HAL
open science

Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs du danger viral lié à la pollution fécale des matrices hydriques et alimentaires

Cédric Hartard

To cite this version:

Cédric Hartard. Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs du danger viral lié à la pollution fécale des matrices hydriques et alimentaires. Virologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0152 . tel-01768003

HAL Id: tel-01768003

https://theses.hal.science/tel-01768003v1

Submitted on 16 Apr 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE
Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Cédric HARTARD**

Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs du danger viral lié à la pollution fécale des matrices hydriques et alimentaires

le 14 novembre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :

Pr Juan JOFRE	Département de Microbiologie, Faculté de Biologie, Université de Barcelone, Espagne
Dr Anna Charlotte SCHULTZ	Institut National de l'Alimentation, Université Technique du Danemark, Danemark

Examinateurs :

Pr Christophe GANTZER	LCPME UMR 7564, CNRS - Université de Lorraine, Nancy, Directeur de thèse
Dr Michèle GOURMELON	Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie, IFREMER, Brest

Membres invités :

Dr Nicolas BOUDAUD	Pôle Sécurité des Aliments, ACTALIA, Saint-Lô
Dr Alexis de ROUGEMONT	Centre National de Référence des virus des gastro-entérites, Dijon

LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement)
UMR 7564 CNRS - Université de Lorraine, Nancy

« Nous buvons 90 % de nos maladies »

Louis Pasteur (1822-1895)

REMERCIEMENTS

A travers ces quelques lignes, je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude envers le Pr Christophe GANTZER, directeur scientifique de cette thèse, pour m'avoir proposé ce projet et accueilli au sein du laboratoire. Merci de m'avoir accordé votre confiance en me laissant l'autonomie nécessaire à l'accomplissement de ces travaux tout en restant disponible pour m'apporter soutien et conseils.

Je suis très sensible à l'honneur que me font le Dr Anna Charlotte SCHULTZ et le Pr Juan JOFRE en acceptant de rapporter ce travail et en apportant leur expertise dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de la virologie environnementale. Je tiens également à remercier le Dr Michèle GOURMELON et le Dr Alexis de ROUGEMONT pour avoir accepté de prendre place au sein de ce jury. Je remercie enfin le Dr Nicolas BOUDAUD pour sa présence mais aussi pour son soutien et sa disponibilité lors de nos nombreuses collaborations.

Je souhaite également témoigner ma reconnaissance à l'ensemble des personnes qui, de près ou de loin, ont participé à l'aboutissement de ce projet. J'adresse en particulier mes remerciements au Pr Armand MAUL, pour son aide précieuse et sa patience lors de nos échanges très constructifs qui m'ont permis de mieux appréhender le domaine complexe qu'est l'analyse statistique. Je remercie également Gabriel, Margot et Mehdi, les trois stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer durant cette thèse.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du LCPME et plus particulièrement à l'équipe de microbiologie environnementale pour leur accueil. Un grand merci à Pauline, Rémi et Romain qui, par leur bonne humeur, ont rendu cette épreuve un peu plus facile. Je remercie plus particulièrement Romain pour sa patience et ses précieux conseils prodigués depuis mon Master afin de m'apprendre le métier de chercheur. Merci également à Sandrine pour sa disponibilité et ses talents logistiques lorsqu'il s'agit de faire venir des échantillons de l'autre bout du monde. Merci à David pour son aide technique.

Je remercie enfin mes amis et ma famille pour leur soutien quotidien. A mes parents, pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises, que ce travail soit le témoignage de ma gratitude. A Laura, pour ton soutien indéfectible et tes encouragements durant toutes ces années.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures iv
Liste de tableaux vi
Liste des abréviations vii
Introduction – Objectifs 1

1ère PARTIE : Etude bibliographique 9

I. Danger lié à la présence de virus entériques pathogènes dans les matrices hydriques et alimentaires 11
I.1 Principaux virus en cause 12
I.1.1 Les norovirus 15
I.1.2 Le virus de l'hépatite A 16
I.2 Matrices en cause 17
I.2.1 Les coquillages 18
I.2.2 Les produits maraîchers 20
I.2.3 L'eau 21
I.2.4 Contamination par la manutention 21
I.3 Facteurs favorisant 22
I.3.1 Persistance des virus entériques dans l'environnement 22
I.3.2 Interaction avec les denrées alimentaires 24
II. Evaluation de la contamination fécale des matrices hydriques et alimentaires 26
II.1 Contexte réglementaire actuel : les indicateurs bactériens de pollution fécale 26
II.2 Limites des indicateurs bactériens et besoins actuels 28
II.2.1 Les indicateurs bactériens pour déterminer l'origine d'une contamination fécale 28
II.2.2 Les indicateurs bactériens pour indiquer la présence des virus entériques pathogènes 29
II.3 Alternatives pour déterminer l'origine d'une contamination fécale 31
II.3.1 Méthodes bibliothèque-dépendantes 32
II.3.2 Méthodes bibliothèque-indépendantes 34
II.4 Alternatives pour mieux apprécier le danger viral 35
II.4.1 Recherche des virus pathogènes les plus préoccupants 35
II.4.1.1 Recherche des génomes de norovirus et du virus de l'hépatite A : la norme ISO 15216 36
II.4.1.1.1 Description 36
II.4.1.1.2 Sous-estimation du danger viral 39
II.4.1.1.3 Surestimation du danger viral 41

II.4.1.1.4 Mise en place d'un seuil de risque **42**
II.4.1.2 Détection des virus infectieux par biologie moléculaire **43**
II.4.2 Les autres indicateurs pour apprécier la pollution virale et le danger associé **44**
II.4.2.1 L'indicateur de pollution idéal **44**
II.4.2.2 Les indicateurs de nature virale **45**
II.4.2.3 Les bactériophages fécaux **46**
II.4.2.3.1 Les coliphages somatiques **48**
II.4.2.3.2 Les bactériophages de *Bacteroides spp.* **48**
III. Les bactériophages ARN F-spécifiques **50**
III.1 Description **50**
III.1.1 Génome **51**
III.1.2 Capside **52**
III.1.3 Classification **53**
III.2 Méthodes de détection **54**
III.2.1 Culture **54**
III.2.2 Biologie moléculaire **56**
III.2.3 Typage des bactériophages ARN F-spécifiques **57**
III.3 Utilisation des bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution dans l'environnement **58**
III.3.1 Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution fécale **58**
III.3.2 Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution virale **60**
III.3.2.1 Stabilité des FRNAPH dans l'environnement **60**
III.3.2.1.1 Comportement lors du traitement des eaux usées **62**
III.3.2.1.2 Comportement dans les eaux environnementales **65**
III.3.2.2 Corrélation avec les virus entériques pathogènes **66**
III.3.2.2.1 Les bactériophages ARN F-spécifiques et les virus entériques pathogènes dans les eaux environnementales **66**
III.3.2.2.2 Les bactériophages ARN F-spécifiques et les virus entériques pathogènes dans les coquillages **68**
- Corrélation entre FRNAPH et norovirus dans les coquillages issus des zones conchylicoles **69**
- Accumulation et élimination des FRNAPH dans les coquillages **71**

III.3.2.3 Corrélation avec le danger viral pour l'Homme **76**
III.3.3 Les bactériophages ARN F-spécifiques pour discriminer l'origine d'une contamination fécale **78**

2ème PARTIE : Peut-on utiliser les FRNAPH comme indicateurs de pollution virale dans les principales sources de contamination de l'environnement ? 83

I. Peut-on utiliser les FRNAPH pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine ? **85**

II. La survie des différents génogroupes de FRNAPH dans les eaux usées est-elle compatible avec leur utilisation en tant qu'indicateurs de pollution ? **90**

III. La concentration des FRNAPH demeure-t-elle toujours supérieure à celle des virus entériques pathogènes dans les eaux usées ? **106**

3ème PARTIE : Peut-on utiliser les FRNAPH comme indicateurs de pollution virale dans les matrices hydriques et alimentaires ? 113

4ème PARTIE : Mise au point d'une technique permettant d'évaluer le caractère infectieux des FRNAPH de chacun des génogroupes 129

5ème PARTIE : Quelle est la pertinence de la détection des génomes des norovirus dans les coquillages pour évaluer le danger viral ? 141

