNV-1 inactivation rates in aqueous medium due to the presence of organic matter. The differences seen in the results may also be explained by the strains used. Indeed, we used MNV-1 strain S99, whereas the other three studies used a strain provided by Dr. Virgin (from Washington University School of Medicine). Differences in resistance within the same genus have already been reported for some enteric viruses (e.g. poliovirus and echovirus) (Roy et al., 1982). Whatever the reasons of these differences, organic matter is found in larger amounts in food matrices, which thus allows the inactivation rates of S99 strain in food and water to be compared.

The main outcome of the present study was about the inactivating effect of gaseous ozone on HAV and MNV-1 associated with raspberries. Indeed, at the time of writing, no such data were available in the literature for HAV on food matrices. Our results indicated that HAV was highly resistant to gaseous ozone applied onto the surface of fresh raspberries, even when applied for 3 min at the highest dose of 5 ppm, as the viral inactivation rate was found to be below 0.6 log<sub>10</sub>. Similarly, Fraise et al., (2011) have reported high resistance of infectious HAV on lettuce to oxidizing agents such as peroxyacetic-based biocide. A protective effect of the food matrix and/or the AMB could lead to this low inactivation rate since HAV in water was found to be very sensitive with an infectivity reduction of  $\approx 4$  log<sub>10</sub> with lower ozone doses ( $\leq 1$  ppm) and contact times ( $< 1$  min) (Khadre et al., 2001; Vaughn et al., 1990) than those tested (on HAV-contaminated raspberries) in the present study. This could be explained by the adsorption form of the viruses and their accessibility to the oxidant, or by the consumption of the available ozone by the matrix. Our results were totally different for MNV-1 because the latter was shown to be highly prone to inactivation on raspberries. The inactivation rate of above 3.3 log that was observed in our study with a C.t value of 3 mg.min.L<sup>-1</sup> had been obtained only for C.t values greater than 60 mg.min.L<sup>-1</sup> (ozone concentrations of 6 or 6.25 ppm) in previous studies (Hirneisen et al., 2011; Predmore et al., 2015). Nevertheless, the matrices used in the latter studies were different: lettuce, onions, and strawberries. It can therefore be concluded that raspberries did not protect MNV-1 through an adsorption mechanism as described above for HAV, but instead enhanced its inactivation as compared to MNV-1 in water. Their pH may be part of the explanation since raspberries are acid matrices (pH 4.2) compared to lettuce or onions (Huang et al., 2016). However, Cromeans et al. (2014) showed that exposure to an acidic pH similar to that of raspberries did not

inactivate MNV-1. Another assumption would be that the combination of raspberries and ozone had a synergistic effect on MNV-1. Predmore et al. (2015) did not report such a synergistic effect with strawberries, another acid matrix. However, they used a different MNV strain (provided by Dr. Virgin), and larger amounts of matrix (50 g) than we did (25 g) which may have consumed the available ozone. This raspberry-related feature has also been reported for other treatments. For example, Huang et al. (2016) demonstrated that high hydrostatic pressure had a greater effect on HNoV in raspberries than in strawberries. Moreover, Deboosere et al. (2010) showed that HAV inactivation by heat was also more effective in raspberries than in strawberries. Contrary to what was found for MNV-1, no synergy between ozone and the matrix was noted for HAV. This may be related to a too low ozone dose that did not allow this phenomenon to be observed. Indeed, the pilot system dedicated to this study could not provide more than 5.0 ppm of gaseous ozone generated by corona discharge from extra-dry compressed purified air.

In conclusion, gaseous ozone can be seen as an alternative and prospective disinfection method for decontaminating fragile raspberries from HNoV. The matrix effect is an important factor that needs to be considered in that type of application to ensure food safety. The ozone effect was mainly observed on infectivity but not on viral genomes detected by RT-PCR. Nonetheless, in order to use ozone as a more global process on the food matrix, it is essential to increase its concentration beyond 5.0 ppm to enhance its virucidal effect on HAV and possibly its bactericidal effect, but the effect on raspberry quality and nutrient content should be considered when using higher ozone concentrations.

## 5. Acknowledgments

This work was performed under the auspices of UMT ACTIA VIROCONTROL (Unité Mixte Technologique: ACTALIA - LCPME) and benefited from the financial support of the Direction Régionale Alimentation Agriculture Forêt of Rhône-Alpes and the Conseil Régional of Basse-Normandie. It was also labeled by the competitiveness cluster TERRALIA.

## 6. References

- Aguayo, E., Escalona, V.H., Artés, F., 2006. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 169–177. doi:10.1016/j.postharvbio.2005.11.005
- Bader, H., Hoigné, J., 1981. Determination of ozone in water by the indigo method. *Water Res.* 15, 449–456. doi:10.1016/0043-1354(81)90054-3
- Belliot, G., Lavaux, A., Souihel, D., Agnello, D., Pothier, P., 2008. Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3315–8. doi:10.1128/AEM.02148-07
- Bozkurt, H., D'Souza, D.H., Davidson, P.M., 2015. Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. *J. Food Prot.* 78, 1597–617. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-487
- Butot, S., Putallaz, T., Sánchez, G., 2007. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 186–92. doi:10.1128/AEM.01248-06

- Cannon, J.L., Papafragkou, E., Park, G.W., Osborne, J., Jaykus, L.-A., Vinjé, J., 2006. Surrogates for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Prot.* 69, 2761–5.
- Carter, M.J., 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1354–80. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02635.x
- Caul, E.O., 1994. Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet* 343, 1240–2.
- CDC, 2015. *Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2013, Annual Report.*
- Costafreda, M.I., Bosch, A., Pintó, R.M., 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3846–55. doi:10.1128/AEM.02660-05
- Cromeans, T., Park, G.W., Costantini, V., Lee, D., Wang, Q., Farkas, T., Lee, A., Vinjé, J., 2014. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5743–51. doi:10.1128/AEM.01532-14
- Deboosere, N., Legeay, O., Caudrelier, Y., Lange, M., 2004. Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 73–85. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.015
- Deboosere, N., Pinon, A., Delobel, A., Temmam, S., Morin, T., Merle, G., Blaise-Boisseau, S., Perelle, S., Vialette, M., 2010. A predictive microbiology approach for thermal inactivation of Hepatitis A virus in acidified berries. *Food Microbiol.* 27, 962–7. doi:10.1016/j.fm.2010.05.018
- EFSA, 2016. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014.* 191p. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329
- EFSA, 2015. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.* 162p.
- EFSA, 2014. *Tracing of food items in connection to the multinational hepatitis A virus outbreak in Europe.* 186p. 12, 1–186. doi:10.2903/j.efsa.2014.3821
- Falkenhorst, G., Krusell, L., Lisby, M., Madsen, S.B., Böttiger, B., Mølbak, K., 2005. Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Eur. Commun. Dis. Bull.* 10, E050922.2.
- Finch, G.R., Fairbairn, N., 1991. Comparative inactivation of poliovirus type 3 and MS2 coliphage in demand-free phosphate buffer by using ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3121–6.
- Fraisse, A., Temmam, S., Deboosere, N., Guillier, L., Delobel, A., Maris, P., Vialette, M., Morin, T., Perelle, S., 2011. Comparison of chlorine and peroxyacetic-based disinfectant to inactivate Feline calicivirus, Murine norovirus and Hepatitis A virus on lettuce. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 98–104. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.011
- 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, 3965–9. doi:10.1128/AEM.69.7.3965
- Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, a. C., 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Sci. Technol.* 37, 453–460. doi:10.1016/j.lwt.2003.10.014
- Habibi Najafi, M.B., Haddad Khodaparast, M.H., 2009. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. *Food Control* 20, 27–30. doi:10.1016/j.foodcont.2008.01.010
- Herbold, K., Flehmig, B., Botzenhart, K., 1989. Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 2949–53.
- Hirneisen, K. a, Markland, S.M., Kniel, K.E., 2011. Ozone inactivation of norovirus surrogates on fresh produce. *J. Food Prot.* 74, 836–839. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-438

- Hirneisen, K. a., Black, E.P., Cascarino, J.L., Fino, V.R., Hoover, D.G., Knier, K.E., 2010. *Viral Inactivation in Foods: A Review of Traditional and Novel Food-Processing Technologies*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9, 3–20. doi:10.1111/j.1541-4337.2009.00092.x
- Huang, R., Ye, M., Li, X., Ji, L., Karwe, M., Chen, H., 2016. *Evaluation of high hydrostatic pressure inactivation of human norovirus on strawberries, blueberries, raspberries and in their purees*. *Int. J. Food Microbiol.* 223, 17–24. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.002
- Hwang, S., Alhatlani, B., Arias, A., Caddy, S.L., Christodoulou, C., Cunha, J.B., Emmott, E., Gonzalez-Hernandez, M., Kolawole, A., Lu, J., Rippinger, C., Sorgeloos, F., Thorne, L., Vashist, S., Goodfellow, I., Wobus, C.E., 2015. *Murine norovirus: propagation, quantification, and genetic manipulation*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 33, 15K.2.1–61. doi:10.1002/9780471729259.mc15k02s33
- ISO, 2013. *ISO/TS 15216-1: Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification*.
- ISO, 2006. *ISO 21149: Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria*.
- Jiménez-Clavero, M.A., Escribano-Romero, E., Mansilla, C., Gómez, N., Córdoba, L., Roblas, N., Ponz, F., Ley, V., Sáiz, J., 2005. *Survey of bovine enterovirus in biological and environmental samples by a highly sensitive real-time reverse transcription-PCR*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3536–43. doi:10.1128/AEM.71.7.3536-3543.2005
- Khadre, M. a, Yousef, a E., Kim, J.G., 2001. *Microbiological aspects of ozone applications in food: A review*. *J. Food Sci.* 66, 1242–1252. doi:DOI 10.1111/j.1365-2621.2001.tb15196.x
- Kim, C.K., Gentile, D.M., Sproul, O.J., 1980. *Mechanism of Ozone Inactivation of Bacteriophage f2*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 210–8.
- Kim, J.-G., Yousef, A.E., Khadre, M.A., 2003. *Ozone and its current and future application in the food industry*. *Adv. Food Nutr. Res.* 45, 167–218. doi:10.1016/S1043-4526(03)45005-5
- Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinjé, J., de Medici, D., Monroe, S., 2002. *Foodborne viruses*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 187–205.
- Lim, M.Y., Kim, J.-M., Lee, J.E., Ko, G., 2010. *Characterization of ozone disinfection of murine norovirus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1120–4. doi:10.1128/AEM.01955-09
- Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkela, S., Söderberg, K., Summa, M., von Bonsdorff, C.H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M., Niskanen, T., 2009. *Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks*. *Eur. Commun. Dis. Bull.* 14, 4–6.
- Painter, J.A., Hoekstra, R.M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C.R., Angulo, F.J., Griffin, P.M., 2013. *Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008*. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 407–415. doi:10.3201/eid1903.111866
- Predmore, A., Sanglay, G., Li, J., Lee, K., 2015. *Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation*. *Food Microbiol.* 50, 118–125. doi:10.1016/j.fm.2015.04.004
- Qiang, Z., Demirkol, O., Cagri-Mehmetoglu, A., Ercal, N., Adams, C., 2005. *Impact of food disinfection on beneficial biotriol contents in strawberry*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10414–21. doi:10.1021/jf802209t
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. *A simple method of estimating fifty per cent end points*. *Am. J. Hyg.* 27, 493–497.
- Rodgers, S.L., Cash, J.N., Siddiq, M., Ryser, E.T., 2004. *A comparison of different chemical sanitizers for inactivating Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe*. *J. Food Prot.* 67, 721–31.
- Roy, D., Englebrecht, R.S., Chian, E.S.K., 1982. *Comparative inactivation of six enteroviruses by ozone*. *J. Am. Water Work. Assoc.* 74, 660–664.

Roy, D., Wong, P.K., Engelbrecht, R.S., Chian, E.S., 1981. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 718–23.

Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2003. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3975–8. doi:10.1128/AEM.69.7.3975

Thurston-Enriquez, J. a, Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2005. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Res.* 39, 3650–6. doi:10.1016/j.watres.2005.06.006

Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Novotny, J.F., Strout, D., 1990. Effects of ozone treatment on the infectivity of hepatitis A virus. *Can. J. Microbiol.* 36, 557–60. doi:10.1017/CBO9781107415324.004

von Gunten, U., 2007. The basics of oxidants in water treatment. Part B: Ozone reactions. *Water Sci. Technol.* 55, 25–29. doi:10.2166/wst.2007.382

von Gunten, U., 2003. Ozonation of drinking water: part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Res.* 37, 1443–67. doi:10.1016/S0043-1354(02)00457-8

Wobus, C.E., Karst, S.M., Thackray, L.B., Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. V, Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J.M., Green, K.Y., Virgin, H.W., 2004. Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol.* 2, e432. doi:10.1371/journal.pbio.0020432

**Table 1: Inactivation of MNV-1 in water or on fresh raspberries by gaseous ozone. Three independent experiments were performed for each condition (n=3). SD: Standard deviation.**

Matrix	Water	Raspberries
Ozone concentration (ppm)	5	4
Contact time (min)	2	2
C.t value (mg.min.L <sup>-1</sup> )	10	8
Loss of infectivity (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> ± SD)	- 1.1 ± 0.4	> 3.3
Loss of genome (log <sub>10</sub> gc± SD)	- 0.2 ± 0.3	- 0.3 ± 0.2

**Figures:**

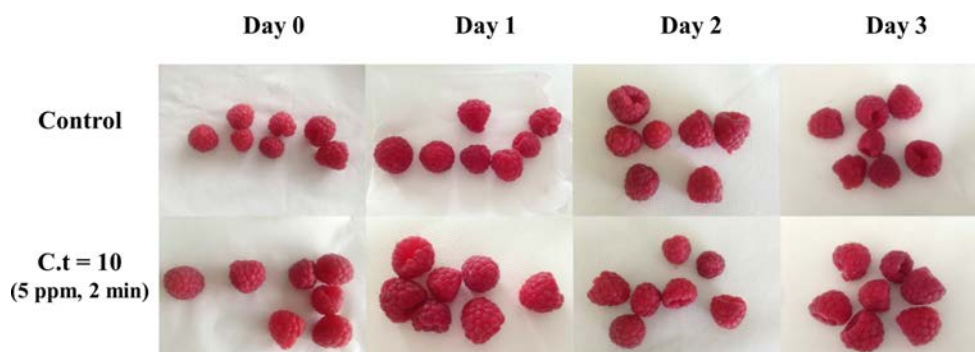


Figure 1: Changes in the visual quality of fresh raspberries after exposure to ozone. The samples were treated and kept at 4°C for 72 hours in the dark before checking their appearance.

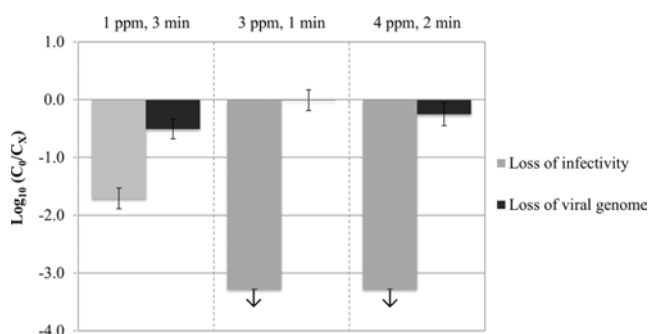


Figure 2: Inactivation of MNV-1 (infectious particles and genome) on fresh raspberries by gaseous ozone treatment at laboratory scale. Three independent experiments were performed for each condition (n=3). Error bars indicate standard deviations. ↓: below the detection limit. C<sub>x</sub>: concentration after ozone treatment. C<sub>0</sub>: concentration before ozone treatment.

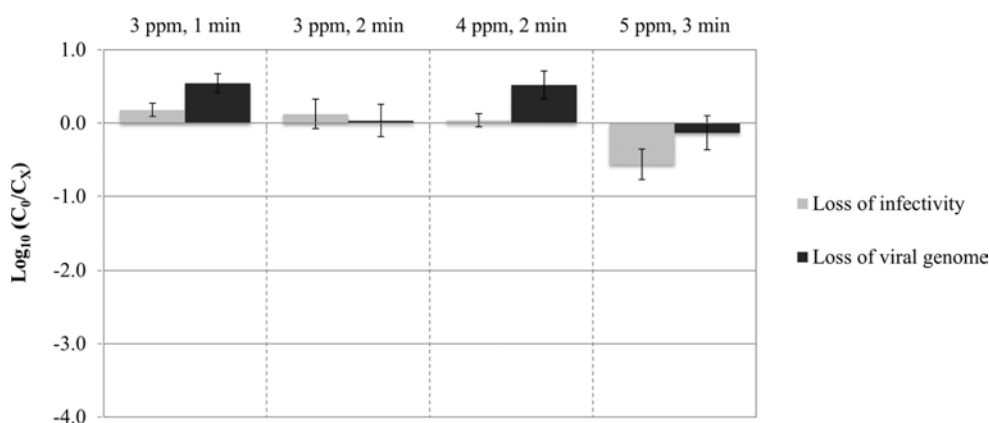


Figure 3: Inactivation of HAV (infectious particles and genome) on fresh raspberries by gaseous ozone treatment at laboratory scale. Three independent experiments were performed for each condition (n=3). Error bars indicate standard deviations. C<sub>x</sub>: concentration after ozone treatment. C<sub>0</sub>: concentration before ozone treatment.

***Partie 4 : Discussion – Perspectives***

La transmission des virus entériques à l'Homme par voies indirectes (*i.e.* eau, aliments) dépend du comportement et de la survie de ces micro-organismes. Ils sont directement liés aux caractéristiques physico-chimiques des virus en question. C'est ainsi que les capacités d'adhésion sur les aliments (Deboosere *et al.*, 2012) ou d'agrégation (Langlet *et al.*, 2008a) dépendent des sérotypes viraux. Les données sur les densités de charge présentes sur la capsid n'existent pas pour les virus pathogènes mais le  $pI$  permet de considérer que le bactériophage MS2, le MNV et le VHA, avec un  $pI$  respectif de 3,5, 4,8 (théorique) et 2,8, sont chargés négativement à pH neutre (Bolton *et al.*, 2013; Michen et Graule, 2010). Pour l'hydrophobie, seules des données sur les bactériophages ARN F-spécifiques existent. Le bactériophage MS2 est moins hydrophobe que les bactériophages Q $\beta$  et GA (Armanious *et al.*, 2016; Dika *et al.*, 2013a; Langlet *et al.*, 2008a). Parallèlement, de nombreuses études ont établi que les virus avaient de très grandes différences de sensibilité aux traitements inactivants mais aucune explication à ces phénomènes n'est pour l'heure énoncée. Il manque, en particulier, des connaissances sur les mécanismes au niveau moléculaire favorisant l'inactivation par ces différents traitements. Ce défaut d'information est lié à l'absence ou à la difficulté d'utilisation des outils permettant l'étude des mécanismes d'inactivation. L'avènement de la PCR a conduit à un nombre croissant de publications caractérisant les dégâts sur le génome viral provoqués par différents traitements (Li *et al.*, 2002b; Sigstam *et al.*, 2013; Simonet et Gantzer, 2006a, b; Wigginton *et al.*, 2012). A l'inverse, les analyses détaillées sur l'impact des traitements sur les protéines virales sont moins fréquentes. La littérature souligne généralement la résistance très largement supérieure du génome viral par rapport au caractère infectieux (Bae et Schwab, 2008; Baert *et al.*, 2008b; Duizer *et al.*, 2004; Gassilloud *et al.*, 2003; Hartard *et al.*, 2015; Hewitt *et al.*, 2009; Ogorzaly *et al.*, 2010). Ceci implique que la capsid protéique est le siège de nombreux processus d'inactivation. D'un point de vue plus appliqué, les méthodes normalisées de détection des génomes viraux dans les matrices alimentaires parues récemment (ISO/TS 15216, 2013) vont donc conduire à une augmentation du nombre d'analyses virologiques des aliments et des eaux embouteillées par recherche de génome viral. Or, seules les méthodes de culture permettent la détection des virus infectieux. Comme elles ne sont pas applicables en routine à tous les virus entériques pathogènes notamment le HuNoV et le VHA, la détection de génome viral peut conduire à une surestimation du danger viral. Dans ce contexte, il apparaît nécessaire d'améliorer les méthodes de détection des virus entériques infectieux et surtout de discriminer les virus infectieux des virus non-infectieux sur des critères, par exemple, physico-chimiques.

Cette étude avait donc pour objectif de suivre l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de virus entériques (*i.e.* structure, charge, hydrophobie) au cours du processus d'inactivation (*i.e.* chaleur, hypochlorite de sodium, ozone). Le bactériophage MS2 et le MNV, ont été



ainsi choisis comme modèles des virus entériques pathogènes d'après les données de la littérature (Bae et Schwab, 2008; Boudaud *et al.*, 2012; Cromeans *et al.*, 2014; Deboosere *et al.*, 2012; Hirneisen et Kniel, 2013a; Sidhu et Toze, 2009; Wobus *et al.*, 2006). Trois traitements virucides dont l'impact sur la capsid a déjà été décrit dans la littérature ont été étudiés : la chaleur, l'hypochlorite de sodium et l'ozone. Dans le cadre de ce travail, un effort s'est porté sur la production et la purification des virus modèles. En effet, certaines approches pour étudier les propriétés de surface nécessitent de fortes concentrations en virus infectieux ( $> 10^{10}$  PFU/mL). Elles ne seront appliquées qu'aux bactériophages MS2 et non au MNV dont la concentration reste insuffisante ( $\approx 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL). La purification est aussi un point crucial pour l'étude des propriétés de surface (Dika *et al.*, 2013a) mais aussi pour favoriser au maximum la présence de virus infectieux au détriment de génome libre ou de particule virale sans génome. Pour cela, une précédente étude (Dika *et al.*, 2013a) avait montré, pour la purification de particules virales, l'intérêt du gradient de densité avec le CsCl destinées à l'étude des propriétés de surface. L'iodixanol a permis d'obtenir des particules de caractéristiques identiques à celles purifiées sur gradient de CsCl et présente l'avantage supplémentaire d'être non chargé et non toxique pour les cellules. Il permet d'augmenter le ratio virus infectieux/virus non-infectieux.

La discussion peut être menée au niveau des trois types de traitement étudiés : la chaleur, l'hypochlorite de sodium et l'ozone. Les propriétés de surface des virus non traités (natifs) ont été définies au préalable, puis les conditions optimales de traitement définies comme une conservation de l'intégrité de la capsid virale et une réduction d'au moins une unité logarithmique en virus infectieux, ont été spécifiées. Ensuite, les éventuelles modifications des propriétés de surface ont été examinées par différentes méthodes après utilisation des trois traitements choisis. Outre le fait d'augmenter nos connaissances sur les mécanismes d'inactivation, il s'agit aussi de participer au développement d'une méthodologie permettant la différenciation entre des virus infectieux et des non-infectieux. Cette méthode aurait pour finalité de renseigner sur le risque viral infectieux effectif dans les matrices environnementales et alimentaires pour les industriels de l'agro-alimentaire.

La température est connue pour inactiver les virus entériques et leurs virus modèles dans les matrices environnementales ou alimentaires. De nombreuses études ont principalement quantifié la perte en virus infectieux ou en génome viral. Néanmoins, les conditions nécessaires pour altérer la structure de la capsid virale doivent être spécifiées. Dans notre cas, nous considérons une dégradation de la capsid si l'observation par MET n'était pas concluante, avec absence ou faible présence de particules virales observée et/ou si le génome viral était accessible à la RNase impliquant sa dégradation par celle-ci. Les travaux réalisés soulignent deux points importants, d'une part l'existence d'une température critique à partir de laquelle la particule virale est déstructurée

avec son génome totalement accessible à l'action d'enzymes et d'autre part des propriétés de surface différentes entre les virus natifs et les virus traités à des températures inférieures à celle critique. Pour le bactériophage MS2, une valeur de  $T_m$  de 66°C a été déterminée à l'aide des profils utilisant la sonde SYPRO indiquant une modification majeure de la conformation des protéines de capsid virale. En effet, une exposition de 72°C pendant 10 minutes implique (i) une faible présence de particules virales observables en microscopie, (ii) une dégradation du génome viral par la RNase et (iii) un profil SYPRO différent (absence de  $T_m$ ). Ces observations ont été confirmées pour le MNV, une température de 72°C ou 80°C pendant 10 minutes provoque également une accessibilité de son génome à la RNase. Cette accessibilité du génome à la RNase a également été démontrée à 72°C pour le VHA ou le poliovirus et à 75°C pour le HuNoV GII-4 (Nuanualsuwan et Cliver, 2002; Topping *et al.*, 2009). La calorimétrie différentielle à balayage (DSC, en anglais) et la microscopie électronique à transmission ont permis la définition des valeurs de  $T_m$  des VLPs du bactériophage MS2 et du HuNoV, respectivement, à 68,8°C ou 72,3°C et 65°C (Ashcroft *et al.*, 2005; Ausar *et al.*, 2006; Bundy *et al.*, 2008). Ainsi nos données et celles de la littérature tendent à démontrer qu'à des températures supérieures à 65°C la capsid des virus est déstructurée et le génome viral devient accessible à l'action d'enzymes. Une plus faible température, 60°C, est néanmoins suffisante pour deux autres virus, l'échovirus et le calicivirus félin (Ruokola *et al.*, 2014; Topping *et al.*, 2009). Il a été démontré par ailleurs que ces deux virus étaient plus sensibles à la chaleur que le MNV ou le VHA en matière d'inactivation virale (Bertrand *et al.*, 2012). D'un point de vue appliqué, cela suppose que pour des traitements alimentaires supérieurs à 72°C, un traitement à la RNase peut permettre de discriminer les virus infectieux des non-infectieux et ainsi limiter le nombre de faux positifs par RT-PCR. Une méthode alternative à la RNase utilisant un intercalant à l'ARN ou l'ADN tel que le PMA ou l'EMA a été proposée et testée par différentes équipes. La fixation de l'intercalant dépend de son affinité pour le génome viral avec des différences potentiels entre les virus à ADN et à ARN (simple et double brin) en fonction de la présence de structures secondaires. Cette approche a été démontrée comme efficace après des expositions à 72°C et plus pour le bactériophage MS2, le poliovirus, le VHA, le rotavirus, l'astrovirus, l'échovirus ou encore le coxsackievirus (Karim *et al.*, 2015; Kim et Ko, 2012; Parshionikar *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014). Nos résultats expliquent parfaitement ces données puisque dans ces conditions le génome devrait être libre. L'existence d'une température critique supérieure à 72°C pour les virus et ainsi une efficacité des traitements PMA/EMA pour discriminer les virus infectieux des non-infectieux doit être tempérée par au moins trois points. Le premier point concerne certaines études qui démontrent que les traitements au PMA ou à l'EMA ont été infructueux pour limiter les faux-positifs sur le MNV, le bactériophage T4 ou le Snow Mountain Virus pour des températures comprises entre 72°C et 85°C (Escudero-Abarca *et al.*, 2014; Fittipaldi *et al.*, 2010; Kim et Ko, 2012). Une différence de taille et/ou de structures secondaires

sur la séquence du génome détectée par RT-PCR pourrait expliquer ces observations. Une plus forte température (110°C) appliquée au bactériophage T4 a néanmoins permis une bonne efficacité de cette méthode (Fittipaldi *et al.*, 2010). Un effet protecteur a été en outre mis en évidence dans les matrices alimentaires en fonction de la teneur en lipides, protéines ou sucres. Des études complémentaires avec ces matrices complexes pour des conditions optimales d'utilisation de la RNase, du PMA ou de l'EMA sont donc nécessaires (Bozkurt *et al.*, 2015; Croci *et al.*, 1999; Deboosere *et al.*, 2004; Strazynski *et al.*, 2002). De même, pour certains virus, le PMA/EMA pénètre au sein du virus encore infectieux (Leifels *et al.*, 2015).

A des températures inférieures à la température critique, les virus non-infectieux restent structurés sous forme de particules virales avec un génome inaccessible aux RNases. Ces particules participent également à la surestimation des virus infectieux par RT-PCR après traitement thermique. Ceci implique en conséquence, une grande difficulté d'interprétation des résultats de détection du génome viral dans les différentes matrices analysées en matière de risque infectieux. L'étude physico-chimique différentielle entre particules virales infectieuses et non-infectieuses n'avait jamais été entreprise. Ainsi, une exposition à 60°C ne dégrade pas la capsid virale de nos deux virus modèles. La taille et l'aspect du bactériophage MS2 après chauffage à 60°C est similaire à celle du virus natif. Des particules virales sont encore structurées au moins dans le cas du bactériophage MS2. La chaleur seule n'entraîne pas de diminution du signal de RT-qPCR. La perte d'adhésion à la cellule hôte a été reliée à celle du caractère infectieux du bactériophage MS2 ou à d'autres virus entériques comme le VHA et le calicivirus félin mais, à des températures de 72°C (Nuanualsuwan et Cliver, 2003a; Wigginton *et al.*, 2012). Or à cette température les virus sont déstructurés. La perte d'adhésion est donc implicite. Nos résultats confirment, pour le bactériophage MS2 et pour des températures inférieures à la température critique, que l'étape d'adhésion est l'étape du cycle viral la plus impactée par la chaleur à 60°C pour trois temps d'expositions (10, 30 et 60 minutes). Quant à la perte du caractère infectieux du MNV, celle-ci n'est reliée qu'en partie à la perte de capacité d'adhésion à sa cellule hôte. D'autres étapes comme l'entrée du virus dans sa cellule cible ou l'injection de son génome pourraient être impactées par la chaleur et expliquer la perte du caractère infectieux (Page *et al.*, 2010; Wigginton *et al.*, 2012). Des différences de mécanismes d'adhésion et d'entrée dans leurs cellules hôtes respectives peuvent expliquer ces différences entre nos deux virus d'étude concernant leur capacité d'adhésion puisque l'un est un virus de cellules procaryotes, l'autre de cellules eucaryotes. L'utilisation de la RNase pour des températures égales ou inférieures à 60°C n'est pas possible pour discriminer les virus infectieux et non-infectieux. Des observations similaires sont faites avec l'emploi du PMA ou de l'EMA pour le poliovirus, l'adénovirus et le coxsackievirus après des températures d'exposition comprises entre 4°C et 55°C (Leifels *et al.*, 2015; Prevost *et al.*, 2016). La capsid est affectée par la chaleur, des modifications des propriétés de surface peuvent

donc être envisagées. L'hydrophobie et la charge électrostatique globale sont analysées de manière indépendante.

La détermination de l'hydrophobie d'une particule virale s'effectue dans notre étude par deux méthodes : l'adhésion sur des supports hydrophobes (Dika *et al.*, 2013b) et l'étude de changements conformationnels avec la sonde SYPRO (Walter *et al.*, 2012). Chaque méthode a ses limites, il est donc primordial d'utiliser des approches indépendantes pour évaluer les mêmes paramètres. La première permet de suivre séparément les virus infectieux détectés par culture cellulaire, des non-infectieux détectés par leur génome par RT-qPCR. Nos résultats ont d'abord confirmé les informations retrouvées dans la littérature, le bactériophage MS2 exprime une faible hydrophobie (Dika *et al.*, 2013b). Aucune information n'était à ce jour disponible concernant le MNV. Ce virus possède également une faible hydrophobie. Après exposition à la chaleur, les virus restés infectieux deviennent plus hydrophobes. La température d'exposition maximale de l'expression de l'hydrophobie diffère entre nos deux virus modèles. Elle est de 60°C pour le bactériophage MS2 et de 55°C pour le MNV pour des temps d'exposition de 10 minutes. La différence principale entre ces deux modèles est que l'augmentation de l'hydrophobie est observée aussi bien pour les MNV encore infectieux que pour les MNV inactivés alors que pour le bactériophage MS2 seuls les phages encore infectieux voient leur hydrophobie augmentée. Pour des températures supérieures ou égales à 60°C, l'hydrophobie du MNV est très faible. Ces observations sont proches de celles faites pour le poliovirus. Les poliovirus non chauffés de forme 160S et inactivés (56°C, 10 minutes) de forme 80S possèdent une faible hydrophobie (Fricks et Hogle, 1990). Cependant, la forme 80S est dépourvue du génome au contraire de nos virus non-infectieux obtenus après chauffage. La forme intermédiaire du poliovirus, 135S obtenue après exposition à 50°C pendant trois minutes, possède une hydrophobie plus importante. Elle n'a conservé un caractère infectieux que pour des cellules initialement non permissives pour le virus natif (Curry *et al.*, 1996; Tuthill *et al.*, 2010). Pour résumer, nos résultats décrivent une augmentation de l'hydrophobie au cours du processus d'inactivation thermique.

La charge électrostatique globale peut être estimée par différentes approches, parmi celles-ci on retrouve la mobilité électrophorétique. Cette technique nécessite une haute concentration en particules virales purifiées et seul le bactériophage MS2 a pu être utilisé. La mobilité électrophorétique a confirmé la valeur de  $pI$  du bactériophage à 3,5 (Dika *et al.*, 2011; Langlet *et al.*, 2008a). Aucune différence significative n'est notée entre le bactériophage natif et celui traité à 60°C pendant 10, 30 ou 60 minutes. Cependant, étant donné la proportion initiale de phages non-infectieux, ces particules seront les principales mesurées par cette méthode. Cette limite de la purification initiale pourrait expliquer que les profils de mobilité électrophorétique en fonction du pH soient similaires entre toutes les conditions testées. La considération des particules virales par le concept des particules « molles » prend en compte la perméabilité de ces particules au flux

hydrodynamique. Elle est fonction du ratio de la charge interne sur la charge externe de la particule (Duval et Ohshima, 2006; Langlet *et al.*, 2008b). Dans ce cas, les mesures de mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique doivent être prises en compte. Nos résultats n'ont pas montré de modification de la charge des particules chauffées sauf à la plus faible force ionique et pour un temps d'exposition de 60 minutes à 60°C. Il s'agirait d'une diminution de la charge et/ou de la perméabilité. Au regard des expérimentations avec la sonde SYPRO, une modification de la perméabilité serait l'explication la plus probable. Par contre, des changements drastiques sur le  $pI$  du poliovirus ont été observés dans d'autres études. Effectivement, une exposition à 56°C pendant 5 minutes, provoque une forte diminution du  $pI$  passant de 7,5 à 4,5 après traitement (O'Brien et Newman, 1979). Le passage de la forme 160S à 80S avec la perte de génome et de la protéine VP4 pourrait expliquer cette modification du  $pI$  (Breindl, 1971; Fricks et Hogle, 1990). Une augmentation de la perméabilité de la particule virale permettrait également d'expliquer cette baisse du  $pI$  selon la théorie des particules « molles » (Dika *et al.*, 2013a; Langlet *et al.*, 2008b). Le génome viral a dans ce cas un impact plus important sur la charge. Avec le bactériophage MS2, nous n'avons observé ni de modification drastique du  $pI$  ni de libération du génome. La seconde approche utilisée pour évaluer la charge est l'adhésion des particules virales sur des billes chargées positivement ou négativement. Comme pour les billes hydrophobes, cette méthode peut être utilisée pour comparer séparément l'adhésion des virus infectieux et des non-infectieux. Les profils d'adhésion ont confirmé les observations des profils de mobilité électrophorétique pour le bactériophage MS2 avec un  $pI$  compris entre pH 3 et 4 et une charge non modifiée pour les virus non-infectieux à 60°C pendant 10 minutes. Pour le MNV natif et chauffé, on peut également estimer leur  $pI$  par les profils d'adhésion du MNV qui serait dans les deux cas compris entre pH 3 et 4. La comparaison des résultats autour du  $pI$  est difficile puisque d'autres types d'interactions qu'électrostatique peuvent intervenir, par exemple les interactions hydrophobes. De manière surprenante, avant chauffage, les phages infectieux montrent une charge négative plus importante que les phages non-infectieux ce qui n'est pas observé pour le MNV. Après exposition à 60°C pendant 10 minutes, les phages restés infectieux ont également une charge négative plus faible que les phages infectieux natifs. Au contraire, les phages non-infectieux natifs et après exposition à la chaleur possède un charge similaire. La séquence suivante serait alors du plus chargé négativement au moins : Phage infectieux natif > Phage infectieux chauffé > Phage non-infectieux. A l'inverse des conclusions formulées pour le bactériophage MS2, aucune différence n'a pu être notée avec le MNV après exposition à la chaleur. Néanmoins, une augmentation de l'adhésion des MNV chauffés infectieux et non-infectieux a été notée pour l'adhésion à pH 7. Elle peut être expliquée par la force ionique appliquée dans cette méthode favorisant les interactions hydrophobes en lien avec l'augmentation de l'hydrophobie observée à cette température.

Globalement, les modifications de charge ne semblent pas majeures au cours du traitement thermique même si des variations ponctuelles en fonction du virus et des conditions peuvent être soulignées. Par contre, de nouvelles informations sont apportées principalement quant à l'évolution de l'hydrophobie au cours d'un traitement thermique.

Les traitements oxydants sont couramment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire, en particulier l'hypochlorite de sodium. Ce dernier possède un large spectre d'activité antimicrobienne affectant aussi bien les virus, les bactéries ou d'autres micro-organismes (Hirneisen *et al.*, 2010). Cet oxydant peut avoir un impact sur la capsid et sur le génome viral (Nuanualsuwan et Cliver, 2003a; Wigginton *et al.*, 2012). Dans notre étude, aucune diminution du signal de RT-qPCR n'a été constatée pour le bactériophage MS2, et pour le MNV la diminution est observée uniquement à la plus forte concentration (50 mg/L) confirmant un impact possible de l'hypochlorite de sodium sur le génome viral. Comme pour la température, l'optimisation des conditions de traitement doit être précisée afin de définir celles qui altéreront la capsid virale. L'absence ou la faible présence de particules virales observées en MET et/ou une de dégradation du génome viral par la RNase vont impliquer une dégradation de la capsid. Nos travaux démontrent deux points importants, d'une part l'existence d'une concentration critique d'hypochlorite de sodium à partir de laquelle la particule virale est déstructurée avec son génome totalement accessible et d'autre part des propriétés physico-chimiques différentes entre les virus natifs et les virus traités à des concentrations d'hypochlorite de sodium inférieure à celle critique.

Pour le MNV une concentration critique a été définie supérieure ou égale à 50 mg/L dans nos conditions expérimentales. Au contraire, notre étude n'a pas conclu sur l'existence d'une concentration critique d'hypochlorite de sodium pour le bactériophage MS2. Néanmoins les concentrations virales utilisées ( $10^{14}$  particules infectieuses par millilitre) pourraient être trop importantes et expliquer l'absence de dégradation de la capsid malgré des concentrations en hypochlorite de sodium élevées. La concentration critique pour le bactériophage MS2 dans nos conditions serait alors supérieure à 200 mg/L. Cette concentration importante en virus infectieux était toutefois nécessaire pour mettre en place certaines de nos méthodes d'analyses. Dans la littérature, on retrouve peu études qui ont utilisé la RNase après traitement à l'hypochlorite de sodium. Ce traitement a été improductif au cours de deux études pour le Tulane virus pour une concentration d'hypochlorite de sodium de 300 mg/L et pour l'adénovirus ou le MNV pour une concentration de 2,5 mg/L (de Abreu Corrêa *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015). Pourtant, la RNase fut efficace pour le VHA après chloration avec seulement 1,20-1,25 mg/L (Nuanualsuwan et Cliver, 2003). L'efficacité de la RNase semble dépendre des concentrations et/ou des temps de contacts utilisés dans les différentes études, mais également du milieu employé et de la concentration virale.

En effet, de Abreu Corrêa *et al.* (2012) ont utilisé une concentration virale supérieure à  $10^8$  particules virales infectieuses par millilitre, mais Nuanualsuwan et Cliver (2003a),  $10^3$ , ce qui pourrait expliquer l'absence d'impact de l'hypochlorite de sodium sur l'accessibilité du génome dans leur étude. Au contraire, l'utilisation du PMA ou de l'EMA, après chloration semble prometteuse pour différents virus comme le MNV, l'adénovirus, le poliovirus ou le rotavirus (Karim *et al.*, 2015; Leifels *et al.*, 2015; Parshionikar *et al.*, 2010; Prevost *et al.*, 2016). L'oxydation de la capsidite par l'hypochlorite de sodium pourrait être la cause d'une modification de la perméabilité de la capsidite virale. Elle ne laisserait passer qu'une molécule de petite taille, comme les intercalants ( $\approx 500$  Da pour le PMA) mais bloquerait la RNase ( $\approx 14$  kDa).

Aux concentrations d'hypochlorite de sodium inférieures à la valeur critique ( $< 50$  mg/L pour le MNV et  $> 200$  mg/L pour le bactériophage MS2) les virus non-infectieux restent structurés sous forme de particules virales avec un génome inaccessible aux RNases. Comme pour la chaleur, ces particules sont responsables de la surestimation des virus infectieux par RT-PCR. La taille et l'aspect du bactériophage MS2 après chloration reste similaire à celle du bactériophage natif. Ainsi, des particules virales structurées sont encore observées pour le bactériophage MS2 par MET. A la différence des conclusions après exposition à la chaleur, la perte d'adhésion à la cellule hôte n'est liée qu'en partie à la perte du caractère infectieux après chloration. L'effet sur la capsidite est donc démontré mais les virus capables d'adhérer à leur cellule hôte peuvent être altérés au niveau de la capsidite, du génome ou des deux. Ces mêmes conclusions ont été émises par différentes études sur le poliovirus, l'adénovirus et le bactériophage MS2 (O'Brien et Newman, 1979; Page *et al.*, 2010; Wigginton *et al.*, 2012). D'autres étapes du cycle viral sont donc impactées par le traitement. Pour Wigginton *et al.* (2012), l'inactivation du bactériophage MS2 par l'hypochlorite de sodium est due à la perte de capacité d'injection et de réplication du génome viral. Quant à l'adénovirus, les étapes d'injection et de transport du génome seraient affectées par l'hypochlorite de sodium (Page *et al.*, 2010). La capsidite et le génome sont donc impactés par l'hypochlorite de sodium, les propriétés de surface peuvent donc l'être par ce traitement. La charge électrostatique globale et l'hydrophobie sont, comme pour la chaleur, évaluées de manière indépendante.