6ème PARTIE : Discussion générale et perspectives 171

Références bibliographiques **185**

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

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Observation au microscope électronique de virus entériques pathogènes couramment associés à une transmission hydrique ou alimentaire **14**

Figure 2 : Schéma conceptuel d'exposition aux virus entériques *via* les aliments.....**18**

Figure 3 : Conduite à tenir avant la distribution des mollusques bivalves selon leur zone de production **27**

Figure 4 : Description schématique de la norme ISO 15216 relative à la recherche du virus de l'hépatite A et des norovirus dans les aliments par RT-PCR en temps réel.....**37**

Figure 5 : Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages.....**47**

Figure 6 : Bactériophages ARN F-spécifiques adhérés à la surface des *pili* sexuels d'une bactérie *Escherichia coli*.....**50**

Figure 7 : Organisation du génome des bactériophages MS2 et Qβ.....**51**

Figure 8 : Structure de la capside du bactériophage MS2 .....**52**

Figure 9 : Structure asymétrique de la capside du bactériophage MS2 .....**53**

Figure 10 : Détection des bactériophages infectieux.....**55**

Figure 11 : Elimination de différents indicateurs et virus pathogènes lors de l'épuration des eaux usées.....**63**

Figure 12 : Concentrations en FRNAPH-II (génomes et particules infectieuses) et en norovirus du génogroupe GII (génomes) mesurées dans des huîtres impactées par le débordement d'un station d'épuration.....**73**

Figure 13 : Persistance des génomes de norovirus, des FRNAPH infectieux et d'*E. coli* lors de la purification des coquillages.....**76**

Figure 14 : Détection des FRNAPH-II et -III en utilisant les amorces et sondes proposées par Ogorzaly & Gantzer (2006).....**89**

Figure 15 : Persistance des différents génogroupes de FRNAPH (génomes et particules infectieuses) lors du traitement des eaux usées urbaines.....**91**

Figure 16 : Modification de la distribution des génogroupes de FRNAPH (particules infectieuses et génomes) au cours du temps dans les eaux usées urbaines (4°C, obscurité) **93**

Figure 17 : Taux d'incidence des diarrhées aiguës en Lorraine entre la semaine 2015s45 et 2016s15 .....**107**

Figure 18 : Concentrations en génomes de FRNAPH-I, -II et -III ainsi que celles des norovirus des génogroupes GI et GII dans les eaux usées brutes en période épidémique de gastro-entérites **108**

Figure 19 : Concentrations en génomes de FRNAPH-I, -II et -III ainsi que celles des norovirus des génogroupes GI et GII dans les eaux usées traitées en période épidémique de gastro-entérites **109**

Figure 20 : Elimination des génomes des FRNAPH-I, -II, -III et des norovirus des génogroupes GI et GII lors du traitement des eaux usées. **110**

Figure 21 : Principe de l'ICC-RTqPCR appliqué à la détection des FRNAPH infectieux dans les coquillages. **131**

LISTE DE TABLEAUX

Tableau I : Principaux microorganismes pathogènes pour l'Homme susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique **12**

Tableau II : Caractéristiques structurales des principaux virus entériques pathogènes.....**14**

Tableau III : Exemple d'épidémies associées à la consommation de coquillages contaminés par des virus entériques. **20**

Tableau IV : Paramètres influençant la survie des virus dans l'environnement **23**

Tableau V : Classement sanitaire des zones conchylicoles en Europe. **27**

Tableau VI : Prévalence des norovirus dans les coquillages selon leur niveau de pollution estimé par la recherche d'*E. coli*.....**30**

Tableau VII : Méthodes microbiologiques disponibles pour déterminer l'origine d'une pollution fécale. **33**

Tableau VIII : Amorces et sondes utilisées pour la détection du virus de l'hépatite A et des norovirus du génogroupe GI et GII dans les matrices alimentaires, d'après la norme ISO 15216. .....**38**

Tableau IX : Probabilité de détecter des génomes de norovirus dans des lots de coquillages en fonction de leur prévalence et de leur concentration.....**40**

Tableau X : Caractéristiques de l'indicateur idéal appliquées à la pollution de type viral.....**45**

Tableau XI : Classification des *Leviviridae* établie par le Comité International de Taxonomie des Virus **54**

Tableau XII : Abattement des norovirus et des phages ARN F-spécifiques infectieux lors de l'épuration des eaux usées, en fonction du type de traitement tertiaire utilisé.....**64**

Tableau XIII : Prévalence des norovirus dans les coquillages selon leur niveau de pollution estimé par la recherche des bactériophages ARN F-spécifiques.....**69**

Tableau XIV : Cinétiques d'élimination des norovirus, FRNAPH et *E. coli* lors de la purification des coquillages **75**

Tableau XV : Distribution des quatre génogroupes de FRNAPH chez l'Homme et l'animal. **79**

Tableau XVI : Génotypage des FRNAPH isolés par culture à partir de différents types de matrices dont l'origine de la contamination fécale est connue. **86**

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	*Amplified fragment-length polymorphism*
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
ARA	*Antibiotic resistance analysis*
ARN	Acide ribonucléique
ARP	*Antibiotic resistance patterns*
ASQAAC	*Australian shellfish quality assurance advisory comittee*
BGM	*Buffalo green monkey kidney cell line*
CaCo-2	*Caucasian colon adenocarcinoma cell line*
CDC	*Centers for disease control and prevention*
CEFAS	*Centre for environment, fisheries and aquaculture science*
CEN	Comité européen de normalisation
cg	Copie de génome
CLI	Chair et liquide intervalvaire
CUP	*Carbon utilization profiling*
db	Double brin
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DGGE	*Denaturing gradient gel electrophoresis*
EFSA	*European food safety authority*
EMA	Ethidium monoazide
FAM	Carboxyfluoresceine
FAME	*Fatty acid methyl ester*
FAO	*Food and agriculture organization of the United Nations*
FCV	Calicivirus félin
FRNAPH	Bactériophages ARN F-spécifiques
HBGA	*Histo-blood group antigens*
IAWPRC	*International association on water pollution research and control*
ICC-RTqPCR	*Integrated cell culture* RTqPCR
ISO	*International organization for standardization*
ISSC	*Interstate shellfish sanitation conference*
kb	Kilobase
kDa	kilodalton
kpb	Kilo paire de bases
LOD	Limite de détection
LOQ	Limite de quantification
MA-104	*Epithelial monkey kidney cell line*

MAR	*Multiple antibiotic resistance*
MGB	*Minor groove binder*
MIQE	*Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*
MNV	Norovirus murin
NFQ	*Non-fluorescent quencher*
NoV	Norovirus
NPP	Nombre le plus probable
nt	Nucléotide
OECD	*Organisation for economic co-operation and development*
OMS / WHO	Organisation mondiale de la santé / *World health organization*
PBS	*Phosphate buffered saline*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PFGE	*Pulsed-field gel electrophoresis*
PMA	Propidium monoazide
qPCR	PCR en temps réel
RAPD	*Random amplified polymorphic* DNA
rep-PCR	*Repetitive element palindromic* PCR
RT	*Reverse transcription*
sb	Simple brin
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamine
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
UFC	Unité formant colonie
UFP	Unité formant plage
US EPA	*United States environmental protection agency*
VHA	Virus de l’hépatite A

Introduction – Objectifs

Les maladies infectieuses sont l'une des principales causes de décès à travers le monde et les pathogènes d'origine entérique transmis par voie hydrique ont toujours eu une place prépondérante dans leur survenue. Dès les premières observations de John Snow en 1855 sur le rôle de l'eau dans la transmission des pathogènes entériques, la surveillance de la qualité microbiologique des ressources hydriques est apparue essentielle (Snow, 1855). Aujourd'hui encore, l'accès à l'eau salubre et l'assainissement des eaux usées font partie des 17 objectifs de développement durable adoptés par l'Organisation des Nations Unies pour l'horizon 2030 (United Nations, 2015).

En plus de la voie hydrique, le rôle de certains aliments dans la propagation des pathogènes du péril fécal est aujourd'hui parfaitement perçu, en particulier lorsqu'ils sont issus d'un environnement souillé par des rejets d'eaux usées (Fiore, 2004; Havelaar *et al.*, 2015; Koopmans *et al.*, 2002; Scallan *et al.*, 2011).

Afin de lutter contre les maladies du péril fécal, la stratégie actuellement mise en place consiste à évaluer la contamination des matrices hydriques et des aliments en y recherchant certains microorganismes commensales de la flore intestinale comme *Escherichia coli* ou les entérocoques (*i.e.* indicateurs bactériens de pollution fécale). Cette mesure permet globalement une meilleure gestion de la qualité microbiologique des ressources hydriques et alimentaires et contribue largement aujourd'hui à limiter ces pathologies (Lin & Ganesh, 2013; Tallon *et al.*, 2005). Malheureusement, les pathogènes transmis par l'eau étant de nature extrêmement variée, la recherche de ces indicateurs présente encore certaines limites, en particulier lorsqu'il s'agit d'évaluer le danger lié aux virus entériques qui tiennent pourtant une place déterminante dans la survenue des maladies du péril fécal (CDC, 2011; Havelaar *et al.*, 2015; Lopman *et al.*, 2003).

En premier lieu, il est aujourd'hui largement décrit que les indicateurs bactériens présentent un comportement très différent de celui des virus entériques dans l'environnement, en particulier si on s'intéresse à leur persistance (Harwood *et al.*, 2005; Havelaar *et al.*, 1993; Jofre *et al.*, 1995). Les bactéries présentent en effet une résistance inférieure à celle des virus, que ce soit lors du traitement des eaux usées classiquement appliqué avant leur rejet dans l'environnement ou encore face aux différents facteurs d'inactivation rencontrés dans le milieu naturel (*e.g.* température, rayonnements UV). En conséquence, des virus entériques pathogènes sont fréquemment retrouvés dans des matrices hydriques ou alimentaires en l'absence des indicateurs conventionnels de contamination.

Les limites des indicateurs bactériens sont particulièrement perçues lorsqu'il s'agit d'évaluer la qualité microbiologique des coquillages, une catégorie d'aliments bien connue pour son

rôle dans la transmission des virus entériques. Il apparaît en effet que les coquillages sont capables d'accumuler plus efficacement les virus entériques présents dans les eaux environnantes et ce phénomène est particulièrement observé dans le cas des norovirus, les pathogènes responsables de la majorité des gastro-entérites associées à la consommation de fruits de mer (Bellou *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015). L'accumulation d'*E. coli* étant moins importante, et cet indicateur étant par ailleurs très facilement éliminé des coquillages lors des traitements de purification classiquement appliqués à ceux provenant des zones les plus contaminées (Lees, 2000; Richards *et al.*, 2010), il n'est pas rare d'observer des épidémies de gastro-entérites en lien avec la consommation de coquillages qui pourtant répondent à toutes les exigences réglementaires en matière de qualité microbiologique (Chalmers & McMillan, 1995; Doré *et al.*, 2010; EFSA, 2012; Le Guyader *et al.*, 2006a; Lowther *et al.*, 2010).

En deuxième lieu, la recherche des indicateurs bactériens conventionnels ne fournit actuellement aucune information quant à l'origine de la pollution puisque ceux-ci sont à la fois commensales du tractus digestif de l'Homme et de l'animal (Scott *et al.*, 2002; US EPA, 2005; Wicki *et al.*, 2015). Or, pouvoir déterminer l'origine d'une contamination est un paramètre important pour évaluer le danger microbiologique et assurer la mise en place des mesures nécessaires à l'amélioration de la qualité de l'eau et des aliments. L'identification des contaminations d'origine animale permet en effet de limiter la transmission des pathogènes zoonotiques à l'Homme tandis que la détection des sources de pollution humaine représentées par exemple par les rejets de station d'épuration est essentielle en raison de la forte spécificité d'hôte des virus pathogènes qui y sont présents (Cabelli *et al.*, 1982; Soller *et al.*, 2016, 2010).

Face à ces deux limites et afin de mieux gérer le danger lié à la présence de pathogènes dans les eaux ou dans certains aliments, des alternatives aux indicateurs bactériens conventionnels sont actuellement envisagées. Etant donné que les virus entériques constituent le danger majoritaire, la recherche d'un indicateur présentant des caractères structuraux proches de ces pathogènes est souhaitable, afin de mimer au mieux leur comportement dans l'environnement. Parmi le panel d'indicateurs actuellement à l'étude, les bactériophages fécaux et plus particulièrement les bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH) semblent présenter de nombreux intérêts (Jofre *et al.*, 2016).

Les FRNAPH sont des virus non pathogènes pour l'Homme capables de se multiplier en infectant certaines bactéries du tractus digestif des animaux à sang chaud. Excrétés dans les selles, ils sont alors retrouvés en concentrations importantes dans les eaux usées du monde entier et constituent alors à l'instar d'*E. coli* de véritables indicateurs de pollution

fécale (Blanch *et al.*, 2006; Cole *et al.*, 2003; Havelaar *et al.*, 1990; Long *et al.*, 2005; Schaper *et al.*, 2002b; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006). De structures génétique et morphologique très proches de celles des virus entériques pathogènes, ils semblent plus adaptés que les indicateurs bactériens à signaler un risque de pollution virale. Leur persistance, en particulier lors du traitement des eaux usées, a souvent conduit la communauté scientifique à les utiliser comme modèles pour étudier l'inactivation des virus pathogènes (McMinn *et al.*, 2017). En effet, contrairement à la majorité des virus entériques, le caractère infectieux des FRNAPH est facilement appréciable en utilisant des méthodes de culture rapides et peu coûteuses (International Organization for Standardization, 2001a). Enfin, la dernière plus-value fréquemment associée à ces indicateurs concerne leur potentiel à discriminer l'origine d'une contamination fécale. Le recours à des approches sérologiques puis génétiques a en effet permis de subdiviser les FRNAPH en quatre génogroupes dont la prévalence est variable en fonction de leur hôte (Bollback & Huelsenbeck, 2001; Furuse *et al.*, 1978). Il apparaît en effet que les FRNAPH du génogroupe I (FRNAPH-I) et FRNAPH-IV sont préférentiellement isolés chez l'animal, tandis que les FRNAPH-II et FRNAPH-III sont majoritairement retrouvés chez l'Homme. Ainsi, la recherche spécifique de certains génogroupes est parfois proposée pour identifier les sources de contamination humaine, majoritairement associées aux virus pathogènes (Haramoto *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Mieszkin *et al.*, 2013; Ogorzaly *et al.*, 2009; Ravva *et al.*, 2015; Shahrampour *et al.*, 2015; Wolf *et al.*, 2010; Yazdi *et al.*, 2017).

Si de nombreux arguments justifient donc l'utilisation des FRNAPH comme indicateurs de nature virale pour évaluer la qualité microbiologique des matrices hydriques et alimentaires, certaines limites leur sont encore fréquemment associées. Il apparaît en premier lieu que la recherche des différents génogroupes de FRNAPH ne permet pas systématiquement de déterminer l'origine de la contamination fécale. En effet, la présence de génogroupes typiquement associés à l'Homme est parfois observée dans des eaux polluées par des matières fécales animales et inversement (Blanch *et al.*, 2006, 2004). Par ailleurs, si globalement les FRNAPH présentent une excellente stabilité dans l'environnement, de nombreux travaux soulignent qu'elle varie d'un génogroupe à l'autre (Brion *et al.*, 2002; Muniesa *et al.*, 2009; Yang & Griffiths, 2013). Ce phénomène conduit alors à la modification de la distribution originale des quatre génogroupes dans les matrices hydriques ou les aliments, en particulier en cas de contamination fécale ancienne. Les FRNAPH-I étant les plus résistants, ils sont de ce fait préférentiellement détectés dans l'environnement et peuvent ainsi masquer la présence minoritaire des FRNAPH d'origine humaine (Cole *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 2016; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006). Enfin, la dernière limite fréquemment associée aux FRNAPH est non des moindres, puisqu'elle concerne