Les éventuelles modifications de la charge par l'hypochlorite de sodium ont ainsi été estimées. L'oxydation des acides aminés est un processus complexe et peu d'informations sont actuellement connues sur les produits formés après oxydation, en particulier sur une protéine entière. De plus, l'environnement locale de la réaction avec l'oxydant, l'hypochlorite de sodium dans notre cas, semble cruciale mais également la séquence et la structure protéique qui pourrait faire varier la forme oxydée de l'acide aminé (Pattison *et al.*, 2012). En effet, le tryptophane donne le 3-chloroindolenine si il est encadré par une glycine et le 2-hydroxytryptophane en l'absence de glycine (Drożdż *et al.*, 1988; Fu *et al.*, 2004; Pattison *et al.*, 2012). On peut noter également que selon

l'oxydant utilisé différentes formes d'acides aminés sont constituées. Par exemple, la tyrosine et le tryptophane forment après oxydation par l'hypochlorite de sodium ou le dioxyde de chlore, respectivement, du 3-chlorotyrosine ou du 3,4-dihydroxyphenylalanine et du 2-hydroxytryptophane ou N-formylkynurenine (Chapman *et al.*, 2002; Ogata, 2007; Winterbourn et Kettle, 2000). Certaines oxydations des acides aminés pourraient diminuer la charge de la capsid. Ainsi, l'oxydation de la lysine et de l'arginine, acides aminés chargés positivement à pH neutre et acide ( $pK_a > 10$ ), peut former des groupements carbonyles et diminuer la charge positive en surface de la capsid et ainsi augmenter la charge négative (Drożdż *et al.*, 1988; Hawkins *et al.*, 2003; Pattison *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 1973; Schraufstatter *et al.*, 1990). D'autres oxydations d'acides aminés ne modifierait pas la charge comme pour la thréonine ou la tyrosine, acides aminés non chargés quel que soit le pH et ce même après oxydation par l'hypochlorite de sodium. Une seule étude s'est intéressée aux modifications de la charge après chloration. Dans celle-ci, seul le  $pI$  du poliovirus a été évalué et aucune modification de celui-ci n'a été notée après chloration (O'Brien et Newman, 1979). La modification du  $pI$  n'est qu'une information qualitative. Il est possible que la charge soit modifiée à pH 7 sans pour autant voir une variation de  $pI$ . Les deux informations ne sont donc pas forcément divergentes. Dans le cas du bactériophage MS2, la charge globale négative est augmentée après chloration. Les profils de mobilité électrophorétique et d'adhésion sur les billes chargées positivement ou négativement sont ainsi modifiés. Les profils d'adhésion sur les billes chargées positivement montrent une augmentation de l'adhésion sur celle-ci après chloration alors que le phénomène inverse est observé avec les billes chargées négativement. Selon le concept des particules molles, la diminution de la pente des profils de mobilité électrophorétique indique une baisse de la densité de charge du bactériophage MS2 (Langlet *et al.*, 2008b). Cette baisse de la densité de charge peut être liée à une augmentation de la charge négative externe et/ou à une diminution de la charge interne. D'après notre seconde méthode (adhésion sur billes chargées), la baisse de densité de charge serait plutôt liée à une hausse de la charge externe négative des bactériophages MS2. Concernant le MNV, les profils d'adhésion sur les billes chargées n'ont montré aucune différence de profils après chloration. La charge globale du MNV ne semble donc pas modifiée par l'hypochlorite de sodium dans nos conditions mais les profils de mobilité électrophorétique n'ont pas pu être réalisés pour confirmer ces résultats. Des différences entre les acides aminés accessibles à l'oxydation à la surface peuvent expliquer cette différence d'impact de l'hypochlorite de sodium sur la charge de nos deux virus.

L'hydrophobie a ensuite été évaluée après exposition de nos deux virus modèles à l'hypochlorite de sodium. Aucune information sur une éventuelle modification de l'hydrophobie de particules virales après chloration n'est actuellement donnée dans la littérature. Dans notre étude, aucune modification de l'hydrophobie n'a été observée et ce malgré l'utilisation de deux méthodes



indépendantes (adhésion sur billes hydrophobes et fixation de la sonde hydrophobe). Malgré cette absence de modification de l'hydrophobie, une information semble primordiale concernant le bactériophage MS2, résultat obtenu en étudiant l'hydrophobie par la fixation de la sonde hydrophobe (SYPRO). Après exposition à l'hypochlorite de sodium, le  $T_m$  du bactériophage MS2, initialement de 66°C, est diminué de manière concentration-dépendant respectivement à 63°C et 61°C pour 100 mg/L et 200 mg/L. L'hypothèse d'une fragilité de la capsidie avec une sensibilité plus importante vis-à-vis de la température a, par conséquent, été émise (Robinson *et al.*, 2014). L'utilisation séquentielle d'un traitement par l'hypochlorite de sodium puis par la chaleur a donc été évalué mais uniquement pour le bactériophage MS2.

Le traitement séquentiel par l'hypochlorite de sodium puis par la chaleur a été réalisé et son impact évalué uniquement sur le bactériophage MS2. Un effet synergique est observé sur le bactériophage MS2. En effet, une inactivation de  $-1,0 \log_{10}$  à 60°C et de  $-1,2 \log_{10}$  avec 100 mg/L a été obtenu alors que  $-3,2 \log_{10}$  est obtenu avec les deux traitements successifs. De plus, on peut noter que l'aspect des phages est conservé dans ces conditions. Cette synergie d'inactivation avec ces deux traitements a été également montrée sur des bactéries (Choi *et al.*, 2016; Delaquis *et al.*, 2004; Klaiber *et al.*, 2005). Cet effet synergique est également observé pour l'hydrophobie des particules virales restées infectieuses. L'oxydation de la capsidie par l'hypochlorite de sodium provoque donc une fragilisation de celle-ci. La chaleur va ensuite changer la conformation de la capsidie virale avec l'expression de domaines hydrophobes en surface de manière plus importante avec une capsidie fragilisée par l'oxydation de l'hypochlorite de sodium. Au vu de ces résultats, un intérêt pour l'industrie est possible avec des applications pour les traitements technologiques des aliments. La diminution de temps, de concentration ou de température des traitements inactivant peuvent réduire entre autre les coûts de traitement des aliments frais (salade, fruit...) incluant les sous-produits potentiellement formés comme les sous-produits halogénés après chloration. Les propriétés sensorielles de la carotte et de la laitue sont, en effet, conservées après ces deux traitements (Delaquis *et al.*, 2004; Klaiber *et al.*, 2005). Bien évidemment, de nombreuses autres combinaisons de traitements (physique et/ou chimique) peuvent être évaluées et utilisées comme l'ont par exemple été l'hypochlorite de sodium et les rayonnements UVs sur la fraise ou la myrtille (Kim *et al.*, 2010; Meireles *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016).

L'ozone est historiquement utilisé dans le traitement des eaux et son efficacité est de plus en plus évaluée au sein de l'industrie agro-alimentaire (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; von Gunten, 2007). Néanmoins, peu d'information sont actuellement disponibles quant à son action sur différents pathogènes (bactéries, virus...) selon la matrice testée (salade, fruits rouges...). Les avantages de l'ozone comparés au chlore sont: (i) un oxydant plus fort, (ii) des produits de décomposition moins

dangereux pour l'environnement (bromate seulement), (iii) une demi-vie faible permettant son utilisation directe sur des aliments ou des surfaces alimentaires et (iv) une absence d'altération du goût de l'eau par exemple (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; von Gunten, 2003b). Son application nécessite, cependant, de bons équipements de protection, collectifs et individuels. Il est en effet facile d'être en contact avec l'ozone sous forme gazeux ou aqueux. L'utilisation de l'ozone est plus coûteuse que celle du chlore d'où son faible emploi dans les industries agro-alimentaire. L'impact de l'ozone a été évalué sur une matrice framboise considérée comme fragile vis-à-vis des traitements que sont la chaleur ou le chlore, avec l'utilisation du MNV comme modèle du HuNoV et la souche vaccinale du VHA couramment utilisée comme modèle du VHA sauvage. L'utilisation de l'ozone sur des aliments implique le suivi de son impact sur une dégradation potentielle après traitement, une conservation altérée et sur la communauté bactérienne naturellement présente sur l'aliment. Son effet virucide sur les virus entériques dans l'eau est plutôt bien décrit dans la littérature (Lim *et al.*, 2010b; Shin et Sobsey, 2003; Thurston-Enriquez *et al.*, 2005b). Seules deux études sur des matrices alimentaires ont décrits l'inactivation virale après ozonation et concernaient la salade, l'oignon et la fraise (Hirneisen *et al.*, 2011; Predmore *et al.*, 2015). La préservation de la framboise a été démontrée juste après le traitement et sur plusieurs jours à 4°C. La flore bactérienne semble elle aussi peu impactée par le traitement à l'ozone confirmant différentes études sur d'autres aliments, la fraise ou la salade (Aguayo *et al.*, 2006; Qiang *et al.*, 2005; Rodgers *et al.*, 2004). Aucune information n'était disponible quant à l'inactivation du MNV et du VHA sur la framboise. D'après nos résultats sur la framboise, le VHA est bien plus résistant que le MNV. Aucune inactivation n'a été notée pour le VHA, le MNV est quant à lui très fortement inactivé. De plus l'inactivation du MNV sur la framboise est plus importante qu'en milieu aqueux (tampon PBS). L'hypothèse d'un effet synergique sur le MNV entre la matrice et l'ozone est donc émise. Un effet synergique sur des virus entre la framboise et d'autres traitements comme la chaleur ont été démontrés dans la littérature (Deboosere *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2016). Néanmoins, cet effet n'existe pas pour le VHA dans nos expérimentations. Les concentrations en ozone gazeux pourraient être le facteur limitant pour constater cet effet synergique sur le VHA. L'ozone paraît prometteur comme traitement virucide sur les framboises mais les conditions expérimentales doivent être optimisées pour l'inactivation du VHA. Dans ce cas, les industries agro-alimentaires pourraient considérer l'ozone comme un procédé alternatif de désinfection en particulier pour les matrices fragiles (fruits rouges, salades...).

*En conclusion, notre étude apporte de nouvelles informations sur l'inactivation et l'évolution des propriétés de surface de particules virales durant un traitement inactivant comme la chaleur, l'hypochlorite de sodium ou l'ozone. En premier lieu, la présence de particules virales non-infectieuses contenant un génome inaccessible aux RNases et détectable par biologie moléculaire après les différents traitements a été démontré. Dans l'environnement ou après traitement, la détection par RT-PCR ou PCR révèle donc majoritairement des particules non-infectieuses. Au-delà de la température ou de la concentration critique d'hypochlorite de sodium, une déstructuration de la capsid e a lieu avec une libération du génome qui permet l'utilisation de méthodes de prétraitement comme la RNase ou le PMA/EMA afin de ne détecter que du virus infectieux par biologie moléculaire. Néanmoins, la définition d'une concentration critique d'hypochlorite de sodium reste complexe et très dépendante des conditions expérimentales (virus, concentration virale, milieu...). En dessous de la température critique, des changements conformationnels de la capsid e s'opèrent et une augmentation de l'hydrophobie est observée pour les particules restées infectieuses en particulier. Cette modification de l'hydrophobie reste à caractériser pour les virus entériques pathogènes. Pour l'hypochlorite de sodium, la concentration inférieure à la valeur critique implique une fragilisation de la capsid e et une éventuelle modification de charge qui serait virus dépendante. La fragilisation de la capsid e pourrait être utile pour des combinaisons de traitements en particulier pour les aliments. L'ozone semble, lui, une alternative pertinente à l'hypochlorite de sodium pour les industriels de l'agro-alimentaire. Néanmoins, les conditions de traitement doivent être optimisées pour l'inactivation du virus de l'hépatite A.*

## Perspectives

La première partie des perspectives abordera les éventuelles connaissances à approfondir sur les mécanismes d'inactivation virale dans un cadre de recherche dite « fondamentale ». La seconde se consacrera à une(des) application(s) future(s) des différentes informations fournies par ce travail de recherche. Il s'agit dans ce cas de recherche dite « appliquée ».

En évaluant les propriétés de surface de virus modèles au cours de l'inactivation par différents traitements, nous avons mis en évidence certains points comme la modification de l'hydrophobie après exposition à la chaleur. Néanmoins, aucune information quantitative ou structurale sur ses modifications n'est fournie dans notre travail. L'utilisation de méthodes innovantes que sont (i) la microscopie à force atomique (AFM), (ii) la microbalance à quartz et (iii) la spectrométrie de masse pourrait améliorer la caractérisation et la quantification des interactions électrostatiques et hydrophobes. La fonctionnalisation de pointes AFM avec des groupements plus ou moins hydrophobes et/ou chargés voire l'utilisation de supports avec différentes caractéristiques de charge et/ou d'hydrophobie permettrait de caractériser ces modifications de charge et/ou d'hydrophobie des virus au cours du processus d'inactivation. De la même manière, un support fonctionnalisé (plus ou moins chargé et/ou hydrophobe) sur la microbalance à quartz pourrait permettre de caractériser la quantité de virus capables de s'adsorber sur ce support selon le traitement appliqué aux virus. Ces deux méthodes peuvent également être utilisées après chloration pour mieux caractériser la modification de la charge du bactériophage MS2 et détecter un possible changement de charge pour le MNV. La spectrométrie de masse serait complémentaire à ces deux méthodes et permettrait en parallèle l'identification de zones voir d'acides aminés oxydés par l'hypochlorite de sodium. Pour l'étude des éventuelles modifications structurales, l'utilisation de méthodes complémentaires comme la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, en anglais), la diffusion des neutrons aux petits angles (SANS, en anglais), la cristallographie (diffraction aux rayons X) ou encore la cryo-microscopie électronique sont nécessaires. Ces techniques pourraient être pratiquées en premier pour le bactériophage MS2 car sa structure est assez bien caractérisée. Néanmoins, des méthodes de concentration et de purification seront indispensables pour envisager ces techniques pour le MNV. D'un autre côté, les avancées de la culture cellulaire du HuNoV de 2015 et 2016 pourraient permettre de transposer très rapidement les résultats obtenus avec nos deux virus modèles sur le HuNoV.

D'un point de vue appliqué, il serait judicieux avant tout de confirmer les effets synergiques de l'hypochlorite de sodium et de la chaleur sur l'inactivation et l'hydrophobie du MNV. Ensuite, des essais d'inactivation avec ces deux traitements seraient à réaliser sur des matrices complexes

(salades, fruits rouges). Concernant la matrice alimentaire, le suivi de son aspect, de ses propriétés organoleptiques et de sa flore bactérienne naturelle devra être effectué en parallèle des tests d'inactivation. En plus de l'inactivation, l'hydrophobie pour le bactériophage MS2 et le MNV devrait être évaluée après les deux traitements sur ces mêmes matrices complexes. En fonction de ces résultats, la détection spécifique de virus infectieux par l'hydrophobie pourrait être possible après les deux traitements. Des essais similaires en remplaçant l'hypochlorite de sodium par l'ozone pourront être menés en parallèle pour nos deux virus modèles.

*Références*

- Abd El Galil, K. H., El Sokkary, M. A., Kheira, S. M., Salazar, A. M., Yates, M. V, Chen, W. et Mulchandani, A. (2004) Combined immunomagnetic separation-molecular beacon-reverse transcription-PCR assay for detection of hepatitis A virus from environmental samples. *Applied and environmental microbiology*, vol. 70, n°7, p. 4371-4.
- Aguayo, E., Escalona, V. H. et Artés, F. (2006) Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 39, n°2, p. 169-177.
- Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P. et Rouxhet, P. G. (2001) Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of microbiological methods*, vol. 45, n°2, p. 119-26.
- Akpinar, F. et Yin, J. (2015) Characterization of vesicular stomatitis virus populations by tunable resistive pulse sensing. *Journal of virological methods*, vol. 218, p. 71-6.
- Al-Nasrawi, K. K., Al Diwan, J. K., Al-Hadithi, T. S. et Saleh, A. M. (2010) Viral hepatitis E outbreak in Al-Sadr city, Baghdad, Iraq. *Eastern Mediterranean health journal*, vol. 16, n°11, p. 1128-32.
- Armanious, A., Aeppli, M., Jacak, R., Refardt, D., Sigstam, T., Kohn, T. et Sander, M. (2016) Viruses at Solid-Water Interfaces: A Systematic Assessment of Interactions Driving Adsorption. *Environmental science & technology*, vol. 50, n°2, p. 732-43.
- Armesto, X. L., Canle, M. L. et Santaballa, J. A. (1993)  $\alpha$ -amino acids chlorination in aqueous media. *Tetrahedron*, vol. 49, n°1, p. 275-284.
- Ashcroft, A. E., Lago, H., Macedo, J. M. B., Horn, W. T., Stonehouse, N. J. et Stockley, P. G. (2005) Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 5, n°12, p. 2034-41.
- Atmar, R. L., Opekun, A. R., Gilger, M. a, Estes, M. K., Crawford, S. E., Neill, F. H. et Graham, D. Y. (2008) Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging infectious diseases*, vol. 14, n°10, p. 1553-7.
- Attinti, A. R., Wei, J. I. E., Kniel, K., Sims, J. T., Attinti, R., Wei, J. I. E., Kniel, K., Thomas Sims, J. et Jin, Y. (2010) Virus' (MS2, PdbIX174, and Aichi) attachment on sand measured by atomic force microscopy and their transport through sand columns. *Environmental Science and Technology*, vol. 44, n°7, p. 2426-2432.
- Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S. et Middaugh, C. R. (2006) Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, n°28, p. 19478-88.
- Bae, J. et 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*, vol. 74, n°2, p. 477-84.
- Bae, S. et Wuertz, S. (2009) Discrimination of viable and dead fecal Bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, n°9, p. 2940-4.
- Baert, L., Uyttendaele, M., Vermeersch, M., Van Coillie, E. et Debevere, J. (2008a) Survival and transfer of murine norovirus 1, a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach. *Journal of food protection*, vol. 71, n°8, p. 1590-7.
- Baert, L., Wobus, C. E., Van Coillie, E., Thackray, L. B., Debevere, J. et Uyttendaele, M. (2008b) Detection of murine norovirus 1 by using plaque assay, transfection assay, and real-time reverse transcription-PCR before and after heat exposure. *Applied and environmental microbiology*, vol.

- 74, n°2, p. 543-6.
- Bales, R. C., Li, S., Maguire, K. M., Yahya, M. T. et Gerba, C. P. (1993) MS-2 and poliovirus transport in porous media: Hydrophobic effects and chemical perturbations. *Water Resources Research*, vol. 29, n°4, p. 957-963.
- Barardi, C. R., Emslie, K. R., Vesey, G. et Williams, K. L. (1998) Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. *Journal of virological methods*, vol. 74, n°1, p. 31-8.
- Barbeau, B., Desjardins, R., Mysore, C. et Prévost, M. (2005) Impacts of water quality on chlorine and chlorine dioxide efficacy in natural waters. *Water research*, vol. 39, n°10, p. 2024-33.
- Beckett, D., Wu, H. N. et Uhlenbeck, O. C. (1988) Roles of operator and non-operator RNA sequences in bacteriophage R17 capsid assembly. *Journal of Molecular Biology*, vol. 204, n°4, p. 939-947.
- Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Poot, R. et van Duin, J. (1996) Secondary structure model for the first three domains of Q beta RNA. Control of A-protein synthesis. *Journal of molecular biology*, vol. 256, n°1, p. 8-19.
- Beekwilder, M. J., Nieuwenhuizen, R. et van Duin, J. (1995) Secondary structure model for the last two domains of single-stranded RNA phage Q beta. *Journal of molecular biology*, vol. 247, n°5, p. 903-17.
- Beer, K. D., Gargano, J. W., Roberts, V. A., Hill, V. R., Garrison, L. E., Kutty, P. K., Hilborn, E. D., Wade, T. J., Fullerton, K. E. et Yoder, J. S. (2015) Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated With Drinking Water - United States, 2011-2012. *American Journal of Transplantation*, vol. 15, n°12, p. 3260-3267.
- Begier, E. M., Oberste, M. S., Landry, M. L., Brennan, T., Mlynarski, D., Mshar, P. a, Frenette, K., Rabatsky-Ehr, T., Purviance, K., Nepal, A., Nix, W. A., Pallansch, M. a, Ferguson, D., Cartter, M. L. et Hadler, J. L. (2008) An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 47, n°5, p. 616-623.
- Belliot, G., Lavaux, A., Souihel, D., Agnello, D. et Pothier, P. (2008) Use of murine norovirus as a surrogate to evaluate resistance of human norovirus to disinfectants. *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, n°10, p. 3315-8.
- Belnap, D. M., Filman, D. J., Trus, B. L., Cheng, N., Booy, F. P., Conway, J. F., Curry, S., Hiremath, C. N., Tsang, S. K., Steven, a C. et Hogle, J. M. (2000) Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *Journal of virology*, vol. 74, n°3, p. 1342-54.
- Berman, D. et Hoff, J. C. (1984) Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. *Applied and environmental microbiology*, vol. 48, n°2, p. 317-23.
- Bertolotti-Ciarlet, A., Crawford, S. E., Hutson, A. M. et Estes, M. K. (2003) The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of virology*, vol. 77, n°21, p. 11603-15.
- Bertolotti-ciarlet, A., White, L. J., Chen, R., Prasad, V., Estes, M. K. et Prasad, B. V. V. (2002) Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles Structural Requirements for the Assembly of Norwalk Virus-Like Particles. *Journal of virology*, vol. 76, n°8, p. 4044-4055.
- Bertrand, I., Schijven, J. F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, a, de Roda Husman, a M., Myrmel, M., Sellwood, J., Cook, N. et Gantzer, C. (2012) The



- impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of applied microbiology*, vol. 112, n°6, p. 1059-74.
- Biziagos, E., Passagot, J., Crance, J. M. et Deloince, R. (1988) Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water. *Applied and environmental microbiology*, vol. 54, n°11, p. 2705-10.
- Blackburn, B. G., Craun, G. F., Yoder, J. S., Hill, V., Calderon, R. L., Chen, N., Lee, S. H., Levy, D. A. et Beach, M. J. (2004) Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, vol. 53, n°8, p. 23-45.
- Blank, C. A., Anderson, D. A., Beard, M. et Lemon, S. M. (2000) Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *Journal of virology*, vol. 74, n°14, p. 6476-84.
- Bollback, J. P. et Huelsenbeck, J. P. (2001) Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae). *Journal of molecular evolution*, vol. 52, n°2, p. 117-28.
- Bolton, S. L., Kotwal, G., Harrison, M. A., Law, S. E., Harrison, J. A. et Cannon, J. L. (2013) Sanitizer efficacy against murine norovirus, a surrogate for human norovirus, on stainless steel surfaces when using three application methods. *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, n°4, p. 1368-77.
- Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M. P., Oberti, S. et Gantzer, C. (2012) Removal of MS2, Q $\beta$  and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water research*, vol. 46, n°8, p. 2651-64.
- Boxman, I. L. a, Tilburg, J. J. H. C., Te Loeke, N. a J. M., Vennema, H., Jonker, K., de Boer, E. et Koopmans, M. (2006) Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *International journal of food microbiology*, vol. 108, n°3, p. 391-6.
- Bozkurt, H., D'Souza, D. H. et Davidson, P. M. (2013) Determination of the thermal inactivation kinetics of the human norovirus surrogates, murine norovirus and feline calicivirus. *Journal of food protection*, vol. 76, n°1, p. 79-84.
- Bozkurt, H., D'Souza, D. H. et Davidson, P. M. (2014) A comparison of the thermal inactivation kinetics of human norovirus surrogates and hepatitis A virus in buffered cell culture medium. *Food microbiology*, vol. 42, p. 212-7.
- Bozkurt, H., D'Souza, D. H. et Davidson, P. M. (2015) Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods. *Journal of food protection*, vol. 78, n°8, p. 1597-617.
- Breindl, M. (1971) The structure of heated poliovirus particles. *The Journal of general virology*, vol. 11, n°3, p. 147-56.
- Brescia, C. C., Griffin, S. M., Ware, M. W., Varughese, E. a., Egorov, A. I. et Villegas, E. N. (2009) *Cryptosporidium propidium* monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, n°21, p. 6856-63.
- Bundy, B. C., Franciszkowicz, M. J. et Swartz, J. R. (2008) *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 100, n°1, p. 28-37.
- Busscher, H. J., van de Belt-Gritter, B. et van der Mei, H. C. (1995) Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon

- droplets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 5, n°3-4, p. 111-116.
- Calder, L., Simmons, G., Thornley, C., Taylor, P., Pritchard, K., Greening, G. et Bishop, J. (2003) An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiology and infection*, vol. 131, n°1, p. 745-51.
- Calgua, B., Barardi, C. R. M., Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J. et Girones, R. (2011) Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of virological methods*, vol. 171, n°1, p. 1-7.
- Cantera, J. L., Chen, W. et Yates, M. V (2010) Detection of infective poliovirus by a simple, rapid, and sensitive flow cytometry method based on fluorescence resonance energy transfer technology. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, n°2, p. 584-8.
- Cao, J., Wang, Y., Song, H., Meng, Q., Sheng, L., Bian, T., Mahemuti, W., Yierhali, A., Omata, M. et Bi, S. (2009) Hepatitis A outbreaks in China during 2006: application of molecular epidemiology. *Hepatology international*, vol. 3, n°2, p. 356-63.
- Carvalho, C., Thomas, H., Balogun, K., Tedder, R., Pebody, R., Ramsay, M. et Ngui, S. (2012) A possible outbreak of hepatitis A associated with semi-dried tomatoes, England, July-November 2011. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, vol. 17, n°6, p. 4-7.
- Caspar, D. L. et Klug, A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 27, p. 1-24.
- Caul, E. O. (1994) Small round structured viruses: airborne transmission and hospital control. *Lancet*, vol. 343, n°8908, p. 1240-2.
- CDC (2015a) <http://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks.html>.
- CDC (2015b) FOOD Tool, [www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/).
- Chang, B., Sugiyama, K., Taguri, T., Amemura-Maekawa, J., Kura, F. et Watanabe, H. (2009) Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, n°1, p. 147-53.
- Chapman, A. L. P., Hampton, M. B., Senthilmohan, R., Winterbourn, C. C. et Kettle, A. J. (2002) Chlorination of bacterial and neutrophil proteins during phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n°12, p. 9757-9762.
- Chen, Y. S. et Vaughn, J. M. (1990) Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine dioxide. *Applied and environmental microbiology*, vol. 56, n°5, p. 1363-6.
- Cheng, M. S., Lau, S. H., Chan, K. P., Toh, C. S. et Chow, V. T. (2015) Impedimetric cell-based biosensor for real-time monitoring of cytopathic effects induced by dengue viruses. *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 70, p. 74-80.
- Chi, H., Haagsma, E. B., Riezebos-Brilman, A., van den Berg, A. P., Metselaar, H. J. et de Knegt, R. J. (2014) Hepatitis A related acute liver failure by consumption of contaminated food. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, vol. 61, n°3, p. 456-8.
- Choi, S., Beuchat, L. R., Kim, H. et Ryu, J. H. (2016) Viability of sprout seeds as affected by treatment with aqueous chlorine dioxide and dry heat, and reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on pak choi seeds by sequential treatment with chlorine dioxide, drying, and dry heat. *Food Microbiology*, vol. 54, p. 127-132.
- Chow, M., Newman, J. F., Filman, D., Hogle, J. M., Rowlands, D. J. et Brown, F. (1987) Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, vol. 327, n°6122, p. 482-

6.

- Chung, L., Bailey, D., Leen, E. N., Emmott, E. P., Chaudhry, Y., Roberts, L. O., Curry, S., Locker, N. et Goodfellow, I. G. (2014) Norovirus translation requires an interaction between the C Terminus of the genome-linked viral protein VPg and eukaryotic translation initiation factor 4G. *The Journal of biological chemistry*, vol. 289, n°31, p. 21738-50.
- Cimpmperman, P. et Matulis, D. (2011) Protein thermal denaturation measurements via a fluorescent dye. *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement and Modelling*, n°22, p. 247-273.
- Clarke, I. N. et Lambden, P. R. (2000) Organization and expression of calicivirus genes. *The Journal of infectious diseases*, vol. 181 Suppl, p. S309-16.
- Cliver, D. O. (2009) Capsid and Infectivity in Virus Detection. *Food and environmental virology*, vol. 1, n°3-4, p. 123-128.
- Cockayne, E. A. (1912) Catarrhal jaundice, sporadic and epidemic, and its relation to acute yellow atrophy of the liver. *Qjm*, vol. os6, n°1, p. 1-29.
- Cornax, R., Moriñigo, M. A., Paez, I. G., Muñoz, M. A. et Borrego, J. J. (1990) Application of direct plaque assay for detection and enumeration of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* from contaminated-water samples. *Applied and environmental microbiology*, vol. 56, n°10, p. 3170-3.
- Coudray-Meunier, C., Fraise, A., Martin-Latil, S., Delannoy, S., Fach, P. et Perelle, S. (2016) A Novel High-Throughput Method for Molecular Detection of Human Pathogenic Viruses Using a Nanofluidic Real-Time PCR System. *PloS one*, vol. 11, n°1, p. e0147832.
- Coudray-Meunier, C., Fraise, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P. et Perelle, S. (2015) A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 201, p. 17-26.
- Croci, L., Ciccozzi, M., De Medici, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A. et Toti, L. (1999) Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. *Journal of applied microbiology*, vol. 87, n°6, p. 884-8.
- Cromeans, T. L., Kahler, A. M. et Hill, V. R. (2010) Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, n°4, p. 1028-1033.
- Cromeans, T., Park, G. W., Costantini, V., Lee, D., Wang, Q., Farkas, T., Lee, A. et Vinjé, J. (2014) Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Applied and environmental microbiology*, vol. 80, n°18, p. 5743-51.
- Curry, S., Chow, M. et Hogle, J. M. (1996) The poliovirus 135S particle is infectious. *Journal of virology*, vol. 70, n°10, p. 7125-31.
- Daniels, N. a, Bergmire-Sweat, D. a, Schwab, K. J., Hendricks, K. a, Reddy, S., Rowe, S. M., Fankhauser, R. L., Monroe, S. S., Atmar, R. L., Glass, R. I. et Mead, P. (2000) A foodborne outbreak of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses: first molecular traceback to deli sandwiches contaminated during preparation. *The Journal of infectious diseases*, vol. 181, n°4, p. 1467-1470.
- Date, T. (1979) Kinetic studies of the interaction between MS2 phage and F pilus of *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 96, n°1, p. 167-75.

- David, S. T., McIntyre, L., MacDougall, L., Kelly, D., Liem, S., Schallié, K., McNabb, A., Houde, A., Mueller, P., Ward, P., Trottier, Y.-L. et Brassard, J. (2007) An outbreak of norovirus caused by consumption of oysters from geographically dispersed harvest sites, British Columbia, Canada, 2004. *Foodborne pathogens and disease*, vol. 4, n°3, p. 349-58.
- de Abreu Corrêa, A., Carratala, A., Barardi, C. R. M., Calvo, M., Girones, R. et Bofill-Mas, S. (2012) Comparative inactivation of murine norovirus, human adenovirus, and human JC polyomavirus by chlorine in seawater. *Applied and environmental microbiology*, vol. 78, n°18, p. 6450-7.
- de Paula, V. S. (2012) Laboratory diagnosis of hepatitis A. *Future Virology*, vol. 7, n°5, p. 461-472.
- de Roda Husman, a M., Lodder, W. J., Rutjes, S. a, Schijven, J. F. et Teunis, P. F. M. (2009) Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwaters, using PCR and cell culture. *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, n°4, p. 1050-7.
- de Rougemont, a, Ruvoen-Clouet, N., Simon, B., Estienney, M., Elie-Caille, C., Aho, S., Pothier, P., Le Pendu, J., Boireau, W. et Belliot, G. (2011) Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. *Journal of virology*, vol. 85, n°9, p. 4057-70.
- Debing, Y., Neyts, J. et Thibaut, H. J. (2014) Molecular biology and inhibitors of hepatitis A virus. *Medicinal research reviews*, vol. 34, n°5, p. 895-917.
- Deboosere, N., Legeay, O., Caudrelier, Y. et Lange, M. (2004) Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 93, n°1, p. 73-85.
- 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. et Vialette, M. (2012) Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food microbiology*, vol. 32, n°1, p. 48-56.
- Deboosere, N., Pinon, A., Delobel, A., Temmam, S., Morin, T., Merle, G., Blaise-Boisseau, S., Perelle, S. et Vialette, M. (2010) A predictive microbiology approach for thermal inactivation of Hepatitis A virus in acidified berries. *Food microbiology*, vol. 27, n°7, p. 962-7.
- Deborde, M. et von Gunten, U. (2008) Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-Kinetics and mechanisms: A critical review. *Water Research*, vol. 42, n°1-2, p. 13-51.
- Delaquis, P. J., Fukumoto, L. R., Toivonen, P. M. . et Cliff, M. A. (2004) Implications of wash water chlorination and temperature for the microbiological and sensory properties of fresh-cut iceberg lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 31, n°1, p. 81-91.
- Dent, K. C., Thompson, R., Barker, A. M., Hiscox, J. a, Barr, J. N., Stockley, P. G. et Ranson, N. a (2013) The asymmetric structure of an icosahedral virus bound to its receptor suggests a mechanism for genome release. *Structure (London, England : 1993)*, vol. 21, n°7, p. 1225-34.
- Di Martino, B. et Marsilio, F. (2010) Feline calicivirus VP2 is involved in the self-assembly of the capsid protein into virus-like particles. *Research in Veterinary Science*, vol. 89, n°2, p. 279-281.
- DiCaprio, E., Ma, Y., Purgianto, A., Hughes, J. et Li, J. (2012) Internalization and dissemination of human norovirus and animal caliciviruses in hydroponically grown romaine lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, n°17, p. 6143-6152.
- Dika, C., Duval, J. F. L., Francius, G., Perrin, A. et Gantzer, C. (2015) Isoelectric point is an inadequate descriptor of MS2, Phi X 174 and PRD1 phages adhesion on abiotic surfaces. *Journal of colloid and interface science*, vol. 446, p. 327-34.

- Dika, C., Duval, J. F. L., Ly-Chatain, H. M., Merlin, C. et 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*, vol. 77, n°14, p. 4939-48.
- Dika, C., Gantzer, C., Perrin, a et Duval, J. F. L. (2013a) Impact of the virus purification protocol on aggregation and electrokinetics of MS2 phages and corresponding virus-like particles. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, vol. 15, n°15, p. 5691-700.
- Dika, C., Ly-Chatain, M. H., Francius, G., Duval, J. F. L. et Gantzer, C. (2013b) 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*, vol. 435, p. 178-187.
- Dimmock, N. J. (1967) Differences between the thermal inactivation of picornaviruses at « high » and « low » temperatures. *Virology*, vol. 31, n°2, p. 338-53.
- Divizia, M., Gabrieli, R., Donia, D., Macaluso, A., Bosch, A., Guix, S., Sánchez, G., Villena, C., Pintó, R. M., Palombi, L., Buonomo, E., Cenko, F., Leno, L., Bebeci, D. et Bino, S. (2004) Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, vol. 50, n°1, p. 57-61.
- Donnan, E. J., Fielding, J. E., Gregory, J. E., Lalor, K., Rowe, S., Goldsmith, P., Antoniou, M., Fullerton, K. E., Knope, K., Copland, J. G., Bowden, D. S., Tracy, S. L., Hogg, G. G., Tan, A., Adamopoulos, J., Gaston, J. et Vally, H. (2012) A multistate outbreak of hepatitis A associated with semidried tomatoes in Australia, 2009. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 54, n°6, p. 775-81.
- Doré, W. J., Henshilwood, K. et Lees, D. N. (2000) Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Applied and environmental microbiology*, vol. 66, n°4, p. 1280-5.
- Dotzauer, a, Gebhardt, U., Bieback, K., Götcke, U., Kracke, A., Mages, J., Lemon, S. M. et Vallbracht, A. (2000) Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *Journal of virology*, vol. 74, n°23, p. 10950-7.
- Drożdż, R., Naskalski, J. W. et Sznajd, J. (1988) Oxidation of amino acids and peptides in reaction with myeloperoxidase, chloride and hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, vol. 957, n°1, p. 47-52.
- Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F. et Koopmans, M. (2004) Inactivation of caliciviruses. *Applied and environmental microbiology*, vol. 70, n°8, p. 4538-43.
- Duval, J. F. L. et Ohshima, H. (2006) Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 22, n°8, p. 3533-46.
- Dykeman, E. C., Stockley, P. G. et Twarock, R. (2010) Dynamic allostery controls coat protein conformer switching during MS2 phage assembly. *Journal of molecular biology*, vol. 395, n°5, p. 916-23.
- EFSA (2009) Food-borne outbreaks in the European Union in 2007. 129p.
- EFSA (2014a) Tracing of food items in connection to the multinational hepatitis A virus outbreak in Europe. 186p., vol. 12, n°9, p. 1-186.
- EFSA (2014b) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses , Trends and Sources of Zoonoses , Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. 312p.
- EFSA (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic

- agents and food-borne outbreaks in 2013. 162p.
- EFSA (2016) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. 191p.
- EPI (2011) The 10 Pathogen-Food Combinations With The Greatest Burden On Public Health. 70p.
- Escudero-Abarca, B. I., Rawsthorne, H., Goulter, R. M., Suh, S. H. et Jaykus, L. A. (2014) Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: more heat resistant than previously believed? *Food microbiology*, vol. 41, p. 91-5.
- Espinosa, A. C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E. et Arias, C. F. (2008) Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water research*, vol. 42, n°10-11, p. 2618-28.
- Ethelberg, S., Lisby, M., Bottiger, B., Schultz, a C., Villif, a, Jensen, T., Olsen, K. E., Scheutz, F., Kjelso, C. et Muller, L. (2010) Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, vol. 15, n°6, p. 1-3.
- Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., Neill, F. H., Blutt, S. E., Zeng, X.-L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A. R., Burrin, D., Graham, D. Y., Ramani, S., Atmar, R. L. et Estes, M. K. (2016) Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. *Science*, vol. 5211, n°August.
- Falkenhorst, G., Krusell, L., Lisby, M., Madsen, S. B., Böttiger, B. et Mølbak, K. (2005) Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *European communicable disease bulletin*, vol. 10, n°9, p. E050922.2.
- Farkas, K., Pang, L., Lin, S., Williamson, W., Easingwood, R., Fredericks, R., Jaffer, M. a. et Varsani, A. (2013) A Gel Filtration-Based Method for the Purification of Infectious Rotavirus Particles for Environmental Research Applications. *Food and Environmental Virology*, vol. 5, n°4, p. 231-235.
- Farkas, K., Varsani, A. et Pang, L. (2015) Adsorption of Rotavirus, MS2 Bacteriophage and Surface-Modified Silica Nanoparticles to Hydrophobic Matter. *Food and environmental virology*, vol. 7, n°3, p. 261-8.
- Farkas, T., Sestak, K., Wei, C. et Jiang, X. (2008) Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *Journal of virology*, vol. 82, n°11, p. 5408-16.
- Farkas, T., Zhong, W. M., Jing, Y., Huang, P. W., Espinosa, S. M., Martinez, N., Morrow, a L., Ruiz-Palacios, G. M., Pickering, L. K. et Jiang, X. (2004) Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of virology*, vol. 149, n°7, p. 1309-23.
- Feigelstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Zhang, Y. et Kaplan, G. G. (1998) The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *Journal of virology*, vol. 72, n°8, p. 6621-8.
- Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K. L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., Jeong, S., Walker, C., Lanford, R. et Lemon, S. M. (2013) A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature*, vol. 496, n°7445, p. 367-371.
- Finch, G. R. et Fairbairn, N. (1991) Comparative inactivation of poliovirus type 3 and MS2 coliphage in demand-free phosphate buffer by using ozone. *Applied and environmental microbiology*, vol. 57, n°11, p. 3121-6.
- Fittipaldi, M., Pino Rodriguez, N. J., Adrados, B., Agustí, G., Peñuela, G., Morató, J. et Codony, F. (2011) Discrimination of viable *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts by propidium monoazide real-time polymerase chain reaction. *The Journal of eukaryotic microbiology*, vol.

58, n°4, p. 359-64.

- Fittipaldi, M., Rodriguez, N. J. P., Codony, F., Adrados, B., Peñuela, G. a. et Morató, J. (2010) Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, vol. 168, n°1-2, p. 228-232.
- Floyd, R. et Sharp, D. G. (1977) Aggregation of poliovirus and reovirus by dilution in water. *Applied and environmental microbiology*, vol. 33, n°1, p. 159-67.
- Foong-Cunningham, S., Verkaar, E. L. C. et Swanson, K. (2012) 1 - Microbial decontamination of fresh produce. *Microbial Decontamination in the Food Industry*. Woodhead Publishing Limited.
- Fricks, C. E. et Hogle, J. M. (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *Journal of virology*, vol. 64, n°5, p. 1934-45.
- Fu, X., Kao, J. L. F., Bergt, C., Kassim, S. Y., Huq, N. P., D'Avignon, A., Parks, W. C., Mecham, R. P. et Heinecke, J. W. (2004) Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. *The Journal of biological chemistry*, vol. 279, n°8, p. 6209-12.
- Fukuzaki, S. (2006) Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol science*, vol. 11, n°4, p. 147-57.
- Furman, L. M., Maaty, W. S., Petersen, L. K., Ettayebi, K., Hardy, M. E. et Bothner, B. (2009) Cysteine protease activation and apoptosis in Murine norovirus infection. *Virology journal*, vol. 6, p. 139.
- Furuse, K. (1987) Distribution of coliphages in the environment: general considerations. (In: Goyal.).
- Fuster, N., Pintó, R. M., Fuentes, C., Beguiristain, N., Bosch, A. et Guix, S. (2016) Propidium monoazide RTqPCR assays for the assessment of hepatitis A inactivation and for a better estimation of the health risk of contaminated waters. *Water Research*, vol. 101, p. 226-232.
- Gallot, C., Grout, L., Roque-Afonso, A. M., Couturier, E., Carrillo-Santistevé, P., Pouey, J., Letort, M. J., Hoppe, S., Capdepon, P., Saint-Martin, S., De Valk, H. et Vaillant, V. (2011) Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerging infectious diseases*, vol. 17, n°3, p. 566-7.
- Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. et Gantzer, C. (2003) Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, n°7, p. 3965-9.
- Gaudin, R. et Barteneva, N. S. (2015) Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles. *Nature communications*, vol. 6, p. 6022.
- Gerba, C. P. (1984) *Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces*.
- Gerondopoulos, A., Jackson, T., Monaghan, P., Doyle, N. et Roberts, L. O. (2010) Murine norovirus-1 cell entry is mediated through a non-clathrin-, non-caveolae-, dynamin- and cholesterol-dependent pathway. *The Journal of general virology*, vol. 91, n°Pt 6, p. 1428-38.
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. D. A., Hundesa, A., Carratala, A. et Bofill-Mas, S. (2010) Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water research*, vol. 44, n°15, p. 4325-39.
- Glass, P. J., White, L. J., Ball, J. M., Leparac-Goffart, I., Hardy, M. E. et Estes, M. K. (2000) Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *Journal of virology*, vol. 74, n°14, p. 6581-6591.
- Glass, R. I., Parashar, U. D. et Estes, M. K. (2009) Norovirus gastroenteritis. *The New England journal*