l'absence de corrélation parfois observée entre ces indicateurs et les pathogènes entériques dans le milieu naturel (*e.g.* eaux environnementales, coquillages) (Hodgson *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2017). Dans ce cas de figure, si comme pour les indicateurs bactériens une persistance moindre des FRNAPH comparée à celle des virus entériques peut être évoquée, leur intérêt pour évaluer la qualité microbiologique des coquillages a fortement été remis en cause par la mise en évidence de ligands qui assureraient spécifiquement l'accumulation et la séquestration des norovirus dans les fruits de mer (Le Guyader *et al.*, 2006b; Tian *et al.*, 2006). Il s'agit là en effet d'un argument fort qui serait en défaveur de l'utilisation de n'importe quels indicateurs, quelle que soit leur nature. Cette hypothèse est aujourd'hui appuyée par de nombreuses études qui montrent que globalement, si une meilleure persistance des FRNAPH comparée à celle d'*E. coli* est fréquemment décrite lors de la purification des coquillages, elle reste bien inférieure à celle des norovirus (Doré *et al.*, 2010; Drouaz *et al.*, 2015; Loisy *et al.*, 2005b; Neish, 2013; Pommepuy *et al.*, 2003). Un biais significatif doit cependant être considéré dans l'interprétation de ces résultats, que ce soit concernant la prévalence ou la persistance des FRNAPH dans les coquillages. En effet, dans ce type d'études comparatives, les FRNAPH sont volontiers recherchés dans le milieu naturel ou les coquillages en utilisant des méthodes de culture, tandis que les approches moléculaires constituent actuellement la référence lorsqu'il s'agit de détecter les norovirus (International Organization for Standardization, 2017). Or il est aujourd'hui largement admis que le génome d'un virus persiste bien plus longtemps dans l'environnement par rapport au caractère infectieux des particules correspondantes (Choi & Jiang, 2005; Gassilloud *et al.*, 2003; Ogorzaly *et al.*, 2010). Ce phénomène étant observé pour un même virus, il paraît alors extrêmement aléatoire de comparer la persistance de différents microorganismes en ne tenant pas compte de ce biais.

Dans ce contexte, l'objectif du travail présenté ici est de préciser l'intérêt des FRNAPH en tant qu'indicateurs de pollution fécale mais aussi en tant qu'indicateurs de pollution virale dans l'environnement et les coquillages. Pour cela les principales limites décrites dans la littérature ont été explorées afin de les réduire au maximum.

Concernant la discrimination de la pollution fécale, l'étude de la diversité génétique de souches de FRNAPH isolées chez l'Homme et chez l'animal a été entreprise pour tenter d'améliorer cet aspect. Par ailleurs, une comparaison de la persistance des FRNAPH infectieux et de leurs génomes a été effectuée pour vérifier si la recherche de génomes pourrait permettre de limiter le biais lié à la différence de survie généralement observée pour chacun des génogroupes.

Concernant leur potentiel comme indicateurs de pollution virale, la corrélation entre la présence de FRNAPH et celle des norovirus a été étudiée dans des eaux superficielles et des coquillages en utilisant des approches moléculaires pour la détection des deux types de virus. Le comportement des FRNAPH et celui des norovirus a également été étudié lors de la purification des coquillages. Enfin, la recherche des FRNAPH à la fois par culture et par biologie moléculaire a permis de mieux documenter le devenir des particules virales lors de ces procédés classiquement appliqués aux coquillages avant leur commercialisation.

Globalement et le cas échéant, la mise au point d'une méthode de détection sensible permettant la détection spécifique des génogroupes de FRNAPH infectieux les plus intéressants dans des matrices complexes comme les aliments a été entreprise, afin d'identifier notamment les contaminations fécales d'origine humaine et de préciser le danger viral.

Ce mémoire s'articule en six parties. Tout d'abord, une étude bibliographique s'intéressera au danger lié à la présence des virus entériques pathogènes dans l'environnement et les aliments, aux limites que présentent les indicateurs bactériens classiquement utilisés et aux connaissances actuelles concernant la recherche des FRNAPH en tant qu'indicateurs viraux dans le milieu naturel et les coquillages. Les quatre parties suivantes concerneront les différents résultats obtenus, exposés pour la plupart sous forme d'articles scientifiques. Enfin, l'ensemble de ces résultats sera discuté dans une dernière partie et les perspectives de ces travaux seront alors envisagées.

1ère PARTIE

Etude bibliographique

I. DANGER LIE A LA PRESENCE DE VIRUS ENTERIQUES PATHOGENES DANS LES MATRICES HYDRIQUES ET ALIMENTAIRES

L'eau est une ressource particulièrement impliquée dans la transmission des microorganismes pathogènes. On estime en effet que chaque année, les maladies hydriques seraient responsables de 2 à 3 millions de décès à travers le monde (WHO & OECD, 2003; Wilkes *et al.*, 2009).

Les pathogènes transmis par l'eau sont de nature extrêmement variée. Il s'agit principalement de bactéries, de protozoaires ou de virus, dont la plupart ont une origine fécale **(Tableau I)**. Les pathologies qui leur sont associées sont fréquemment caractérisées par des symptômes digestifs et les maladies diarrhéiques seraient responsables à elles seules de 6 % des décès à l'échelle mondiale, dont près de 90 % seraient directement attribués à la consommation d'eaux insalubres ou aux mauvaises conditions d'hygiène associées (WHO, 2004).

Les virus entériques tiennent aujourd'hui une place majeure dans la survenue des pathologies liées au péril fécal (Bosch, 1998; Clark & McKendrick, 2004; Vantarakis & Papapetropoulou, 1999) et de ce fait, un intérêt accru leur est porté depuis plusieurs décennies (WHO, 1979). Ces microorganismes, dont la plupart sont strictement humains, sont en effet excrétés par les individus infectés à des concentrations pouvant atteindre 10^4 à 10^{11} particules virales/g de selles et cela pendant plusieurs jours après la disparition des symptômes (AFSSA, 2007; Atmar *et al.*, 2008; Fiore, 2004; Fong & Lipp, 2005; Hellmer *et al.*, 2014; Hodgson *et al.*, 2017; Schwartzbrod, 2000). Etant particulièrement résistants, ces virus sont largement retrouvés dans les eaux usées et une fois répandus dans le milieu naturel, ils sont alors considérés comme de véritables polluants environnementaux qui peuvent affecter la santé des individus exposés (Bosch, 1998).

En dépit des nombreux cas asymptomatiques empêchant d'estimer avec précision l'exposition des populations, les virus entériques présentent un pouvoir pathogène extrêmement élevé puisqu'une très faible quantité de particules est suffisante pour infecter un individu. Bien que les symptômes dépendent de nombreux facteurs incluant à la fois l'âge du patient, son statut immunitaire, mais également la souche du microorganisme en question ainsi que sa virulence, on estime qu'à exposition similaire, le danger lié à la présence de virus entériques dans les matrices hydriques serait 10 à 10 000 fois supérieur au danger bactérien (Haas *et al.*, 1993).

Tableau I : Principaux microorganismes pathogènes pour l'Homme susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique, adapté de Ashbolt, 2015, 2004.

Microorganismes	Pathologies	Réservoirs et sources de contamination
Bactéries		
Salmonella typhi	Fièvre typhoïde	Fèces humaines
Salmonella paratyphi	Fièvre paratyphoïde	Fèces humaines
Autres salmonelles	Salmonellose	Fèces humaines et animales
Shigella spp.	Dysenterie bacillaire	Fèces humaines
Vibrio cholerae	Choléra	Fèces humaines
E. coli enteropathogènes	Gastro-entérites	Fèces humaines et animales
Yersinia enterocolitica	Gastro-entérites	Fèces humaines et animales
Campylobacter jejuni	Gastro-entérites	Fèces humaines et animales
Legionella pneumophila	Atteinte pulmonaire (Légionellose)	Eaux chaudes
Leptospira spp.	Leptospirose	Urines humaines et animales
Mycobactéries	Atteinte pulmonaire	Eaux et sols
Bactéries opportunistes	Pathologies variables	Eaux
Virus		
Entérovirus		
Poliovirus	Poliomyélite	Fèces humaines
Coxsackievirus A et B	Méningites aseptiques	Fèces humaines
Echovirus	Méningites aseptiques	Fèces humaines
Autres entérovirus	Encéphalites	Fèces humaines
Rotavirus	Gastro-entérites	Fèces humaines
Adénovirus	Gastro-entérites, pathologies respiratoires	Fèces humaines
Virus de l'hépatite A	Hépatite	Fèces humaines
Virus de l'hépatite E	Hépatite	Fèces humaines et animales
Norovirus	Gastro-entérites	Fèces humaines
Sapovirus	Gastro-entérites	Fèces humaines
Astrovirus	Gastro-entérites	Fèces humaines
Protozoaires		
Acanthamoeba castellani	Méningoencéphalite amibienne	Fèces humaines
Balantidium coli	Balantidiase (Dysenterie)	Fèces humaines et animales
Cryptosporidium hominis, C. parvum	Cryptosporidiose (Gastro-entérites)	Fèces humaines et animales
Entamoeba histolytica	Dysenterie amibienne	Fèces humaines et animales
Giardia lamblia	Giardiose (Gastro-entérites)	Fèces humaines et animales
Naegleria fowleri	Méningoencéphalite	Eaux chaudes

I.1 Principaux virus en cause

Alors que le milieu du XXème siècle fut marqué par l'explosion des épidémies de poliomyélites transmises par voie hydrique, la discipline scientifique qui consiste à étudier le devenir des virus entériques dans l'environnement a vu son essor à la suite d'une épidémie d'hépatite survenue à New Delhi entre décembre 1955 et janvier 1956 (Bosch, 1998). Cette épidémie qui toucha près de 30 000 individus eu pour origine la pollution d'une rivière et

d'une station de potabilisation par des eaux usées à la suite d'intempéries (Dennis & Wolman, 1959). Il s'agit là de la première épidémie d'hépatite E documentée (Kumar *et al.*, 2013), et à cette époque, l'absence de cas de typhoïde ou de dysenterie dans la population exposée laissait supposer que le traitement de potabilisation appliqué aux eaux du réseau de distribution était suffisant pour limiter la charge bactérienne mais qu'il n'assurait pas une inactivation efficace des virus (Dennis & Wolman, 1959). Aujourd'hui encore, alors que les procédés de potabilisation semblent de plus en plus performants (Springthorpe & Sattar, 2007), une part importante des traitements appliqués aux eaux usées avant leur rejet dans l'environnement ont pour seuls objectifs de limiter le relargage des matières en suspension, des matières organiques et des composés azotés et phosphorés. Ces traitements n'assurent donc en aucun cas l'inactivation totale des pathogènes entériques et aucun paramètre microbiologique n'est actuellement défini dans les normes de rejet.

Les virus retrouvés dans les eaux usées sont classiquement regroupés en trois catégories : on distingue les agents responsables de gastro-entérites (*e.g.* norovirus, rotavirus, reovirus, adénovirus 40 et 41, astrovirus, sapovirus), les entérovirus à l'origine de pathologies variées (*e.g.* poliovirus, coxackievirus, echovirus) et les virus responsables d'hépatites (*i.e.* virus de l'hépatite A et E). D'un point de vue structurale, tous ces pathogènes sont des virus nus, c'est-à-dire dépourvus d'enveloppe lipidique, ce qui leur confère une résistance particulière dans le milieu naturel. A l'exception des adénovirus, des rotavirus et des reovirus, ils sont également tous caractérisés par une petite taille (*i.e.* < 35 nm) et possèdent un génome composé d'un ARN simple brin **(Tableau II et Figure 1)**. La quantité et la diversité des virus présents dans les eaux usées brutes dépendent de nombreux facteurs géographiques, socio-économiques, sanitaires et saisonniers (Eftim *et al.*, 2017; Schwartzbrod, 2000). Dans les eaux traitées, leur concentration est également fonction du type de traitement appliqué aux effluents bruts. Après un traitement biologique, les concentrations en virus entériques dans les rejets de station d'épuration sont généralement de l'ordre de 0 à 10^2 particules virales/L (Gerba, 2007; Ottoson *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2015; Rajko-Nenow *et al.*, 2012). Dans ces conditions, la quantité de virus rejetée dans l'environnement est loin d'être négligeable puisque pour une agglomération de 300 000 habitants, elle correspond au relargage de plus de 10^9 virus entériques chaque jour (Schwartzbrod, 2000). En parallèle de cette pollution basale, certaines situations plus exceptionnelles peuvent conduire à une contamination massive du milieu naturel. Il s'agit principalement des rejets d'eaux usées brutes qui peuvent survenir en cas de dysfonctionnements du système d'épuration ou également observés en cas de dépassement des capacités des stations d'épuration lors d'évènements pluvieux importants (Campos & Lees, 2014; Hassard *et al.*, 2017).

Tableau II : Caractéristiques structurales des principaux virus entériques pathogènes d'après Carter, 2005. sb : simple brin, db : double brin, kb : kilo bases, kpb : kilo paires de bases

Famille	Genre	Nom	Taille (nm)	Structure de la capside	Type de génome	Taille du génome (kb ou kpb)
Picornaviridae	*Enterovirus*	Entérovirus	27-30	Icosaédrique	ARN sb	7-9
	Hepatovirus	Virus de l'hépatite A				
Reoviridae	*Rotavirus*	Rotavirus	70-75	Icosaédrique	ARN db segmenté	19-32
	Reovirus	Reovirus				
Caliciviridae	*Norovirus*	Norovirus	27-34	Icosaédrique	ARN sb	7-8
	Sapovirus	Sapovirus				
Hepeviridae	*Hepevirus*	Virus de l'hépatite E	30-34	Icosaédrique	ARN sb	7
Astroviridae	*Mamastrovirus*	Astrovirus	28	Icosaédrique	ARN sb	6-7
Adenoviridae	*Mastadenovirus*	Adénovirus	80-110	Icosaédrique	ADN db	26-45

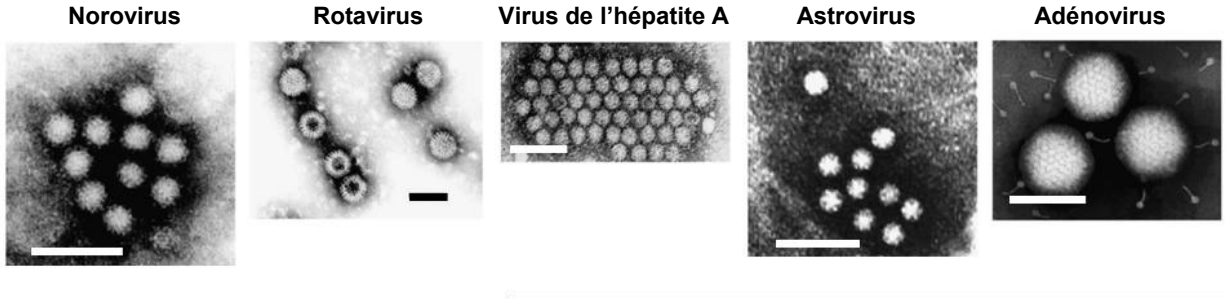

Figure 1 : Observation au microscope électronique de virus entériques pathogènes couramment associés à une transmission hydrique ou alimentaire, adaptée de Koopmans & Duizer, 2004.

Parmi l'ensemble des virus présents dans les eaux usées, certains apparaissent aujourd'hui particulièrement préoccupant compte tenu de leurs incidences en termes de santé publique, de la sévérité des symptômes qui leurs sont associés mais aussi de leur rôle prépondérant dans la survenue de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) (EFSA, 2015; Koopmans *et al.*, 2002; Koopmans & Duizer, 2004; Scallan *et al.*, 2011). Les virus entériques sont en effet une cause très fréquente de maladies alimentaires et ils étaient d'ailleurs en 2014 la principale étiologie connue de l'ensemble des TIAC recensées en Europe (EFSA, 2015). Actuellement, deux types de virus entériques sont identifiés en termes de risque sanitaire ; il s'agit des norovirus et du virus de l'hépatite A (AFSSA, 2007; WHO & FAO, 2008).

I.1.1 Les norovirus

Les norovirus (NoV) sont des virus non enveloppés de forme icosaédrique dont le génome est composé d'un ARN monocaténaire d'environ 7,5 kb (Jiang *et al.*, 1993). Ces particules de diamètre compris entre 27 et 35 nm appartiennent au genre *Norovirus* et à la famille des *Caliciviridae.* Parmi les 6 génogroupes actuellement définis au sein du genre, les génogroupes GI, GII et GIV contiennent chacun des souches ayant un tropisme pour l'Homme (de Graaf *et al.*, 2016).