- of medicine, vol. 361, n°18, p. 1776-85.
- Golmohammadi, R., Valegård, K., Fridborg, K. et Liljas, L. (1993) The Refined Structure of Bacteriophage MS2 at 2.8 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, vol. 234, n°3, p. 620-639.
- Goodfellow, I., Chaudhry, Y., Gioldasi, I., Gerondopoulos, A., Natoni, A., Labrie, L., Laliberté, J.-F. et Roberts, L. (2005) Calicivirus translation initiation requires an interaction between VPg and eIF 4 E. *EMBO reports*, vol. 6, n°10, p. 968-72.
- Gralla, J., Steitz, J. A. et Crothers, D. M. (1974) Direct physical evidence for secondary structure in an isolated fragment of R17 bacteriophage mRNA. *Nature*, vol. 248, n°5445, p. 204-208.
- Groeneveld, H., Thimon, K. et van Duin, J. (1995) Translational control of maturation-protein synthesis in phage MS2: a role for the kinetics of RNA folding? *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 1, n°1, p. 79-88.
- Guet, L., Desbois, D., Roque-Afonso, A. M., Germain, J. M. et Merle, V. (2011) Investigation of a severe nosocomial outbreak of hepatitis A among healthcare workers and adult patients. *The Journal of hospital infection*, vol. 78, n°1, p. 70-1.
- Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K. et Seydim, a. C. (2004) Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 37, n°4, p. 453-460.
- Gytz, H., Mohr, D., Seweryn, P., Yoshimura, Y., Kutlubaeva, Z., Dolman, F., Chelchessa, B., Chetverin, A. B., Mulder, F. A. A., Brodersen, D. E. et Knudsen, C. R. (2015) Structural basis for RNA-genome recognition during bacteriophage Q $\beta$  replication. *Nucleic acids research*, vol. 43, n°22, p. 10893-10906.
- Hall, A. J., Lopman, B. A., Payne, D. C., Patel, M. M., Gastañaduy, P. A., Vinjé, J. et Parashar, U. D. (2013) Norovirus disease in the United States. *Emerging infectious diseases*, vol. 19, n°8, p. 1198-205.
- Hall, A. J., Wikswo, M. E., Pringle, K., Gould, L. H. et Parashar, U. D. (2014) Vital signs: foodborne norovirus outbreaks - United States, 2009-2012. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, vol. 63, n°22, p. 491-5.
- Halliday, M. L., Kang, L. Y., Zhou, T. K., Hu, M. D., Pan, Q. C., Fu, T. Y., Huang, Y. S. et Hu, S. L. (1991) An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *The Journal of infectious diseases*, vol. 164, n°5, p. 852-9.
- Hamza, I. A., Jurzik, L., Überla, K. et Wilhelm, M. (2011) Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 214, n°6, p. 424-436.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H. et Ohgaki, S. (2010) Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water research*, vol. 44, n°6, p. 1747-52.
- Hardy, M. E. (2005) Norovirus protein structure and function. *FEMS microbiology letters*, vol. 253, n°1, p. 1-8.
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S. et 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*, vol. 81, n°18, p. 6505-6515.
- Havelaar, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., Devleeschauwer, B. et World Health Organization Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group (2015) World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons



- of the Burden of Foodborne Disease in 2010. *PLoS medicine*, vol. 12, n°12, p. e1001923.
- Hawkins, C. L., Pattison, D. I. et Davies, M. J. (2003) Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino acids*, vol. 25, n°3-4, p. 259-74.
- Heinecke, J. W., Hsu, F. F., Crowley, J. R., Hazen, S. L., Leeuwenburgh, C., Mueller, D. M., Rasmussen, J. E. et Turk, J. (1999) Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry: sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues. *Methods in enzymology*, vol. 300, n°1980, p. 124-44.
- Heistad, a, Scott, T., Skaarer, a M., Seidu, R., Hanssen, J. F. et Stenström, T. a (2009) Virus removal by unsaturated wastewater filtration: effects of biofilm accumulation and hydrophobicity. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, vol. 60, n°2, p. 399-407.
- Helmi, K., Skraber, S., Gantzer, C., Willame, R., Hoffmann, L. et Cauchie, H. M. (2008) Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, vaccinal poliovirus type 1, and bacteriophages ??X174 and MS2 with a drinking water biofilm and a wastewater biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, n°7, p. 2079-2088.
- Herbert, T. P., Brierley, I. et Brown, T. D. (1997) Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. *The Journal of general virology*, vol. 78 ( Pt 5), n°5, p. 1033-40.
- Herbold, K., Flehmig, B. et Botzenhart, K. (1989) Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Applied and environmental microbiology*, vol. 55, n°11, p. 2949-53.
- Hewitt, J., Bell, D., Simmons, G. C., Rivera-Aban, M., Wolf, S. et Greening, G. E. (2007) Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at a New Zealand Ski Resort. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, n°24, p. 7853-7857.
- Hewitt, J. et Greening, G. E. (2006) Effect of heat treatment on hepatitis A virus and norovirus in New Zealand greenshell mussels (*Perna canaliculus*) by quantitative real-time reverse transcription PCR and cell culture. *Journal of food protection*, vol. 69, n°9, p. 2217-23.
- Hewitt, J., Rivera-Aban, M. et Greening, G. E. (2009) Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *Journal of applied microbiology*, vol. 107, n°1, p. 65-71.
- Hirneisen, K. a., Black, E. P., Cascarino, J. L., Fino, V. R., Hoover, D. G. et Kniel, K. E. (2010) Viral Inactivation in Foods: A Review of Traditional and Novel Food-Processing Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 9, n°1, p. 3-20.
- Hirneisen, K. A. et Kniel, K. E. (2013a) Comparing human norovirus surrogates: murine norovirus and Tulane virus. *Journal of food protection*, vol. 76, n°1, p. 139-43.
- Hirneisen, K. A. et Kniel, K. E. (2013b) Norovirus surrogate survival on spinach during preharvest growth. *Phytopathology*, vol. 103, n°4, p. 389-94.
- Hirneisen, K. a et Kniel, K. E. (2012) Comparison of ELISA attachment and infectivity assays for murine norovirus. *Journal of virological methods*, vol. 186, n°1-2, p. 14-20.
- Hirneisen, K. a, Markland, S. M. et Kniel, K. E. (2011) Ozone inactivation of norovirus surrogates on fresh produce. *Journal of food protection*, vol. 74, n°5, p. 836-839.
- Hoigné, J. (1998) Chemistry of aqueous ozone and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. *Quality and Treatment of Drinking Water II*, vol. 5.
- Hooker, J. M., Kovacs, E. W. et Francis, M. B. (2004) Interior surface modification of bacteriophage

- MS2. Journal of the American Chemical Society, vol. 126, n°12, p. 3718-9.
- Hornstra, L. M., Smeets, P. W. M. H. et Medema, G. J. (2011) Inactivation of bacteriophage MS2 upon exposure to very low concentrations of chlorine dioxide. *Water research*, vol. 45, n°4, p. 1847-55.
- Hosmillo, M., Chaudhry, Y., Kim, D.-S., Goodfellow, I. et Cho, K.-O. (2014) Sapovirus translation requires an interaction between VPg and the cap binding protein eIF4E. *Journal of virology*, vol. 88, n°21, p. 12213-21.
- Huang, R., Ye, M., Li, X., Ji, L., Karwe, M. et Chen, H. (2016) Evaluation of high hydrostatic pressure inactivation of human norovirus on strawberries, blueberries, raspberries and in their purees. *International journal of food microbiology*, vol. 223, p. 17-24.
- Hyde, J. L., Sosnovtsev, S. V., Green, K. Y., Wobus, C., Virgin, H. W. et Mackenzie, J. M. (2009) Mouse norovirus replication is associated with virus-induced vesicle clusters originating from membranes derived from the secretory pathway. *Journal of virology*, vol. 83, n°19, p. 9709-19.
- Hyde, S., Blum, Z., Landh, T., Lindin, S., Ninham, B. W., Andersson, S. et Larsson, K. (1997) *The Language of Shape: The Role of Curvature in Condensed Matter: Physics, Chemistry and Biology.* (Elsevier.).
- Inrs (2013) Fiche toxicologique n°43 : Ozone. Edition, p. 1-7.
- INRS (2006) Fiche Toxicologique n°157 : Eaux et extraits de Javel Hypochlorite de sodium en solution. Edition, p. 1-8.
- ISO (1985) ISO 7393-2. Water quality: Determination of free chlorine and total chlorine. Part 2: Colorimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purposes.
- ISO (1995) ISO 10705-1. Water quality: detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages.
- ISO (2013) ISO/TS 15216-1: Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification.
- Jacobson, a B. (1976) Studies on secondary structure of single-stranded RNA from bacteriophage MS2 by electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73, n°2, p. 307-11.
- Jacobson, a B., Arora, R., Zuker, M., Priano, C., Lin, C. H. et Mills, D. R. (1998) Structural plasticity in RNA and its role in the regulation of protein translation in coliphage Q beta. *Journal of molecular biology*, vol. 275, n°4, p. 589-600.
- Jarke, C., Petereit, A., Fehlhaber, K., Braun, P. G., Truyen, U. et Albert, T. (2013) Impact of Sodium Chloride, Sucrose and Milk on Heat Stability of the Murine Norovirus and the MS2 Phage. *Food and environmental virology*, vol. 5, n°3, p. 135-143.
- Jin, M., Shan, J., Chen, Z., Guo, X., Shen, Z., Qiu, Z., Xue, B., Wang, Y., Zhu, D., Wang, X. et Li, J. (2013) Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. *Environmental science & technology*, vol. 47, n°9, p. 4590-7.
- Jin, Y. et Flury, M. (2002) FATE AND TRANSPORT OF VIRUSES. *Advances in Agronomy* (Vol. 77). Elsevier Inc.
- Jofre, J. (2009) Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? *Journal of applied microbiology*, vol. 106, n°4, p. 1059-69.
- Johnson, J. E. et Speir, J. a (1997) Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies.

- Journal of molecular biology, vol. 269, n°5, p. 665-75.
- Jones, M. K., Grau, K. R., Costantini, V., Kolawole, A. O., de Graaf, M., Freiden, P., Graves, C. L., Koopmans, M., Wallet, S. M., Tibbetts, S. A., Schultz-Cherry, S., Wobus, C. E., Vinjé, J. et Karst, S. M. (2015) Human norovirus culture in B cells. *Nature protocols*, vol. 10, n°12, p. 1939-47.
- Jones, M. K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C. L., Keyes, L. R., Grau, K. R., Gonzalez-Hernandez, M. B., Iovine, N. M., Wobus, C. E., Vinje, J., Tibbetts, S. a., Wallet, S. M., Karst, S. M., Vinjé, J., Tibbetts, S. a., Wallet, S. M. et Karst, S. M. (2014) Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science*, vol. 346, n°6210, p. 755-759.
- Kahler, A. M., Cromeans, T. L., Metcalfe, M. G., Humphrey, C. D. et Hill, V. R. (2016) Aggregation of Adenovirus 2 in Source Water and Impacts on Disinfection by Chlorine. *Food and environmental virology*, vol. 2011, n°3, p. 180-188.
- Kahler, A. M., Cromeans, T. L., Roberts, J. M. et Hill, V. R. (2010) Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, n°15, p. 5159-64.
- Kapikian, A. Z. (2000) The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *The Journal of infectious diseases*, vol. 181 Suppl, p. S295-302.
- Kaplan, G. G., Konduru, K., Manangeeswaran, M., Jacques, J., Amharref, N. et Nakamura, S. (2013) Structure, Molecular Virology, Natural History, and Experimental Models. *Viral Hepatitis* (p. 27-42). Oxford, UK : John Wiley & Sons, Ltd.
- Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y. et Feinstone, S. M. (1996) Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *The EMBO journal*, vol. 15, n°16, p. 4282-96.
- Karim, M. R., Fout, G. S., Johnson, C. H., White, K. M. et Parshionikar, S. U. (2015) Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. *Journal of Virological Methods*, vol. 219, p. 51-61.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Goodfellow, I. G., Green, K. Y. et Virgin, H. W. (2014) Advances in Norovirus Biology. *Cell host & microbe*, vol. 15, n°6, p. 668-680.
- Karst, S. M., Wobus, C. E., Lay, M., Davidson, J. et Virgin, H. W. (2003) STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 299, n°5612, p. 1575-8.
- Katpally, U., Voss, N. R., Cavazza, T., Taube, S., Rubin, J. R., Young, V. L., Stuckey, J., Ward, V. K., Virgin, H. W., Wobus, C. E. et Smith, T. J. (2010) High-resolution cryo-electron microscopy structures of murine norovirus 1 and rabbit hemorrhagic disease virus reveal marked flexibility in the receptor binding domains. *Journal of virology*, vol. 84, n°11, p. 5836-41.
- Khadre, M. a, Yousef, a E. et Kim, J. G. (2001) Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *Journal of Food Science*, vol. 66, n°9, p. 1242-1252.
- Kim, C. K., Gentile, D. M. et Sproul, O. J. (1980) Mechanism of Ozone Inactivation of Bacteriophage f2. *Applied and environmental microbiology*, vol. 39, n°1, p. 210-8.
- Kim, J.-G., Yousef, A. E. et Khadre, M. A. (2003) Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in food and nutrition research*, vol. 45, p. 167-218.
- Kim, J. Y., Kim, H. J., Lim, G. O., Jang, S. A. et Song, K. Bin (2010) The effects of aqueous chlorine dioxide or fumaric acid treatment combined with UV-C on postharvest quality of 'Maehyang' strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 56, n°3, p. 254-256.
- Kim, S. Y. et Ko, G. (2012) Using propidium monoazide to distinguish between viable and nonviable bacteria, MS2 and murine norovirus. *Letters in applied microbiology*, vol. 55, n°3, p. 182-8.

- King, A., Adams, M., Carstens, E. et Lefkowitz, E. (2012) *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
- Kingsley, D. H., Meade, G. K. et Richards, G. P. (2002) Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness. *Applied and environmental microbiology*, vol. 68, n°8, p. 3914-8.
- Kirs, M. et 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*, vol. 73, n°3, p. 808-14.
- Klaiber, R. G., Baur, S., Wolf, G., Hammes, W. P. et Carle, R. (2005) Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 6, n°3, p. 351-362.
- Klovins, J., Overbeek, G. P., van den Worm, S. H. E., Ackermann, H.-W. et van Duin, J. (2002) Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. *The Journal of general virology*, vol. 83, n°Pt 6, p. 1523-33.
- Klovins, J., Tsareva, N. a, de Smit, M. H., Berzins, V. et van Duin, J. (1997) Rapid evolution of translational control mechanisms in RNA genomes. *Journal of molecular biology*, vol. 265, n°4, p. 372-84.
- Kniel, K. E. (2014) The makings of a good human norovirus surrogate. *Current opinion in virology*, vol. 4, p. 85-90.
- Knight, A., Haines, J., Stals, A., Li, D., Uyttendaele, M., Knight, A. et Jaykus, L.-A. (2016) A systematic review of human norovirus survival reveals a greater persistence of human norovirus RT-qPCR signals compared to those of cultivable surrogate viruses. *International journal of food microbiology*, vol. 216, p. 40-9.
- Ko, G., Cromeans, T. L. et Sobsey, M. D. (2003) Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, n°12, p. 7377-84.
- Ko, G., Jothikumar, N., Hill, V. R. et Sobsey, M. D. (2005) Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*, vol. 127, n°2, p. 148-53.
- Koning, R. I., Gomez-Blanco, J., Akopjana, I., Vargas, J., Kazaks, A., Tars, K., Carazo, J. M. et Koster, A. J. (2016) Asymmetric cryo-EM reconstruction of phage MS2 reveals genome structure in situ. *Nature communications*, vol. 7, p. 12524.
- Koopmans, M. et Duizer, E. (2004) Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 90, n°1, p. 23-41.
- Koopmans, M., von Bonsdorff, C. H., Vinjé, J., de Medici, D. et Monroe, S. (2002) Foodborne viruses. *FEMS microbiology reviews*, vol. 26, n°2, p. 187-205.
- Korn, C., Andrews, R. C. et Escobar, M. D. (2002) Development of chlorine dioxide-related by-product models for drinking water treatment. *Water Research*, vol. 36, n°1, p. 330-342.
- Koroglu, M., Yakupogullari, Y., Otlu, B., Ozturk, S., Ozden, M., Ozer, A., Sener, K. et Durmaz, R. (2011) A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in malatya, Turkey. *New Microbiologica*, vol. 34, n°1, p. 17-24.
- Kotwal, G. et Cannon, J. L. (2014) Environmental persistence and transfer of enteric viruses. *Current opinion in virology*, vol. 4, n°2004, p. 37-43.
- Kozak, M. et Nathans, D. (1971) Fate of maturation protein during infection by coliphage MS2. *Nature: New biology*, vol. 234, n°50, p. 209-211.

- Krahn, P. M., O'Callaghan, R. J. et Paranchych, W. (1972) Stages in phage R17 infection. VI. Injection of A protein and RNA into the host cell. *Virology*, vol. 47, n°3, p. 628-637.
- Krugman, S., Giles, J. P. et Hammond, J. (1967) Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA*, vol. 200, n°5, p. 365-73.
- Kuzmanovic, D. a, Elashvili, I., Wick, C., O'Connell, C. et Krueger, S. (2006) The MS2 coat protein shell is likely assembled under tension: a novel role for the MS2 bacteriophage A protein as revealed by small-angle neutron scattering. *Journal of molecular biology*, vol. 355, n°5, p. 1095-111.
- Kyte, J. et Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, vol. 157, n°1, p. 105-132.
- L'Azou, M. et Duchon, C. (2012) Épidémie de gastro-entérites aiguës liée à la consommation d'eau dans un camping de Vallon-Pont-d'Arc en Ardèche (07), Aout 2008. Institut de veille sanitaire.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J. F. L. et Gantzer, C. (2008a) Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes. *Water research*, vol. 42, n°10-11, p. 2769-77.
- Langlet, J., Gaboriaud, F., Gantzer, C. et 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*, vol. 94, n°8, p. 3293-312.
- Langlet, J., Ogorzaly, L., Schrotter, J.-C., Machinal, C., Gaboriaud, F., Duval, J. F. L. et Gantzer, C. (2009) Efficiency of MS2 phage and Q $\beta$  phage removal by membrane filtration in water treatment: Applicability of real-time RT-PCR method. *Journal of Membrane Science*, vol. 326, n°1, p. 111-116.
- Le Flou, A., Delamare, C., Finance, C., Fourcy, S., Gantzer, C., Gérard, A., Gut, J.-P., Herbein, G., Nakouné, E., Rihn, B., Sakanga, O., Stoll-Keller, F. et Fafi-Kremer, S. (2012) Précis de virologie humaine. *Revue Francophone des Laboratoires*, n°443, p. 19.
- Le Guyader, F. S., Bon, F., DeMedici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., Maddalo, F., Monini, M., Gallay, A., Pommepeuy, M., Pothier, P. et Ruggeri, F. M. (2006) Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *Journal of clinical microbiology*, vol. 44, n°11, p. 3878-82.
- Le Guyader, F. S., Le Saux, J.-C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepeuy, M., Pothier, P. et Atmar, R. L. (2008) Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal of clinical microbiology*, vol. 46, n°12, p. 4011-7.
- Le Guyader, F. S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.-O., Alsterlund, R., Pommepeuy, M. et Svensson, L. (2004) Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International journal of food microbiology*, vol. 97, n°2, p. 179-86.
- Le Pendu, J., Nyström, K. et Ruvoën-Clouet, N. (2014) Host-pathogen co-evolution and glycan interactions. *Current opinion in virology*, vol. 7C, p. 88-94.
- Lee, C.-S., Lee, J.-H. et Kwon, K.-S. (2008) Outbreak of hepatitis A in Korean military personnel. *Japanese journal of infectious diseases*, vol. 61, n°3, p. 239-41.
- Lee, E.-S., Lee, M.-H. et Kim, B.-S. (2015) Evaluation of propidium monoazide-quantitative PCR to detect viable *Mycobacterium fortuitum* after chlorine, ozone, and ultraviolet disinfection. *International journal of food microbiology*, vol. 210, p. 143-8.
- Leen, E. N., Kwok, K. Y. R., Birtley, J. R., Simpson, P. J., Subba-Reddy, C. V, Chaudhry, Y., Sosnovtsev, S.