Les NoV sont à l'heure actuelle l'une des principales causes de gastro-entérites, que ce soit dans les pays en développement ou dans les pays industrialisés (Bartsch *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2009). Le génogroupe GII est à lui seul responsable de près de 90 % des cas recensés dans le monde (Bull *et al.*, 2010; Vega *et al.*, 2014) et plus précisément, les souches appartenant au génotype GII.4 sont particulièrement impliquées dans la survenue d'épidémies (Bull *et al.*, 2010; White, 2014). Ces dernières années, le génotype GII.17 s'est également distingué par sa virulence (Chen *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Matsushima *et al.*, 2015). Initialement rencontré en Asie, ce génotype émergent est depuis peu également détecté en Europe et aux États-Unis (de Graaf *et al.*, 2015; Medici *et al.*, 2015; Parra & Green, 2015).

Comme pour l'ensemble des agents pathogènes responsables de gastro-entérites, la transmission des NoV se fait principalement par la voie féco-orale. Plus rarement, une transmission aérienne a pu être observée, rendue possible par la présence de particules infectieuses dans les vomissures des personnes infectées (Kirking *et al.*, 2010; Marks *et al.*, 2000; Tung-Thompson *et al.*, 2015). La transmission des NoV est largement facilitée par la faible charge pouvant conduire à l'infection d'un nouvel individu, estimée à 18 particules virales (Teunis *et al.*, 2008). Ces pathogènes possèdent par ailleurs des caractéristiques intrinsèques d'échappement à l'immunité collective qui facilite grandement leur propagation au sein des populations (Debbink *et al.*, 2012).

Reconnus comme la principale étiologie des épidémies de gastro-entérites hivernales, les NoV seraient également à l'origine de 20 % des 600 millions de cas de maladies alimentaires estimés annuellement au niveau mondial (Havelaar *et al.*, 2015). Leur implication dans les TIAC est particulièrement perçue aux États-Unis où ils seraient responsables de près de 60 % des cas (Hall *et al.*, 2011; Scallan *et al.*, 2011). En Europe, bien que leur rôle semble moins important en raison d'habitudes alimentaires différentes, les NoV étaient tout de même en 2014 à l'origine de 14 % des maladies alimentaires recensées (EFSA, 2015).

La symptomatologie des gastro-entérites causées par les NoV est caractérisée par l'apparition brutale de vomissements pouvant être associés à des diarrhées. La forte prévalence de nausées et vomissements au cours d'une épidémie de gastro-entérites est d'ailleurs un critère d'orientation ; ces virus étant appelés « *Winter vomiting disease* » dans les pays anglo-saxons en raison de la saisonnalité des épidémies et de cette symptomatologie particulière. Ces symptômes apparaissent généralement après une période d'incubation relativement courte (*i.e.* 12 à 48 heures) et peuvent également être accompagnés de douleurs abdominales, d'une hyperthermie, de myalgies et de céphalées (Lee *et al.*, 2013).

Ces épisodes de gastro-entérites sont généralement peu graves et de courte durée. La rémission complète est généralement observée après 48 à 72 heures chez les individus immunocompétents (Rockx *et al.*, 2002) mais des formes cliniques plus graves peuvent cependant se manifester avec un risque de déshydratation en particulier chez les nourrissons et les personnes âgées (Murata *et al.*, 2007; Schwartz *et al.*, 2011).

Si de manière générale les NoV sont donc à l'origine d'une pathologie plutôt bénigne, ils représentent néanmoins un fardeau économique important à l'échelle d'une société (Bartsch *et al.*, 2016; Havelaar *et al.*, 2015). Aux États-Unis, on évalue par exemple le coût annuel lié à la prise en charge des maladies alimentaires associées aux NoV à près de 1,8 milliard d'euros (Hoffmann *et al.*, 2012). Ce calcul tient compte aussi bien de la prise en charge médicale des patients que de la baisse de productivité liée aux incapacités de travail. Si l'on considère cette fois la totalité des cas de gastro-entérites causées par les NoV, ce coût est évalué à plus de 20 milliards d'euros (Bartsch *et al.*, 2016). En Europe, il est estimé à environ 8 milliards d'euros par an.

I.1.2 Le virus de l'hépatite A

Le virus de l'hépatite A (VHA) est un virus nu icosaédrique de diamètre compris entre 27 et 30 nm, dont le génome est composé d'un ARN monocaténaire d'environ 7,5 kb. Il appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Hepatovirus*. Six génotypes sont actuellement décrits, dont trois capables d'infecter l'Homme (Costa-Mattioli *et al.*, 2002).

Tout comme les NoV, le VHA se transmet par la voie féco-orale, ce qui signifie qu'en plus de la propagation directe du virus de personne à personne, une transmission via les eaux ou les denrées alimentaires souillées peut être observée (Bellou *et al.*, 2013; Boxman *et al.*, 2016; Conaty *et al.*, 2000; Gossner & Severi, 2014; Severi *et al.*, 2015). Ce virus est

également caractérisé par une dose infectieuse relativement faible, de l'ordre de 10 à 100 particules virales (Yezli & Otter, 2011).

La prévalence du VHA est très importante dans certaines régions du monde puisqu'elle est directement liée aux conditions sanitaires précaires (Jacobsen & Wiersma, 2010). Endémique des pays en développement, la pathologie y est généralement contractée pendant la petite enfance et dans ce cas, elle est le plus souvent asymptomatique et conférera aux individus une immunité acquise vis-à-vis du pathogène. A l'inverse, compte tenu des standards d'hygiène élevés dans les pays industrialisés, l'exposition au virus durant l'enfance est de plus en plus rare et des primo-infections de l'adulte sont parfois observées, associées à une symptomatologie plus ou moins sévère.

L'infection par le VHA est marquée par une période d'incubation entre la contamination et l'apparition des premiers symptômes relativement longue, puisqu'elle peut s'étendre de 10 jours à 8 semaines. On observe ensuite les signes cliniques classiques d'une hépatite, avec une première phase prodromique peu spécifique, associant asthénie, anorexie, et nausées pendant 1 à 3 semaines, suivie d'un ictère avec hépatosplénomégalie pendant une période de 10 à 15 jours (Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016). Après l'infection, un syndrome pseudo-grippal peut persister plusieurs semaines mais on n'observe jamais d'évolution vers la chronicité. La sévérité de la pathologie augmente considérablement avec l'âge et la complication la plus redoutée est l'hépatite fulminante, observée chez près de 2 % des patients âgés de plus de 50 ans. De pronostic sévère, elle nécessite dans la plupart des cas une transplantation hépatique.

En France, l'hépatite A fait partie des maladies à déclaration obligatoire. Abandonnée en 1984, la déclaration des cas est à nouveau d'actualité depuis 2006 en raison de la recrudescence de la pathologie et de sa gravité potentielle chez l'adulte (Ministère de la santé et des solidarités, 2005). Durant la première année de surveillance par la déclaration obligatoire, 1 313 cas d'hépatite A ont été notifiés (Couturier *et al.*, 2007) tandis qu'en 2015, 743 cas ont été répertoriés.

I.2 Matrices en cause

L'Homme est exposé aux virus entériques par différentes voies. Si ces pathogènes se propagent aisément de manière directe, c'est-à-dire de personne à personne, l'environnement joue également un rôle non négligeable dans le cycle du péril fécal **(Figure 2)**. En plus des matrices hydriques directement impactées par la pollution fécale en cas de rejets d'eaux usées, le rôle prépondérant que tient certains aliments dans la

propagation des pathogènes entériques est aujourd'hui bien documenté, en particulier dans le cas des virus (Bitler *et al.*, 2013; Koopmans *et al.*, 2002; Koopmans & Duizer, 2004; Lees, 2000).

Parmi eux, les coquillages et les produits maraîchers sont deux catégories d'aliments souvent associées à la survenue des maladies alimentaires d'origine virale, impliquant majoritairement les NoV et le VHA (Cliver *et al.*, 1983; Duizer & Koopmans, 2013; Fiore, 2004; Mathijs *et al.*, 2012).

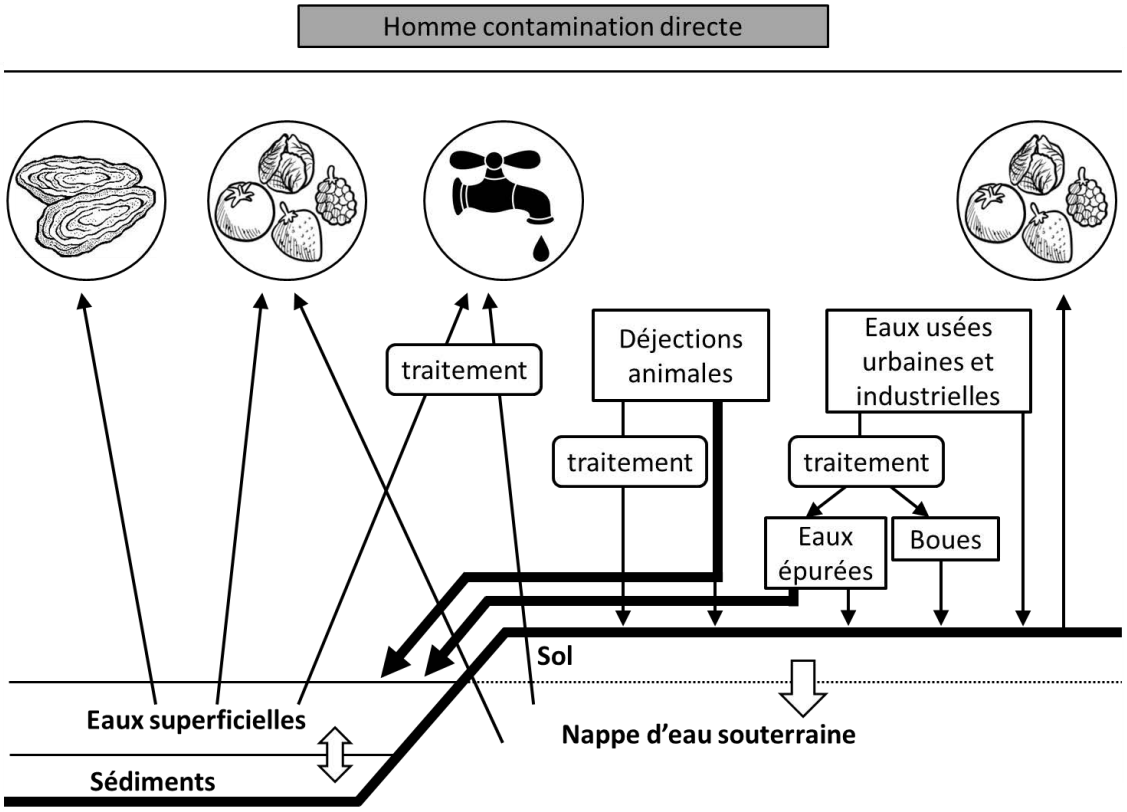

Figure 2 : Schéma conceptuel d'exposition aux virus entériques *via* les aliments, d'après l'AFSSA, 2007.

I.2.1 Les coquillages

Le lien entre les maladies alimentaires et la consommation de coquillages est établi depuis plus d'un siècle (Richards, 1988). Les bivalves filtreurs qui regroupent entre autres les moules, les huîtres, les palourdes et les coques sont en effet des aliments particulièrement exposés à la contamination fécale du milieu naturel, puisqu'ils sont capables

par la filtration de grands volumes d'eau d'accumuler au niveau de leurs organes digestifs les microorganismes pathogènes qui y sont présents (Atmar *et al.*, 1996; Burkhardt & Calci, 2000; Schwab *et al.*, 1998). Il n'est donc pas étonnant que les coquillages figurent parmi les produits de la mer les plus souvent à l'origine de maladies digestives. Parmi eux, les huîtres sont particulièrement associées à ces pathologies puisqu'elles sont généralement consommées crues.

La contamination des coquillages a généralement lieu dans la zone conchylicole. Ces zones situées en bord de côtes peuvent en effet être soumises à une pollution fécale significative, en particulier en cas de rejet d'eaux usées brutes par les stations d'épuration avoisinantes (Campos *et al.*, 2015; Hassard *et al.*, 2017; Huppatz *et al.*, 2008). D'autres évènements plus anecdotiques sont parfois rapportés, comme par exemple la vidange des eaux usées de bateaux à proximité des zones d'élevage (Berg *et al.*, 2000; Campos & Lees, 2014; Kohn *et al.*, 1995).

La littérature regorge de description d'épidémies de gastro-entérites causées par les NoV ou le VHA en lien avec la consommation de coquillages **(Tableau III)**. Une récente méta-analyse révèle en effet qu'entre 1980 et 2012, ces virus étaient respectivement à l'origine de 83,7 % et de 12,8 % des TIAC en lien avec les coquillages (Bellou *et al.*, 2013). La TIAC la plus importante jamais attribuée au VHA est d'ailleurs liée à la consommation de palourdes crues (Halliday *et al.*, 1991). Cet épisode a été responsable de la contamination de près de 300 000 individus à Shanghai en 1988, et 25 000 cas de gastro-entérites probablement provoquées par les NoV y ont été associés. Concernant les NoV, le génogroupe GII est fréquemment à l'origine de ces TIAC mais la forte prévalence du génotype GII.4 observée dans les épidémies hivernales n'est pas aussi marquée (Hassard *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2015). Notons enfin que le génotype GII.17 émergent a également pu être récemment détecté dans des coquillages (La Rosa *et al.*, 2017; Pu *et al.*, 2016).

En plus des NoV et du VHA, de nombreux autres virus pathogènes sont régulièrement détectés dans les coquillages (*i.e* rotavirus, astrovirus, entérovirus, adénovirus) (Formiga-Cruz *et al.*, 2002; Le Guyader *et al.*, 2000; Lees, 2000). Ces virus semblent cependant présenter un risque sanitaire mineur puisque peu d'épidémies alimentaires les mettant en cause sont actuellement rapportées. Ce phénomène résulterait probablement de la moindre susceptibilité des individus, d'une dose infectieuse plus importante et de symptômes associés moins marqués (Le Guyader & Atmar, 2007).

Tableau III : Exemple d'épidémies associées à la consommation de coquillages contaminés par des virus entériques.

Type de fruit de mer	Pays	Nombre de cas	Virus	Référence
Huîtres	Australie	467	VHA	(Conaty *et al.*, 2000)
Huîtres	Australie	83	NoV	(Webby *et al.*, 2007)
Huîtres	Canada	26	NoV	(David *et al.*, 2007)
Huîtres	Canada	36	NoV	(McIntyre *et al.*, 2012)
Huîtres	États-Unis	171	NoV	(Shieh *et al.*, 2000)
Palourdes	États-Unis	5	NoV	(Kingsley *et al.*, 2002)
Huîtres	États-Unis	39	VHA	(Shieh *et al.*, 2007)
Palourdes	Espagne	183	VHA	(Sánchez *et al.*, 2002)
Huîtres	France	14	NoV	(Le Guyader *et al.*, 2003)
Huîtres	France - Italie	327	NoV	(Le Guyader *et al.*, 2006a)
Huîtres	France	37	NoV	(Le Guyader *et al.*, 2008)
Huîtres	France	23	NoV	(Le Guyader *et al.*, 2010)
Huîtres	Irlande	70	NoV	(Doré *et al.*, 2010)
Moules	Italie	103	NoV	(Prato *et al.*, 2004)
Huîtres	Royaume-Uni	15	NoV	(Gallimore *et al.*, 2005)
Huîtres	Royaume-Uni	11	NoV	(Baker *et al.*, 2011)
Huîtres	Royaume-Uni	287	NoV	(Lowther *et al.*, 2012a)
Huîtres	Singapour	305	NoV	(Ng *et al.*, 2005)
Huîtres	Suède	30	NoV	(Nenonen *et al.*, 2009)

I.2.2 Les produits maraîchers

Les fruits et légumes tiennent aujourd'hui une place importante dans le marché de l'import-export, ce qui conduit parfois à la consommation de produits dont le mode de culture déroge aux exigences imposées dans les pays industrialisés. Il apparaît en effet que dans de nombreux pays, l'amendement des sols avec des engrais organiques et l'utilisation d'eaux souillées pour l'irrigation des cultures ou le lavage des légumes sont encore des pratiques courantes qui peuvent alors conduire à la contamination des végétaux par des pathogènes entériques. La contamination des produits lors de leur manutention par du personnel malade excrétant des virus est également souvent évoquée, en l'absence des mesures d'hygiène appropriées (D'Souza *et al.*, 2006; Rönnqvist *et al.*, 2014).