- V, Green, K. Y., Prater, S. N., Tong, M., Young, J. C., Chung, L. M. W., Marchant, J., Roberts, L. O., Kao, C. C., Matthews, S., Goodfellow, I. G. et Curry, S. (2013) Structures of the compact helical core domains of feline calicivirus and murine norovirus VPg proteins. *Journal of virology*, vol. 87, n°10, p. 5318-30.
- Leen, E. N., Sorgeloos, F., Correia, S., Chaudhry, Y., Cannac, F., Pastore, C., Xu, Y., Graham, S. C., Matthews, S. J., Goodfellow, I. G. et Curry, S. (2016) A Conserved Interaction between a C-Terminal Motif in Norovirus VPg and the HEAT-1 Domain of eIF4G Is Essential for Translation Initiation. *PLoS pathogens*, vol. 12, n°1, p. e1005379.
- Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M. et Hamza, I. A. (2015) Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, p. 1-8.
- Levine, R. L., Berlett, B. S., Moskovitz, J., Mosoni, L. et Stadtman, E. R. (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 107, n°3, p. 323-332.
- Levy, H. C., Bostina, M., Filman, D. J. et Hogle, J. M. (2010) Catching a virus in the act of RNA release: a novel poliovirus uncoating intermediate characterized by cryo-electron microscopy. *Journal of virology*, vol. 84, n°9, p. 4426-41.
- Lewisch, S. A. et Levine, R. L. (1995) Determination of 2-oxohistidine by amino acid analysis. *Anal Biochem*, vol. 231, n°2, p. 440-446.
- Li, D., Baert, L., Van Coillie, E. et Uyttendaele, M. (2011) Critical studies on binding-based RT-PCR detection of infectious Noroviruses. *Journal of virological methods*, vol. 177, n°2, p. 153-9.
- Li, D., Baert, L., Xia, M., Zhong, W., Van Coillie, E., Jiang, X. et Uyttendaele, M. (2012) Evaluation of methods measuring the capsid integrity and/or functions of noroviruses by heat inactivation. *Journal of virological methods*, vol. 181, n°1, p. 1-5.
- Li, H., Robertson, A. D. et Jensen, J. H. (2005) Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins*, vol. 61, n°4, p. 704-21.
- Li, J.-W., Wang, X.-W., Yuan, C.-Q., Zheng, J.-L., Jin, M., Song, N., Shi, X.-Q. et Chao, F.-H. (2002a) Detection of enteroviruses and hepatitis A virus in water by consensus primer multiplex RT-PCR. *World journal of gastroenterology : WJG*, vol. 8, n°4, p. 699-702.
- Li, J. W., Xin, Z. T., Wang, X. W., Zheng, J. L. et Chao, F. H. (2002b) Mechanisms of inactivation of hepatitis a virus by chlorine. *Applied and environmental microbiology*, vol. 68, n°10, p. 4951-5.
- Li, Q., Yafal, A. G., Lee, Y. M., Hogle, J. et Chow, M. (1994) Poliovirus neutralization by antibodies to internal epitopes of VP4 and VP1 results from reversible exposure of these sequences at physiological temperature. *Journal of virology*, vol. 68, n°6, p. 3965-70.
- Lim, M. Y., Kim, J.-M. et Ko, G. (2010a) Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water research*, vol. 44, n°10, p. 3243-51.
- Lim, M. Y., Kim, J.-M., Lee, J. E. et Ko, G. (2010b) Characterization of ozone disinfection of murine norovirus. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, n°4, p. 1120-4.
- Ling, C. M., Hung, P. P. et Overby, L. R. (1970) Independent assembly of Q $\beta$  and MS2 phages in doubly infected *Escherichia coli*. *Virology*, vol. 40, n°4, p. 920-929.
- Lippard, S. et Berg, J. (1997) *Principes de biochimie minérale* (De Boeck U.).
- Lopman, B. A., Trivedi, T., Vicuña, Y., Costantini, V., Collins, N., Gregoricus, N., Parashar, U., Sandoval, C., Broncano, N., Vaca, M., Chico, M. E., Vinjé, J. et Cooper, P. J. (2015) Norovirus Infection and Disease in an Ecuadorian Birth Cohort: Association of Certain Norovirus Genotypes With Host

- FUT2 Secretor Status. *The Journal of infectious diseases*, vol. 211, n°11, p. 1813-21.
- Lopman, B., Gastañaduy, P., Park, G. W., Hall, A. J., Parashar, U. D. et Vinjé, J. (2012) Environmental transmission of norovirus gastroenteritis. *Current opinion in virology*, vol. 2, n°1, p. 96-102.
- Lucena, F., Ribas, F., Duran, a E., Skraber, S., Gantzer, C., Campos, C., Morón, a, Calderón, E. et Jofre, J. (2006) Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *Journal of applied microbiology*, vol. 101, n°1, p. 96-102.
- Lukasik, J., Scott, T. M., Andryshak, D. et Farrah, S. R. (2000) Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied and environmental microbiology*, vol. 66, n°7, p. 2914-20.
- Lytle, C. D. et Routson, L. B. (1995) Minimized virus binding for tests of barrier materials. *Applied and environmental microbiology*, vol. 61, n°2, p. 643-9.
- Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M. et Johne, R. (2013) Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. *Food and environmental virology*, p. 162-168.
- Mani, B., Gerber, M., Lieby, P., Boschetti, N., Kempf, C. et Ros, C. (2007) Molecular mechanism underlying B19 virus inactivation and comparison to other parvoviruses. *Transfusion*, vol. 47, n°10, p. 1765-74.
- Marks, P. J., Vipond, I. B., Regan, F. M., Wedgwood, K., Fey, R. E. et Caul, E. O. (2003) A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiology and infection*, vol. 131, n°1, p. 727-36.
- Martin-Latil, S. (2016) Mise en évidence de l'infectiosité des virus entériques par impédance cellulaire. Colloque Virus et Aliments, UMT ACTIA Virocontrol.
- Matheny, S. C. et Kingery, J. E. (2012) Hepatitis A. *American family physician*, vol. 86, n°11, p. 1027-34-2.
- Mattle, M. J., Crouzy, B., Brennecke, M., Wigginton, K. R., Perona, P. et Kohn, T. (2011) Impact of virus aggregation on inactivation by peracetic acid and implications for other disinfectants. *Environmental science & technology*, vol. 45, n°18, p. 7710-7.
- Mattle, M. J. et Kohn, T. (2012) Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses: contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and recombination. *Environmental science & technology*, vol. 46, n°18, p. 10022-30.
- Maunula, L., Klemola, P., Kauppinen, A., Söderberg, K., Nguyen, T., Pitkänen, T., Kaijalainen, S., Simonen, M. L., Miettinen, I. T., Lappalainen, M., Laine, J., Vuento, R., Kuusi, M. et Roivainen, M. (2009) Enteric Viruses in a Large Waterborne Outbreak of Acute Gastroenteritis in Finland. *Food and Environmental Virology*, vol. 1, n°2, p. 105-105.
- Maunula, L., Roivainen, M., Keränen, M., Mäkela, S., Söderberg, K., Summa, M., von Bonsdorff, C. H., Lappalainen, M., Korhonen, T., Kuusi, M. et Niskanen, T. (2009) Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *European communicable disease bulletin*, vol. 14, n°49, p. 4-6.
- Mayr, C., Strohe, G. et Contzen, M. (2009) Detection of rotavirus in food associated with a gastroenteritis outbreak in a mother and child sanatorium. *International journal of food microbiology*, vol. 135, n°2, p. 179-82.
- Mbithi, J. N., Springthorpe, V. S., Boulet, J. R. et Sattar, S. A. (1992) Survival of hepatitis A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 30, n°4, p. 757-763.

- McFadden, N., Bailey, D., Carrara, G., Benson, A., Chaudhry, Y., Shortland, A., Heeney, J., Yarovinsky, F., Simmonds, P., Macdonald, A. et Goodfellow, I. (2011) Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4. *PLoS pathogens*, vol. 7, n°12, p. e1002413.
- McGuire, K. a, Barlan, A. U., Griffin, T. M. et Wiethoff, C. M. (2011) Adenovirus type 5 rupture of lysosomes leads to cathepsin B-dependent mitochondrial stress and production of reactive oxygen species. *Journal of virology*, vol. 85, n°20, p. 10806-13.
- Meireles, A., Giaouris, E. et Sim, M. (2016) Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry. *Food Research International*, vol. 82, p. 71-85.
- Mellou, K., Katsioulis, A., Potamiti-Komi, M., Pournaras, S., Kyritsi, M., Katsiaflaka, A., Kallimani, A., Kokkinos, P., Petinaki, E., Sideroglou, T., Georgakopoulou, T., Vantarakis, A. et Hadjichristodoulou, C. (2014) A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. *Epidemiology and infection*, vol. 142, n°1, p. 40-50.
- Mesquita, J. R., Barclay, L., Nascimento, M. S. J. et Vinjé, J. (2010) Novel norovirus in dogs with diarrhea. *Emerging infectious diseases*, vol. 16, n°6, p. 980-2.
- Meyer, E. E., Rosenberg, K. J. et Israelachvili, J. (2006) Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, n°43, p. 15739-46.
- Michen, B. et Graule, T. (2010) Isoelectric points of viruses. *Journal of applied microbiology*, vol. 109, n°2, p. 388-97.
- Moreno, L., Aznar, R. et Sánchez, G. (2015) Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 201, p. 1-6.
- Mouly, D., Vaissière, E. et Vincent, N. (2013) Épidémie de gastro-entérites aiguës d'origine hydrique à Pleaux, Cantal, avril 2012. Institut de veille sanitaire.
- Mudd, J. B., Leavitt, R., Ongun, a et McManus, T. T. (1969) Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmospheric environment (Oxford, England : 1994)*, vol. 3, n°6, p. 669-682.
- Müller, L., Schultz, A. C., Fonager, J., Jensen, T., Lisby, M., Hindsdal, K., Krusell, L., Eshøj, A., Møller, L. T., Porsbo, L. J., Böttiger, B. E., Kuhn, K., Engberg, J. et Ethelberg, S. (2014) Separate norovirus outbreaks linked to one source of imported frozen raspberries by molecular analysis, Denmark, 2010-2011. *Epidemiology and infection*, vol. 143, n°11, p. 2299-307.
- Nainan, O. V, Xia, G., Vaughan, G. et Margolis, H. S. (2006) Diagnosis of hepatitis a virus infection: a molecular approach. *Clinical microbiology reviews*, vol. 19, n°1, p. 63-79.
- Napthine, S., Lever, R. A., Powell, M. L., Jackson, R. J., Brown, T. D. K. et Brierley, I. (2009) Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. *PLoS one*, vol. 4, n°12, p. e8390.
- Nenonen, N. P., Hannoun, C., Olsson, M. B. et Bergström, T. (2009) Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, vol. 45, n°2, p. 105-8.
- Ng, T. L., Chan, P. P., Phua, T. H., Loh, J. P., Yip, R., Wong, C., Liaw, C. W., Tan, B. H., Chiew, K. T., Chua, S. B., Lim, S., Ooi, P. L., Chew, S. K. et Goh, K. T. (2005) Oyster-associated outbreaks of Norovirus gastroenteritis in Singapore. *The Journal of infection*, vol. 51, n°5, p. 413-8.
- Niesen, F. H., Berglund, H. et Vedadi, M. (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols*, vol. 2, n°9, p. 2212-21.



- Nightingale, Z. D., Lancha, A. H., Handelman, S. K., Dolnikowski, G. G., Busse, S. C., Dratz, E. A., Blumberg, J. B. et Handelman, G. J. (2000) Relative reactivity of lysine and other peptide-bound amino acids to oxidation by hypochlorite. *Free radical biology & medicine*, vol. 29, n°5, p. 425-33.
- Nims, R. et Plavsic, M. (2013) Inactivation of caliciviruses. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, vol. 6, n°3, p. 358-92.
- Nishida, T., Nishio, O., Kato, M., Chuma, T., Kato, H., Iwata, H. et Kimura, H. (2007) Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. *Microbiology and immunology*, vol. 51, n°2, p. 177-84.
- Nocker, A., Sossa, K. E. et Camper, A. K. (2007) Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of microbiological methods*, vol. 70, n°2, p. 252-60.
- Nuanualsuwan, S. et Cliver, D. O. (2002) Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of virological methods*, vol. 104, n°2, p. 217-25.
- Nuanualsuwan, S. et Cliver, D. O. (2003a) Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, n°1, p. 350-7.
- Nuanualsuwan, S. et Cliver, D. O. (2003b) Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, n°3, p. 1629-32.
- O'Brien, R. T. et Newman, J. (1979) Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 38, n°6, p. 1034-1039.
- Ogata, N. (2007) Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry*, vol. 46, n°16, p. 4898-911.
- Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A. et Gantzer, C. (2010) Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, n°24, p. 8019-8025.
- Ogorzaly, L., Cauchie, H.-M., Penny, C., Perrin, A., Gantzer, C. et Bertrand, I. (2013) Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 97, n°9, p. 4159-66.
- Ogorzaly, L. et 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*, vol. 138, n°1-2, p. 131-9.
- Ohshima, H. (1995) Electrophoresis of soft particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 62, n°2-3, p. 189-235.
- Oogane, T., Hirata, A., Funatogawa, K., Kobayashi, K., Sato, T. et Kimura, H. (2008) Food poisoning outbreak caused by norovirus GII/4 in school lunch, Tochigi prefecture, Japan. *Japanese journal of infectious diseases*, vol. 61, n°5, p. 423-4.
- Otto, P. H., Clarke, I. N., Lambden, P. R., Salim, O., Reetz, J. et Liebler-Tenorio, E. M. (2011) Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection. *Journal of virology*, vol. 85, n°22, p. 12013-21.
- Ouzilou, L., Caliot, E., Pelletier, I., Prévost, M.-C., Pringault, E. et Colbère-Garapin, F. (2002) Poliovirus transcytosis through M-like cells. *The Journal of general virology*, vol. 83, n°Pt 9, p. 2177-82.
- Overby, L. R., Doi, R. H., Spiegelman, S., Laboratories, A. et Chicago, N. (1966) Comparison of Two

- Serologically Distinct Ribonucleic Acid Bacteriophages, vol. 91, n°1, p. 442-448.
- Page, M. a, Shisler, J. L. et Mariñas, B. J. (2010) Mechanistic aspects of adenovirus serotype 2 inactivation with free chlorine. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, n°9, p. 2946-54.
- Painter, J. A., Hoekstra, R. M., Ayers, T., Tauxe, R. V., Braden, C. R., Angulo, F. J. et Griffin, P. M. (2013) Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, n°3, p. 407-415.
- Parshionkar, S., Laseke, I. et Fout, G. S. (2010) Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. *Applied and environmental microbiology*, vol. 76, n°13, p. 4318-26.
- Parshionkar, S. U., Willian-true, S., Fout, G. S., Robbins, D. E., Seys, S. A., Cassady, J. D. et Harris, R. (2003) Waterborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with a Norovirus. *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, n°9, p. 5263-5268.
- Patrickios, C. S. et Yamasaki, E. N. (1995) Polypeptide amino acid composition and isoelectric point. II. Comparison between experiment and theory. *Analytical biochemistry*, vol. 231, n°1, p. 82-91.
- Pattison, D. I. et Davies, M. J. (2001) Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chemical research in toxicology*, vol. 14, n°10, p. 1453-64.
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S. et Davies, M. J. (2012) Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, vol. 11, n°1, p. 38-53.
- Peabody, D. S. (1993) The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein. *The EMBO journal*, vol. 12, n°2, p. 595-600.
- Pecson, B. M., Martin, L. V. et Kohn, T. (2009) Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. *Applied and environmental microbiology*, vol. 75, n°17, p. 5544-54.
- Pelleieux, S., Mathieu, L., Block, J.-C., Gantzer, C. et Bertrand, I. (2016) The effect of chlorination and hydrodynamic shear stress on the persistence of bacteriophages associated with drinking water biofilms. *Journal of applied microbiology*, vol. 121, n°4, p. 1189-97.
- Penrod, S., Olson, T. et Grant, S. (1996) Deposition kinetics of two viruses in packed beds of quartz granular media. *Langmuir*, vol. 12, n°23, p. 5576-5587.
- Pereira, W. E., Hoyano, Y., Summons, R. E., Bacon, V. A. et Duffield, A. M. (1973) Chlorination studies II. The reaction of aqueous hypochlorous acid with  $\alpha$ -amino acids and dipeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 313, n°1, p. 170-180.
- Perry, J. W. et Wobus, C. E. (2010) Endocytosis of murine norovirus 1 into murine macrophages is dependent on dynamin II and cholesterol. *Journal of virology*, vol. 84, n°12, p. 6163-76.
- Petrignani, M., Harms, M., Verhoef, L., van Hunen, R., Swaan, C., van Steenberghe, J., Boxman, I., Peran I Sala, R., Ober, H., Vennema, H., Koopmans, M. et van Pelt, W. (2010) Update: a food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil, January-February 2010. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, vol. 15, n°20, p. 1-4.
- Prasad, B. V, Hardy, M. E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M. G. et Estes, M. K. (1999) X-ray

- crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 286, n°5438, p. 287-90.
- Prasad, B. V., Rothnagel, R., Jiang, X. et Estes, M. K. (1994) Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *Journal of virology*, vol. 68, n°8, p. 5117-25.
- Prat, R., Nofre, C. et Cier, A. (1968) [Effects of sodium hypochlorite, ozone and ionizing radiations on the pyrimidine constituents of *Escherichia coli*]. *Annales de l'Institut Pasteur*, vol. 114, n°5, p. 595-607.
- Prato, R., Lopalco, P. L., Chironna, M., Barbuti, G., Germinario, C. et Quarto, M. (2004) Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy. *BMC infectious diseases*, vol. 4, p. 37.
- Pratt, C. et Cornely, K. (2011) *Biochimie (De Boeck S.)*.
- Predmore, A., Sanglay, G., Li, J. et Lee, K. (2015) Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiology*, vol. 50, p. 118-125.
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F. S., Joyeux, M., Moulin, L. et Wurtzer, S. (2016) Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water research*, vol. 91, p. 68-76.
- Priano, C., Arora, R., Butke, J. et Mills, D. R. (1995) A complete plasmid-based complementation system for RNA coliphage Q beta: three proteins of bacteriophages Q beta (group III) and SP (group IV) can be interchanged. *Journal of molecular biology*, vol. 249, n°2, p. 283-97.
- Probst, C., Jecht, M. et Gauss-Müller, V. (1999) Intrinsic signals for the assembly of hepatitis A virus particles. Role of structural proteins VP4 and 2A. *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, n°8, p. 4527-31.
- ProMED-mail (2016) Human norovirus virus, humans - Spain. ProMED-mail, vol. 20160427.4.
- Prütz, W. a (1996) Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 332, n°1, p. 110-20.
- Qiang, Z., Demirkol, O., Cagri-Mehmetoglu, A., Ercal, N. et Adams, C. (2005) Impact of food disinfection on beneficial biothiol contents in strawberry. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 56, n°21, p. 10414-21.
- Qin, M., Dong, X.-G., Jing, Y.-Y., Wei, X., Wang, Z.-E., Feng, H.-R., Yu, H., Li, J.-S. et Li, J. (2016) A Waterborne Gastroenteritis Outbreak Caused by Norovirus GII.17 in a Hotel, Hebei, China, December 2014. *Food and environmental virology*, n°December 2014.
- Rappaport, I. (1965) Some studies of the infectious process with MS2 bacteriophage. *Biochimica et biophysica acta*, vol. 103, n°3, p. 486-94.
- Redman, J. a., Grant, S. B., Olson, T. M., Hardy, M. E. et Estes, M. K. (1997) Filtration of Recombinant Norwalk Virus Particles and Bacteriophage MS2 in Quartz Sand: Importance of Electrostatic Interactions. *Environmental Science & Technology*, vol. 31, n°12, p. 3378-3383.
- Reynolds, K. a., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M. et Pepper, L. L. (2001) ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Canadian journal of microbiology*, vol. 47, n°2, p. 153-7.
- Reynolds, K. A., Gerba, C. P. et Pepper, I. L. (1996) Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Applied and environmental microbiology*, vol. 62, n°4, p. 1424-7.

- Riera-Montes, M., Brus Sjölander, K., Allestam, G., Hallin, E., Hedlund, K.-O. et Löfdahl, M. (2011) Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiology and Infection*, vol. 139, n°12, p. 1928-1935.
- Robilotti, E., Deresinski, S. et Pinsky, B. a. (2015) Norovirus. *Clinical microbiology reviews*, vol. 28, n°1, p. 134-64.
- Robinson, C. M., Jesudhasan, P. R. et Pfeiffer, J. K. (2014) Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. *Cell Host and Microbe*, vol. 15, n°1, p. 36-46.
- Rockx, B., De Wit, M., Vennema, H., Vinjé, J., De Bruin, E., Van Duynhoven, Y. et Koopmans, M. (2002) Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 35, n°3, p. 246-53.
- Rodgers, S. L., Cash, J. N., Siddiq, M. et Ryser, E. T. (2004) A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *Journal of food protection*, vol. 67, n°4, p. 721-31.
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Ruggeri, F. M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M. S. J., D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J. C., Rzesutka, A., Bosch, A., Gironés, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovač, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C. H., de Roda Husman, A. M., Hernández, M. et van der Poel, W. H. M. (2012) Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 36, n°4, p. 786-814.
- Rodriguez, M. J. et Sérodes, J. B. (2001) Spatial and temporal evolution of trihalomethanes in three water distribution systems. *Water research*, vol. 35, n°6, p. 1572-1586.
- Rolfsson, Ó., Middleton, S., Manfield, I. W., White, S. J., Fan, B., Vaughan, R., Ranson, N. A., Dykeman, E., Twarock, R., Ford, J., Cheng Kao, C. et Stockley, P. G. (2016) Direct Evidence for Packaging Signal-Mediated Assembly of Bacteriophage MS2. *Journal of molecular biology*, vol. 428, n°2 Pt B, p. 431-48.
- Rombaut, B., Verheyden, B., Andries, K. et Boeyé, a (1994) Thermal inactivation of oral polio vaccine: contribution of RNA and protein inactivation. *Journal of virology*, vol. 68, n°10, p. 6454-7.
- Roy, D., Englebrecht, R. S. et Chian, E. S. K. (1982) Comparative inactivation of six enteroviruses by ozone. *Journal of American Water Works Association*, vol. 74, n°12, p. 660-664.
- Roy, D., Wong, P. K., Englebrecht, R. S. et Chian, E. S. (1981) Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. *Applied and environmental microbiology*, vol. 41, n°3, p. 718-23.
- Royall, E., Doyle, N., Abdul-Wahab, A., Emmott, E., Morley, S. J., Goodfellow, I., Roberts, L. O. et Locker, N. (2015) Murine norovirus 1 (MNV1) replication induces translational control of the host by regulating eIF4E activity during infection. *The Journal of biological chemistry*, vol. 290, n°8, p. 4748-58.
- Royall, E. et Locker, N. (2016) Translational Control during Calicivirus Infection. *Viruses*, vol. 8, n°4, p. 104.
- Rumnieks, J. et Tars, K. (2014) Crystal structure of the bacteriophage Q $\beta$  coat protein in complex with the RNA operator of the replicase gene. *Journal of molecular biology*, vol. 426, n°5, p. 1039-49.
- Ruokola, P., Dadu, E., Kazmertsuk, A., Häkkinen, H., Marjomäki, V. et Ihalainen, J. a (2014) Raman spectroscopic signatures of echovirus 1 uncoating. *Journal of virology*, vol. 88, n°15, p. 8504-13.
- Ruvoën, N. et Le Pendu, J. (2013) Sensibilité génétique aux infections à norovirus. *Pathologie*

- Biologie, vol. 61, p. 28-35.
- Samandoulgou, I., Fliss, I. et Jean, J. (2015) Zeta Potential and Aggregation of Virus-Like Particle of Human Norovirus and Feline Calicivirus Under Different Physicochemical Conditions. *Food and environmental virology*, vol. 7, n°3, p. 249-60.
- Sánchez, G., Bosch, A. et Pintó, R. M. (2007) Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Letters in applied microbiology*, vol. 45, n°1, p. 1-5.
- Sánchez, G., Elizaquível, P. et Aznar, R. (2012) Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. *Food and environmental virology*, vol. 4, n°1, p. 21-5.
- Sano, D., Ohta, T., Nakamura, A., Nakagomi, T., Nakagomi, O. et Okabe, S. (2015) Culture-independent evaluation of non-enveloped virus infectivity reduced by free chlorine disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, n°8, p. AEM.03802-14.
- Sano, D., Pintó, R. M., Omura, T. et Bosch, A. (2010) Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environmental science & technology*, vol. 44, n°2, p. 808-12.
- Sarguna, P., Rao, A. et Sudha Ramana, K. N. (2007) Outbreak of acute viral hepatitis due to hepatitis E virus in Hyderabad. *Indian journal of medical microbiology*, vol. 25, n°4, p. 378-82.
- Sartorius, B., Andersson, Y., Velicko, I., De Jong, B., Löfdahl, M., Hedlund, K.-O., Allestam, G., Wångsell, C., Bergstedt, O., Horal, P., Ulleryd, P. et Soderstrom, A. (2007) Outbreak of norovirus in Västra Götaland associated with recreational activities at two lakes during August 2004. *Scandinavian journal of infectious diseases*, vol. 39, n°4, p. 323-31.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L. et Griffin, P. M. (2011) Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 17, n°1, p. 7-15.
- Scarcella, C., Carasi, S., Cadoria, F., Macchi, L., Pavan, A., Salamana, M., Alborali, G. L., Losio, M. M., Boni, P., Lavazza, A. et Seyler, T. (2009) An outbreak of viral gastroenteritis linked to municipal water supply, Lombardy, Italy, June 2009. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, vol. 14, n°29, p. 24-26.
- Schaldach, C. M., Bourcier, W. L., Shaw, H. F., Viani, B. E. et 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*, vol. 294, n°1, p. 1-10.
- Schaper, M., Durán, A. E. et Jofre, J. (2002) Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of f-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. *Applied and environmental microbiology*, vol. 68, n°8, p. 3702-7.
- Schaper, M. et Jofre, J. (2000) Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *Journal of virological methods*, vol. 89, n°1-2, p. 1-10.
- Schöneich, C. (2005) Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1703, n°2, p. 111-9.
- Schraufstätter, I. U., Browne, K., Harris, A., Hyslop, P. A., Jackson, J. H., Quehenberger, O. et Cochrane, C. G. (1990) Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *The Journal of clinical investigation*, vol. 85, n°2, p. 554-62.
- Schwartzbrod, L. (1991) *Virologie des milieux hydriques (Lavoisier.)*. Paris.
- Seah, E. L., Gunesekere, I. C., Marshall, J. A. et Wright, P. J. (1999) Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses. *Archives of virology*, vol. 144, n°5, p. 1007-14.

- Seo, K., Lee, J. E., Lim, M. Y. et Ko, G. (2012) Effect of temperature, pH, and NaCl on the inactivation kinetics of murine norovirus. *Journal of food protection*, vol. 75, n°3, p. 533-40.
- Sharov, V. S., Dremina, E. S., Galeva, N. a, Williams, T. D. et Schöneich, C. (2006) Quantitative mapping of oxidation-sensitive cysteine residues in SERCA in vivo and in vitro by HPLC-electrospray-tandem MS: selective protein oxidation during biological aging. *The Biochemical journal*, vol. 394, n°Pt 3, p. 605-15.
- Sharp, D. G., Young, D. C., Floyd, R. et Johnson, J. D. (1980) Effect of ionic environment on the inactivation of poliovirus in water by chlorine. *Applied and environmental microbiology*, vol. 39, n°3, p. 530-4.
- Shi, L., Sanyal, G., Ni, A., Luo, Z., Doshna, S., Wang, B., Graham, T. L., Wang, N. et Volkin, D. B. (2005) Stabilization of human papillomavirus virus-like particles by non-ionic surfactants. *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 94, n°7, p. 1538-51.
- Shields, P. A. et Farrah, S. R. (2002) Characterization of virus adsorption by using DEAE-sepharose and octyl-sepharoser. *Applied and environmental microbiology*, vol. 68, n°8, p. 3965-8.
- Shin, G.-A. et Sobsey, M. D. (2003) Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, n°7, p. 3975-8.
- Shin, G.-A. et Sobsey, M. D. (2008) Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water research*, vol. 42, n°17, p. 4562-8.
- Shiomi, H., Urasawa, T., Urasawa, S., Kobayashi, N., Abe, S. et Taniguchi, K. (2004) Isolation and characterisation of poliovirus mutants resistant to heating at 50 degrees Celsius for 30 min. *Journal of medical virology*, vol. 74, n°3, p. 484-91.
- Sidhu, J. P. S. et Toze, S. G. (2009) Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. *Environment international*, vol. 35, n°1, p. 187-201.
- Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Pecson, B. M., Wigginton, K. R. et Kohn, T. (2013) Subtle differences in virus composition affect disinfection kinetics and mechanisms. *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, n°11, p. 3455-67.
- Sigstam, T., Rohatschek, A., Zhong, Q., Brennecke, M. et Kohn, T. (2014) On the cause of the tailing phenomenon during virus disinfection by chlorine dioxide. *Water research*, vol. 48, p. 82-9.
- Simonet, J. et Gantzer, C. (2006a) Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *Journal of applied microbiology*, vol. 100, n°4, p. 862-70.
- Simonet, J. et Gantzer, C. (2006b) Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Applied and environmental microbiology*, vol. 72, n°12, p. 7671-7.
- Siqueira, A. A., Santelli, A. C. F. S., Alencar, J. R., Dantas, M. P., Dimech, C. P. N., Carmo, G. M. I., Santos, D. A., Alves, R. M. S., Lucena, M. B. F., Morais, M., Assis, R. M. S., Fialho, A., Mascarenhas, J. D. P., Costa, M., Linhares, A. C., Leite, J. P. G., Araujo, W. N. et Hatch, D. L. (2010) Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death due to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005. *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 14, n°10, p. e898-e903.
- Skoog, B. et Wichman, A. (1986) Calculation of the isoelectric points of polypeptides from the amino acid composition. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 5, n°4, p. 82-83.
- Skraber, S., Gassilloud, B., Schwartzbrod, L. et Gantzer, C. (2004) Survival of infectious Poliovirus-1 in river water compared to the persistence of somatic coliphages, thermotolerant coliforms and

- Poliovirus-1 genome. *Water research*, vol. 38, n°12, p. 2927-33.
- Smiley, J. R., Chang, K. O., Hayes, J., Vinje, J. et Saif, L. J. (2002) Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus. *J.Virol.*, vol. 76, n°20, p. 10089-10098.
- Sosnovtsev, S. V, Belliot, G., Chang, K.-O., Onwudiwe, O. et Green, K. Y. (2005) Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions. *Journal of virology*, vol. 79, n°7, p. 4012-24.
- Sosnovtsev, S. V et Green, K. Y. (2000) Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology*, vol. 277, n°1, p. 193-203.
- Stockley, P. G., Rolfsson, O., Thompson, G. S., Basnak, G., Francese, S., Stonehouse, N. J., Homans, S. W. et Ashcroft, A. E. (2007) A simple, RNA-mediated allosteric switch controls the pathway to formation of a T=3 viral capsid. *Journal of molecular biology*, vol. 369, n°2, p. 541-52.
- Straub, T. M., Höner zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B. K., Bartholomew, R. a, Valdez, C. O., Bruckner-Lea, C. J., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M. et Nickerson, C. a (2007) In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging infectious diseases*, vol. 13, n°3, p. 396-403.
- Strazynski, M., Krämer, J. et Becker, B. (2002) Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 74, n°1-2, p. 73-78.
- Sui, L., Li, N., Zhang, W., Chen, Y., Zheng, Y., Wan, T., Zhang, W., Yang, Y., Fang, G., Mao, J. et Cao, X. (2006) Human membrane protein Tim-3 facilitates hepatitis A virus entry into target cells. *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 17, n°6, p. 1093-1099.
- Takanashi, S., Saif, L. J., Hughes, J. H., Meulia, T., Jung, K., Scheuer, K. a et Wang, Q. (2013) Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. *Archives of virology*.
- Taube, S., Kolawole, A. O., Höhne, M., Wilkinson, J. E., Handley, S. A., Perry, J. W., Thackray, L. B., Akkina, R. et Wobus, C. E. (2013) A mouse model for human norovirus. *mBio*, vol. 4, n°4, p. 1-8.
- Taube, S., Rubin, J. R., Katpally, U., Smith, T. J., Kendall, A., Stuckey, J. a et Wobus, C. E. (2010) High-resolution x-ray structure and functional analysis of the murine norovirus 1 capsid protein protruding domain. *Journal of virology*, vol. 84, n°11, p. 5695-705.
- ter Waarbeek, H. L. G., Dukers-Muijrs, N. H. T. M., Vennema, H. et Hoebe, C. J. P. a (2010) Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. *Journal of Clinical Virology*, vol. 47, n°3, p. 268-272.
- Teunis, P. F. M., Moe, C. L., Liu, P., E. Miller, S., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J. et Calderon, R. L. (2008) Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology*, vol. 80, n°8, p. 1468-1476.
- Thaplyal, P. et Bevilacqua, P. C. (2014) Experimental Approaches for Measuring pKa's in RNA and DNA. *Methods in Enzymology* (p. 189-219).
- Thorne, L. G. et Goodfellow, I. G. (2014) Norovirus gene expression and replication. *The Journal of general virology*, vol. 95, n°Pt 2, p. 278-91.
- Thornton, A. C., Jennings-Conklin, K. S. et McCormick, M. I. (2004) Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster management & response : DMR : an official publication of the Emergency Nurses Association*, vol. 2, n°1, p. 4-9.
- Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J. et Gerba, C. P. (2003) Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, n°7, p. 3979-85.

- Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C. N., Jacangelo, J. et Gerba, C. P. (2005a) Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, n°6, p. 3100-5.
- Thurston-Enriquez, J. a, Haas, C. N., Jacangelo, J. et Gerba, C. P. (2005b) Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water research*, vol. 39, n°15, p. 3650-6.
- Ticehurst, J. R., Racaniello, V. R., Baroudy, B. M., Baltimore, D., Purcell, R. H. et Feinstone, S. M. (1983) Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, n°19, p. 5885-9.
- Tojo, K., Sano, D., Miura, T., Nakagomi, T., Nakagomi, O. et Okabe, S. (2013) A new approach for evaluating the infectivity of noncultivable enteric viruses without cell culture. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, vol. 67, n°10, p. 2236-40.
- Topping, J. R., Schnerr, H., Haines, J., Scott, M., Carter, M. J., Willcocks, M. M., Bellamy, K., Brown, D. W., Gray, J. J., Gallimore, C. I. et Knight, a I. (2009) Temperature inactivation of Feline calicivirus vaccine strain FCV F-9 in comparison with human noroviruses using an RNA exposure assay and reverse transcribed quantitative real-time polymerase chain reaction-A novel method for predicting virus infectivity. *Journal of virological methods*, vol. 156, n°1-2, p. 89-95.
- Toropova, K., Basnak, G., Twarock, R., Stockley, P. G. et Ranson, N. a (2008) The three-dimensional structure of genomic RNA in bacteriophage MS2: implications for assembly. *Journal of molecular biology*, vol. 375, n°3, p. 824-36.
- Totsuka, A. et Moritsugu, Y. (1999) Hepatitis A virus proteins. *Intervirology*, vol. 42, n°2-3, p. 63-8.
- Tsukada, K., Okazaki, M., Kita, H., Inokuchi, Y., Urabe, I. et Yomo, T. (2009) Quantitative analysis of the bacteriophage Qbeta infection cycle. *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1790, n°1, p. 65-70.
- Tuladhar, E., Bouwknegt, M., Zwietering, M. H., Koopmans, M. et Duizer, E. (2012) Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety. *Journal of applied microbiology*, vol. 112, n°5, p. 1050-7.
- Tuthill, T. J., Gropelli, E., Hogle, J. M. et Rowlands, D. J. (2010) Picornaviruses. *Current topics in microbiology and immunology*, vol. 343, p. 43-89.
- Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K. et Unge, T. (1990) The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature*, vol. 345, n°6270, p. 36-41.
- Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K. et Unge, T. (1991) Structure determination of the bacteriophage MS2. *Acta crystallographica. Section B, Structural science*, vol. 47, n°1985, p. 408-414.
- Valegård, K., Murray, J. B., Stonehouse, N. J., van den Worm, S., Stockley, P. G. et Liljas, L. (1997) The three-dimensional structures of two complexes between recombinant MS2 capsids and RNA operator fragments reveal sequence-specific protein-RNA interactions. *Journal of molecular biology*, vol. 270, n°5, p. 724-38.
- van Oss, C. J. (1996) *Forces interfaciales en milieux aqueux.* (Masson.).
- van Voorthuizen, E. ., Ashbolt, N. . et Schäfer, a. . (2001) Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *Journal of Membrane Science*, vol. 194, n°1, p. 69-79.
- Vashist, S., Bailey, D., Putics, A. et Goodfellow, I. (2009) Model systems for the study of human norovirus Biology. *Future virology*, vol. 4, n°4, p. 353-367.
- Vaughan, G., Goncalves Rossi, L. M., Forbi, J. C., de Paula, V. S., Purdy, M. A., Xia, G. et Khudyakov, Y. E. (2014) Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection*,



- genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, vol. 21, p. 227-43.
- Venkataram Prasad, B. V, Hardy, M. E. et Estes, M. K. (2000) Structural studies of recombinant Norwalk capsids. *The Journal of infectious diseases*, vol. 181 Suppl, p. S317-21.
- Vesper, S., McKinstry, C., Hartmann, C., Neace, M., Yoder, S. et Vesper, A. (2008) Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *Journal of microbiological methods*, vol. 72, n°2, p. 180-4.
- Vinje, J. (2015) Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of clinical microbiology*, vol. 53, n°2, p. 373-81.
- Vinje, J., Oudejans, S. J. G., Stewart, J. R., Sobsey, M. D. et 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*, vol. 70, n°10, p. 5996-6004.
- Vogel, R., Willmott, G., Kozak, D., Roberts, G. S., Anderson, W., Groenewegen, L., Glossop, B., Barnett, A., Turner, A. et Trau, M. (2011) Quantitative sizing of nano/microparticles with a tunable elastomeric pore sensor. *Analytical Chemistry*, vol. 83, n°9, p. 3499-3506.
- von Gunten, U. (2003a) Ozonation of drinking water: part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water research*, vol. 37, n°7, p. 1469-87.
- von Gunten, U. (2003b) Ozonation of drinking water: part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water research*, vol. 37, n°7, p. 1443-67.
- von Gunten, U. (2007) The basics of oxidants in water treatment. Part B: Ozone reactions. *Water Science and Technology*, vol. 55, n°12, p. 25-29.
- Vongpunsawad, S., Venkataram Prasad, B. V et Estes, M. K. (2013) Norwalk Virus Minor Capsid Protein VP2 Associates within the VP1 Shell Domain. *Journal of virology*, vol. 87, n°9, p. 4818-25.
- Walter, T. S., Ren, J., Tuthill, T. J., Rowlands, D. J., Stuart, D. I. et Fry, E. E. (2012) A plate-based high-throughput assay for virus stability and vaccine formulation. *Journal of Virological Methods*, vol. 185, n°1, p. 166-170.
- Wang, D., Xu, S., Yang, D., Young, G. M. et Tian, P. (2014) New in situ capture quantitative (real-time) reverse transcription-PCR method as an alternative approach for determining inactivation of Tulane virus. *Applied and environmental microbiology*, vol. 80, n°7, p. 2120-4.
- Wang, Q., Markland, S. et Kniel, K. E. (2015a) Inactivation of Human Norovirus and Its Surrogates on Alfalfa Seeds by Aqueous Ozone. *Journal of food protection*, vol. 78, n°8, p. 1586-91.
- Wang, Q., Zhang, Z. et Saif, L. J. (2012) Stability of and attachment to lettuce by a culturable porcine sapovirus surrogate for human caliciviruses. *Applied and environmental microbiology*, vol. 78, n°11, p. 3932-40.
- Wang, X., Ren, J., Gao, Q., Hu, Z., Sun, Y., Li, X., Rowlands, D. J., Yin, W., Wang, J., Stuart, D. I., Rao, Z. et Fry, E. E. (2015b) Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. *Nature*, vol. 517, n°7532, p. 85-8.
- Ward, R. L., Ashley, C. S. et Moseley, R. H. (1976) Heat inactivation of poliovirus in wastewater sludge. *Applied and environmental microbiology*, vol. 32, n°3, p. 339-46.
- Webby, R. J., Carville, K. S., Kirk, M. D., Greening, G., Ratcliff, R. M., Crerar, S. K., Dempsey, K., Sarna, M., Stafford, R., Patel, M. et Hall, G. (2007) Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, vol. 44, n°8, p. 1026-31.

- Weber, H. (1976) The binding site for coat protein on bacteriophage Q $\beta$  RNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, vol. 418, n°2, p. 175-183.
- Wei, Y., Liu, T., Wang, J., He, X. et Wang, Z. (2014) Development of a method to detect infectious rotavirus and astrovirus by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with propidium monoazide (PMA). *Scientific Research and Essays*, vol. 9, n°9, p. 311-314.
- Weissmann, C., Billeter, M. A., Goodman, H. M., Hindley, J. et Weber, H. (1973) Structure and function of phage RNA. *Annual review of biochemistry*, vol. 42, n°3506, p. 303-28.
- Werber, D., Lausević, D., Mugosa, B., Vratnica, Z., Ivanović-Nikolić, L., Zizić, L., Alexandre-Bird, A., Fiore, L., Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Battistone, A., Gassilloud, B., Perelle, S., Nitzan Kaluski, D., Kivi, M., Andraghetti, R. et Pollock, K. G. J. (2009) Massive outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of municipal drinking water in a European capital city. *Epidemiology and infection*, vol. 137, n°12, p. 1713-20.
- Westrell, T., Dusch, V., Ethelberg, S., Harris, J., Hjertqvist, M., da Silva, N. J., Koller, A., Lenglet, A., Lisby, M. et Vold, L. (2010) Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Eurosurveillance*, vol. 15, n°12, p. 7-10.
- Wigginton, K. R. et Kohn, T. (2012) Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. *Current opinion in virology*, vol. 2, n°1, p. 84-9.
- Wigginton, K. R., Pecson, B. M., Bosshard, F., Kohn, T. et Sigstam, T. (2012) Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environmental science & technology*, vol. 46, n°21, p. 12069-78.
- Winterbourn, C. C. et Kettle, A. J. (2000) Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 29, n°5, p. 403-409.
- Wirblich, C., Thiel, H. J. et Meyers, G. (1996) Genetic map of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus as deduced from in vitro translation studies. *Journal of virology*, vol. 70, n°11, p. 7974-83.
- Wobus, C. E., Karst, S. M., Thackray, L. B., Chang, K.-O., Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Krug, A., Mackenzie, J. M., Green, K. Y. et Virgin, H. W. (2004) Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS biology*, vol. 2, n°12, p. e432.
- Wobus, C. E., Thackray, L. B. et Virgin, H. W. (2006) Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *Journal of virology*, vol. 80, n°11, p. 5104-12.
- Wolf, S., Rivera-Aban, M. et Greening, G. E. (2009) Long-Range Reverse Transcription as a Useful Tool to Assess the Genomic Integrity of Norovirus. *Food and Environmental Virology*, vol. 1, n°3-4, p. 129-136.
- Wolff, M. W., Siewert, C., Hansen, S. P., Faber, R. et Reichl, U. (2010) Purification of cell culture-derived modified vaccinia ankara virus by pseudo-affinity membrane adsorbers and hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 107, n°2, p. 312-20.
- Xu, F., Wang, S., Xu, J., Liu, S. et Li, G. (2016) Effects of combined aqueous chlorine dioxide and UV-C on shelf-life quality of blueberries. *Postharvest Biology and Technology*, vol. 117, p. 125-131.
- Xu, S., Wang, D., Yang, D., Liu, H. et Tian, P. (2015) Alternative methods to determine infectivity of Tulane virus: A surrogate for human norovirus. *Food Microbiology*, vol. 48, p. 22-27.
- Xue, B., Jin, M., Yang, D., Guo, X., Chen, Z., Shen, Z., Wang, X., Qiu, Z., Wang, J., Zhang, B. et Li, J. (2013) Effects of chlorine and chlorine dioxide on human rotavirus infectivity and genome stability. *Water research*, vol. 47, n°10, p. 3329-38.

- Yang, Y. et Griffiths, M. W. (2014) Enzyme Treatment Reverse Transcription-PCR To Differentiate Infectious and Inactivated F-Specific RNA Phages. *Applied and environmental microbiology*, vol. 80, n°11, p. 3334-40.
- Yapa, C. M., Furlong, C., Rosewell, A., Ward, K. A., Adamson, S., Shadbolt, C., Kok, J., Tracy, S. L., Bowden, S., Smedley, E. J., Ferson, M. J., Sheppard, V. et McAnulty, J. M. (2016) First reported outbreak of locally acquired hepatitis E virus infection in Australia. *The Medical Journal of Australia*, vol. 204, n°7, p. 274.
- Yeap, J. W., Kaur, S., Lou, F., Dicaprio, E., Morgan, M. et Linton, R. (2016) Inactivation Kinetics and Mechanism of a Human Norovirus Surrogate on Stainless Steel Coupons via Chlorine Dioxide Gas. *Applied and environmental microbiology*, vol. 82, n°1, p. 116-123.
- Yeh, H.-Y., Hwang, Y.-C., Yates, M. V, Mulchandani, A. et Chen, W. (2008) Detection of hepatitis a virus by using a combined cell culture-molecular beacon assay. *Applied and environmental microbiology*, vol. 74, n°7, p. 2239-43.
- Yeh, H., Yates, M. V, Mulchandani, A. et Chen, W. (2008) Visualizing the dynamics of viral replication in living cells via Tat peptide delivery of nuclease-resistant molecular beacons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, n°45, p. 17522-17525.
- Yoder, J. S., Blackburn, B. G., Craun, G. F., Hill, V., Levy, D. A., Chen, N., Lee, S. H., Calderon, R. L. et Beach, M. J. (2004) Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water--United States, 2001-2002. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, vol. 53, n°8, p. 1-22.
- Youngner, J. S. (1957) Thermal inactivation studies with different strains of poliovirus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 78, n°4, p. 282-90.
- Zheng, D.-P., Ando, T., Fankhauser, R. L., Beard, R. S., Glass, R. I. et Monroe, S. S. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, vol. 346, n°2, p. 312-23.
- Zhou, N., Zhang, H., Lin, X., Hou, P., Wang, S., Tao, Z., Bi, Z. et Xu, A. (2016) A waterborne norovirus gastroenteritis outbreak in a school, eastern China. *Epidemiology and infection*, p. 1-8.
- Zhuang, J. et Jin, Y. (2008) Interactions between viruses and goethite during saturated flow: effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *Journal of contaminant hydrology*, vol. 98, n°1-2, p. 15-21.
- Zlotnick, a, Aldrich, R., Johnson, J. M., Ceres, P. et Young, M. J. (2000) Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology*, vol. 277, n°2, p. 450-456.

***Annexes***

Tableau A1. Les différents milieux de culture de la bactérie *E. coli* K12 Hfr

Réactifs	Masse (g)	Volume (L)
<b>TYGB (Tryptone Yeast-extract Glucose Broth)</b>		
Tryptone (Sigma-Aldrich, réf. T9410-1KG)	10	-
Extrait de levure (Mastgroup, réf. RM70B)	1	-
NaCl (Sigma-Aldrich, réf. S3014-500G)	3	-
Eau désionisée	-	1
<b>TYGA (Tryptone Yeast-extract Glucose Agar)</b>		
Tryptone	10	-
Extrait de levure	1	-
NaCl	3	-
Agar (Sigma-Aldrich, réf. 05039-500G)	15	-
Eau désionisée	-	1
<b>ssTYGA (semi-solid Tryptone Yeast-extract Glucose Agar)</b>		
Tryptone	10	-
Extrait de levure	1	-
NaCl	3	-
Agar	8	-
Eau désionisée	-	1

Tableau A2. Les différents milieux de culture des cellules RAW 264.7.

Réactifs	Volume (mL)	Concentration finale
<b>Milieu de croissance</b>		
Dulbecco's Minimum Essential Medium ou DMEM (Life technologies, réf. 61965-026)	500	-
Sérum De Veau Foetal ou SVF (Life technologies, réf. 10270-098)	55	10 %
Acides Aminés Non Essentiels ou AANE (Life technologies, réf. 11140-035)	5,5	1 %
Tampon HEPES 1M (Dutscher, réf. L0180-500)	5,5	1 %
<b>Milieu de titrage</b>		
MEM ou Minimal Essential Medium (Life technologies, réf. 31095-052)	500	-
SVF	27,5	5 %
AANE	5,5	1 %
Pyruvate de sodium 100 mM (Life technologies, réf. 11360-039)	5,5	1 %
Tampon HEPES 1 M	5,5	1 %
<b>Milieu de maintenance</b>		
MEM	500	-
SVF	11	2 %
AANE	5,5	1 %
Pyruvate de sodium 100 mM	5,5	1 %
Tampon HEPES 1 M	5,5	1 %

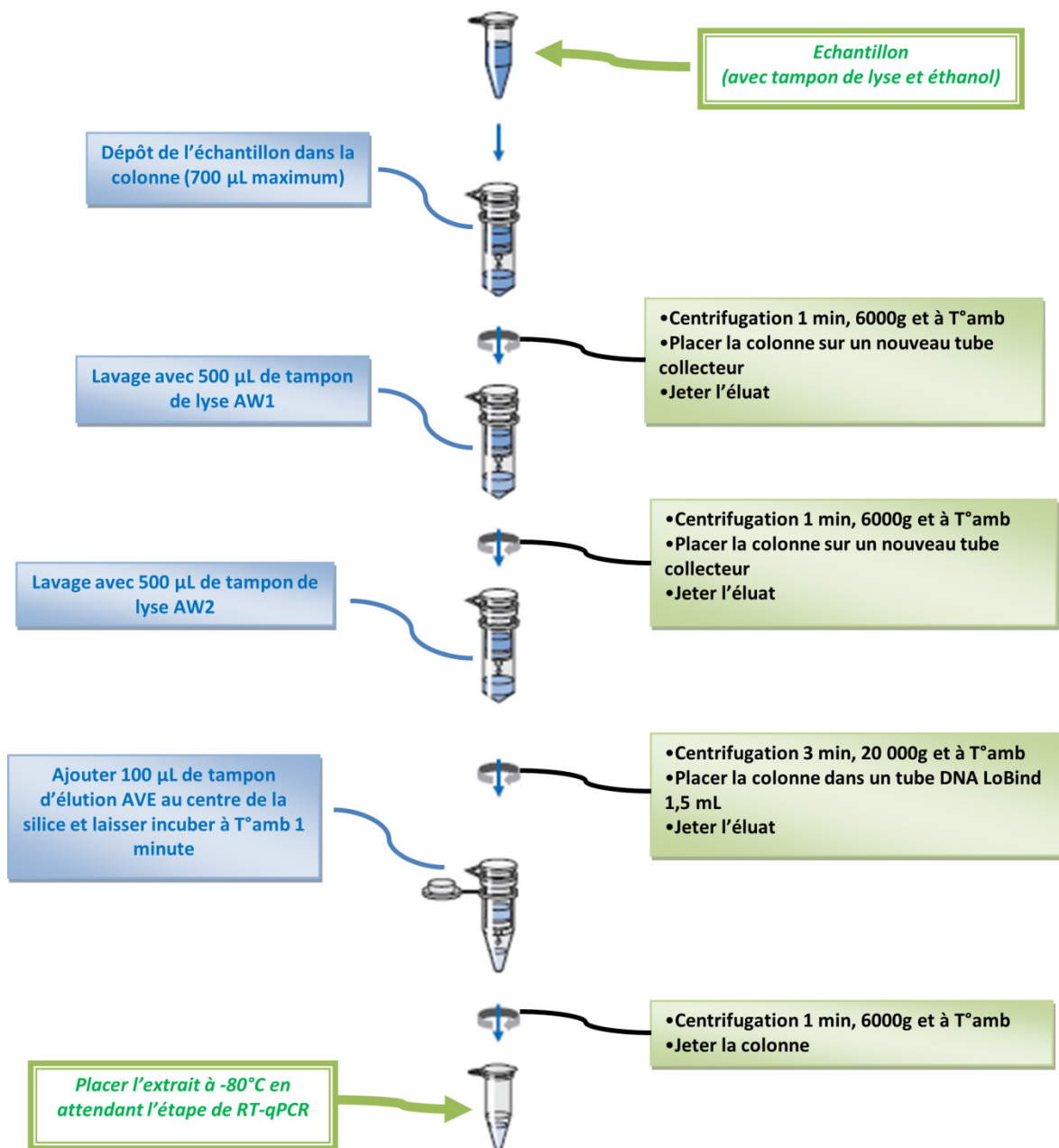


Figure A1. Schéma de l'extraction de l'ARN du phage MS2 avec le kit QIAamp® Viral RNA.

Tableau A3. Tableau récapitulatif des réactifs et de leur volume utilisés pour la RT-qPCR.

Réactifs	Volume par réaction (µL)
<b>1ère étape de la RT</b>	
dNTP (10 mM, Life Technologies, réf. N8080260)	1
Amorces anti-sens (40 µM ou 10 µM pour le phage MS2 et le MNV, Sigma)	0,5
Eau DEPC (Sigma, réf. W4502)	4
<b>Total</b>	<b>5,5</b>
<b>Répartir 5,5 µL de mélange par puits</b>	
<b>Ajouter 7,5 µL d'échantillon par puits</b>	
<b>Incuber 5 min à 65°C</b>	
<b>2ème étape de la RT</b>	
Eau DEPC (Sigma, réf. W4502)	1
DTT (0,1 M, Life Technologies, réf. 18080-044)	1
RNase OUT (40 U/µL, Life technologies, réf.10777-019)	0,5
SuperScript III (200 U/µL, Life Technologies, réf. 18080-044)	0,5
Tampon (5X, Life Technologies, réf. 18080-044)	4
<b>Total</b>	<b>7</b>
<b>Répartir 7 µL de mélange par puits</b>	
<b>Incuber 1h à 50°C puis 15 min à 70°C</b>	
<b>qPCR</b>	
Eau DEPC (Sigma, réf. W4502)	5,7
Amorces sens (40 µM ou 10 µM pour le phage MS2 et le MNV, Sigma)	0,65
Amorces anti-sens (40 µM ou 10 µM pour le phage MS2 et le MNV, Sigma)	0,65
Sonde (15 µM ou 10 µM pour le phage MS2 et le MNV, Life Technologies)	0,5
Master Mix (2X, Life Technologies, réf. 4318157)	12,5
<b>Total</b>	<b>20</b>
<b>Ajouter 20 µL du mélange dans chaque puits et ajouter 5 µL d'ADNc</b>	
<b>Incuber 2 min à 50°C puis 10 min à 95°C puis 45 cycles : 15 sec à 95°C et 60 sec à 60°C</b>	



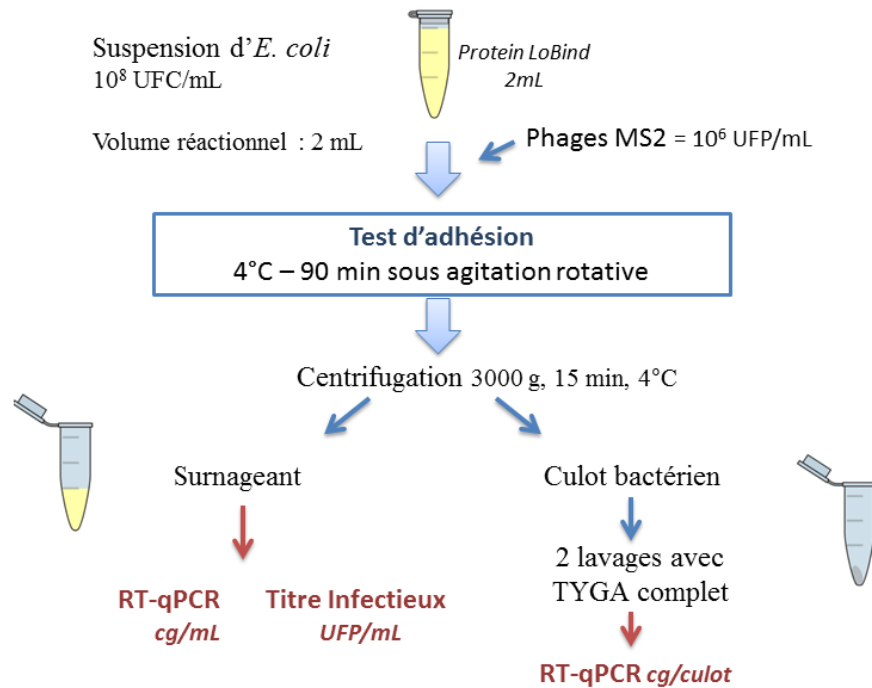


Figure A2. Schéma du protocole pour l'étude de l'adhésion du phage MS2 à *E. coli* K12 Hfr.

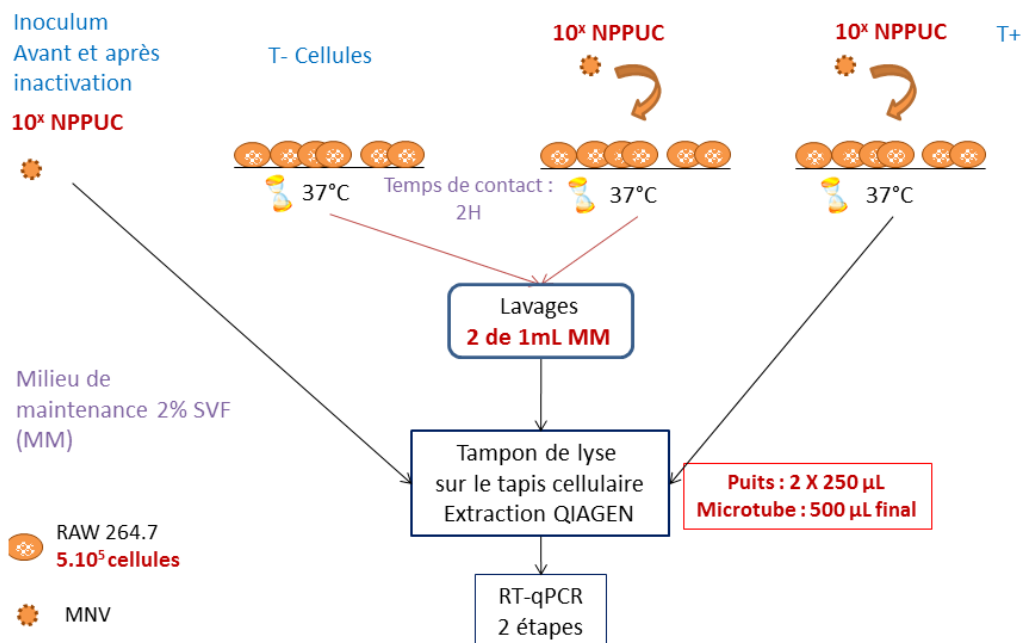


Figure A3. Schéma du protocole d'étude de l'adhésion du virus MNV aux cellules RAW 264.7.

Tableau A4. Préparation des solutions nécessaires au dosage de l'hypochlorite de sodium

Solution	Réactifs nécessaires	Protocole de préparation	Conservation
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M</b>	Acide sulfurique concentré (96%)	Déposer 5,61 mL d'acide sulfurique concentré dans un bécher contenant 80 mL d'eau ultra-pure, dans la glace (réaction exothermique) Compléter à 100 mL dans une fiole jaugée	4°C
<b>NaOH 2 M</b>	Pastilles de soude solides (SDS, réf. 1040527)	Dissoudre 8 g de soude dans un bécher contenant 80 mL d'eau ultra-pure, dans la glace (réaction exothermique) Compléter à 100 mL dans une fiole jaugée	4°C
<b>EDTA sodique à 0,8 %</b>	EDTA liquide à 0,5 M (Sigma-Aldrich, réf. E7889/070M8702)	Diluer l'EDTA dans l'eau ultra-pure à raison de 1,1 mL d'EDTA pour 18,9 mL d'eau	Préparation extemporanée
<b>DPD à 0,1 %</b>	Sulfate DPD anhydre (Sigma-Aldrich, réf. 16.834-3) Acide sulfurique 1 M	Déposer 2 mL d'acide sulfurique 1 M et 6,25 mL d'EDTA sodique à 0,8 % dans 75 mL d'eau ultra-pure Dissoudre dans ce mélange 0,275 g de sulfate de DPD et compléter à 250 mL dans une fiole jaugée	1 mois maximum à 4°C et à l'abri de la lumière
<b>Solution tampon</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Acros, réf. 271080025) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (Prolabo, réf. 28029.235)	Mélanger dans une fiole jaugée contenant de l'eau ultra-pure 11,5 g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 7,52 g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O et 25 mL d'EDTA sodique à 0,8 % Compléter à 250 mL	4°C
<b>Iodate de potassium à 1,006 g/L</b>	KIO <sub>3</sub> (Prolabo, réf. 26840.235)	Dissoudre 0,503 g de KIO <sub>3</sub> dans 500 mL d'eau ultra pure	Préparation extemporanée
<b>Iodate de potassium ioduré à 10,06 mg/L</b>	KI (Sigma-Aldrich, réf. 30315)	Dissoudre 0,5 g de KI dans 450 mL d'eau ultra-pure Ajouter 5 mL d'iodate de potassium à 1,006 g/L et compléter à 500mL	Préparation extemporanée

Tableau A5. Gamme de dilution d'iodate ioduré pour la droite étalon de l'hypochlorite de sodium

Equivalent Cl <sub>2</sub>	0 mg/L Cl <sub>2</sub>	0,5 mg/L Cl <sub>2</sub>	1 mg/L Cl <sub>2</sub>	2 mg/L Cl <sub>2</sub>	2,5 mg/L Cl <sub>2</sub>	5 mg/L Cl <sub>2</sub>
Iodate ioduré (mL)	0	5	10	20	25	50
Eau ultra-pure (mL)	50	45	40	30	25	0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M (mL)	1	1	1	1	1	1
<i>Attendre 1 minute (formation de I<sub>3</sub><sup>-</sup>)</i>						
NaOH 2 M	1	1	1	1	1	1
Eau ultra-pure	<i>Compléter à 100 mL</i>					

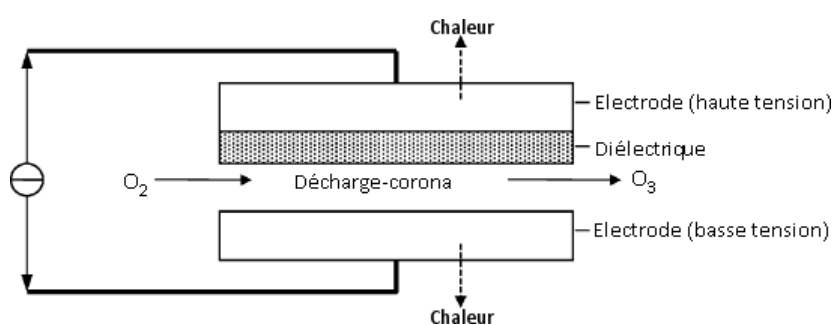


Figure A4. Schéma de la production d'ozone par le procédé de décharge-corona (d'après Guzel et al., 2004)

---

## Résumé

Même si les traitements thermiques ou la désinfection par les oxydants ont démontré leur efficacité virucide, les mécanismes liés à la perte du caractère infectieux ne sont pas connus. Ceci pose un réel problème d'interprétation de la présence de génome viral en matière de risque infectieux pour l'homme dans les matrices alimentaires. Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier l'évolution des propriétés de surface (charge et hydrophobie) de virus modèles, bactériophage MS2 et norovirus murin, au cours de l'inactivation par la chaleur, l'hypochlorite de sodium et l'ozone. Pour nos deux virus modèles, nous démontrons l'existence d'une température critique au-delà de laquelle la particule virale se déstructure en libérant son génome. Un simple traitement à la RNase permettrait alors de ne détecter que des virus infectieux par biologie moléculaire. Le traitement thermique implique aussi une augmentation transitoire de l'hydrophobie soulignant des modifications conformationnelles de la capsid des virus. L'hypochlorite de sodium ne modifie que faiblement les propriétés de surface mais des phénomènes d'oxydation ont lieu au niveau de la capsid puisque la charge du bactériophage MS2 est légèrement modifiée. Ces modifications diminuent la résistance thermique du virus. Nous démontrons qu'il existe un effet synergique de l'hypochlorite de sodium et la chaleur sur l'inactivation virale, l'efficacité de la RNase et l'hydrophobie du bactériophage MS2. Quant à l'ozone gazeux, nous soulignons son intérêt pour le traitement virucide des matrices alimentaires fragiles. De plus, son efficacité est augmentée dans les matrices alimentaires acides telles que les framboises. Ainsi, ce travail précise les mécanismes d'inactivation des virus et ouvre de nouvelles perspectives tant pour discriminer les virus infectieux et non-infectieux que pour proposer l'exploration de nouveaux traitements technologiques.

**Mots clés :** bactériophage MS2, norovirus murin, propriétés de surface, traitements technologiques, inactivation.

## Abstract

Although heat treatments or disinfections by oxidants have proven their virucidal efficiencies, mechanisms related to the loss of infectivity are not known. This statement could lead to a misinterpretation of the presence of viral genome on infection risk for humans in food matrices. This thesis aimed to study the evolution of surface properties (charge and hydrophobicity) for model viruses, bacteriophage MS2 and murine norovirus, during the heat, sodium hypochlorite and ozone inactivations. For both viruses, the existence of a critical temperature beyond which the viral particle was disrupted and released its genome was demonstrated. Simple treatment with RNase would then only detect infectious virus by molecular biology. The heat treatment also involved a transient increase in the hydrophobicity which highlighted conformational changes of the viral capsid. Sodium hypochlorite slightly modified the surface properties but oxidation phenomena occurred onto capsid since the bacteriophage MS2 charge has changed a little. These changes decreased the thermal resistance of the virus. Synergistic effects of both sodium hypochlorite and heat were observed on the inactivation of MS2 phages, the sensitivity of their genome to RNases and the increase in hydrophobicity of remaining infectious particles. Regarding gaseous ozone, we underlined its interest in the case of virucidal treatment of fragile food matrices. Furthermore, its efficacy was increased in acidic matrices such as raspberries. Therefore, this work specified the virus inactivation mechanisms and opened up new perspectives to discriminate infectious from non-infectious viruses but also to propose the exploration of new technological processes.

**Keywords:** MS2 bacteriophage, murine norovirus, surface properties, industrial treatments, inactivation.

---