Certains végétaux ont donc un rôle particulièrement documenté dans la transmission des NoV et du VHA. Là encore, il s'agit principalement des aliments consommés crus ou peu cuits comme les salades vertes (Ethelberg *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2016; Oogane *et al.*,

2008) ou encore les fruits rouges, en particulier lorsque ceux-ci sont conservés par surgélation (Einöder-Moreno *et al.*, 2016; Le Guyader *et al.*, 2004; Maunula *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 2015; Severi *et al.*, 2015).

Les épidémies liées aux produits maraîchers sont souvent de grande ampleur. En 2003, une épidémie d'hépatite A en lien avec la consommation d'oignons verts a par exemple touché 700 clients d'un restaurant aux États-Unis et fut la cause de trois décès (Fiore, 2004). En 2010, des tomates séchées originaires de Turquie ont été la cause de 59 cas d'hépatite A déclarés en France (Gallot *et al.*, 2011). En 2012, des fraises surgelées en provenance de Chine ont été à l'origine de la plus grande épidémie alimentaire jamais décrite en Allemagne, touchant près de 11 000 individus. Les analyses microbiologiques ont révélé dans ce cas la présence de NoV dans les fruits incriminés (Bernard *et al.*, 2014). En 2013, une épidémie d'hépatite A causée par des grenades surgelées importées de Turquie a touché 165 individus aux États-Unis (Collier *et al.*, 2014). Enfin, en décembre 2016 et toujours aux États-Unis, des framboises en provenance d'Égypte utilisées pour la préparation de smoothies ont provoqué 134 cas d'hépatite A dans 9 États différents.

I.2.3 L'eau

Si la pollution des eaux environnementales est souvent à l'origine de la présence des virus entériques à la surface des aliments, cette ressource est parfois directement impliquée dans la contamination des individus.

Des épidémies ont par exemple été décrites suite à la consommation d'eaux de boissons provenant de puits (Parshionikar *et al.*, 2003), de fontaines (Hoebe *et al.*, 2004), du réseau urbain (Carrique-Mas *et al.*, 2003; Gallay *et al.*, 2006; Kaplan *et al.*, 1982) ou encore de glaçons contaminés par les NoV (Khan *et al.*, 1994) et il en est de même pour le VHA (Fiore, 2004). Les eaux conditionnées peuvent également être à l'origine d'épidémies, comme ce fut notamment le cas en 2016 dans la région de Barcelone, où plus de 4 000 cas de gastro-entérites en lien avec la consommation d'eaux embouteillées contaminées par des NoV ont été déclarés (Blanco *et al.*, 2017).

I.2.4 Contamination par la manutention

Alors que l'eau, les coquillages et les produits maraîchers sont trois matrices fréquemment incriminées dans la transmission des pathogènes d'origine fécale à l'Homme, il apparaît en définitive que toutes les denrées alimentaires manipulées par du personnel

infecté, que ce soit durant leur transport, leur transformation ou leur distribution, sont susceptibles d'être impliquées dans ce genre de TIAC.

Aux États-Unis, les maladies alimentaires sont de ce fait fréquemment associées à la consommation de plats nécessitant de nombreuses étapes de manipulation. Les aliments crus sont évidemment préférentiellement incriminés (Rönnqvist *et al.*, 2014; Widdowson *et al.*, 2005) et la contamination par les employés est souvent identifiée (CDC, 2011).

De manière non exhaustive, des sandwiches (Daniels *et al.*, 2000; Fiore, 2004; Zomer *et al.*, 2010), des pains (de Wit *et al.*, 2007) de la charcuterie ou des viandes (Malek *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2017) et des pâtisseries (Friedman *et al.*, 2005) ont déjà été à l'origine de TIAC causées par les NoV ou le VHA.

I.3 Facteurs favorisant

I.3.1 Persistance des virus entériques dans l'environnement

L'une des interrogations à laquelle tente de répondre les études de virologie environnementale est de savoir dans quelle mesure les virus entériques sont capables de survivre aux conditions environnementales mais également aux différents traitements physico-chimiques appliqués aux eaux ou aux aliments.

Contrairement aux bactéries, les virus ne possèdent pas de métabolisme intermédiaire ; ils ne sont donc pas capables de se multiplier en l'absence de leurs cellules hôtes. De ce fait, une fois libérés dans l'environnement, les virus sont uniquement soumis à un phénomène d'inactivation plus ou moins rapide.

Différents facteurs limitent la persistance des virus dans le milieu naturel **(Tableau IV)**. Il s'agit aussi bien de paramètres physiques (*e.g.* température, humidité, rayonnements UV), chimiques (*e.g.* pH, salinité, présence d'enzymes ou de matières organiques) ou microbiologiques (*e.g.* activité microbienne, prédation par des protozoaires). A l'inverse, d'autres facteurs contribuent largement à maintenir le caractère infectieux des virus, comme par exemple l'agrégation des particules virales entre elles ou encore leur adsorption aux matières en suspension (Gerba & Betancourt, 2017).

Tableau IV : Paramètres influençant la survie des virus dans l'environnement, d'après Gerba, 2007.

Facteurs environnementaux	Contribution
Température	Facteur le plus important, une meilleure survie des virus est observée à basse température
Rayonnements UV	Les UV provoquent des lésions au niveau du génome
pH	La plupart des virus sont stables aux pH des eaux environnementales (*i.e.* pH compris entre 5 et 9)
Salinité	La présence de certains ions améliore la survie des virus en favorisant leur agrégation
Matières organiques et matières en suspension	L'adsorption des virus à la surface de matières en suspension augmente leur survie
Prédation	La microflore aquatique limite la survie des virus

Les virus fréquemment à l'origine de TIAC sont globalement tous caractérisés par une excellente stabilité dans l'environnement. Il est cependant difficile, dans le cas des NoV ou du VHA d'estimer de manière précise la persistance des particules virales dans ces conditions. Ces derniers sont en effet difficilement cultivables à l'heure actuelle et nécessitent le recours à des méthodes lourdes, contraignantes (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014) et qui de plus demandent encore à être validées dans le cas des NoV humains (Duizer *et al.*, 2004; Herbst-Kralovetz *et al.*, 2013; Straub *et al.*, 2013, 2011; Takanashi *et al.*, 2014).

Ainsi, la plupart des connaissances actuelles concernant la stabilité et la persistance des NoV ou du VHA résultent d'essais effectués sur des modèles. Concernant le VHA, la souche cultivable HM-175 est fréquemment utilisée (Grove *et al.*, 2008; Jean *et al.*, 2011; Kotwal & Cannon, 2014), tandis que le calicivirus félins (FCV) et les NoV murins (MNV) sont fréquemment employés comme substituts cultivables des NoV humains (Cromeans *et al.*, 2014). Le recours à de tels modèles a fourni des connaissances qui restent cependant limitées puisqu'elles semblent difficilement transposables aux souches d'intérêt.

A titre d'exemple, alors que l'étude du FCV et du MNV est justifiée par le fait que ces deux virus appartiennent respectivement à la même famille (*i.e. Caliciviridae*) et au même genre que les NoV capables d'infecter l'Homme, des différences notables sont observées concernant la stabilité de ces deux modèles (Cromeans *et al.*, 2014). Après 30 minutes d'incubation à 37°C et à pH 2, on observe par exemple une perte du caractère infectieux du FCV de 5 unités logarithmiques tandis que dans les mêmes conditions, une perte de moins

d'une unité logarithmique est notée dans le cas du MNV (Cannon *et al.*, 2006; Duizer *et al.*, 2004).

Afin de s'affranchir de l'utilisation de modèles, d'autres études tentent d'évaluer indirectement la persistance des virus en s'intéressant à la stabilité de leur génome. Il s'avère par exemple que les génomes de NoV sont capables de persister plus de 700 jours dans des eaux à 12°C (Charles *et al.*, 2009). Là encore, ces résultats semblent peu prédictibles de la persistance du caractère infectieux des particules virales et tendent généralement à la surestimer. Il est en effet largement admis aujourd'hui que la persistance des génomes viraux est considérablement supérieure à celle des particules infectieuses correspondantes (Choi & Jiang, 2005; Gassilloud *et al.*, 2003; Ogorzaly *et al.*, 2010).

De manière plus formelle, Seitz *et al.* (2011) se sont intéressés à l'inactivation des NoV humains en s'affranchissant des biais liés aux techniques indirectes ou à l'utilisation de modèles. Des essais d'inoculation du virus Norwalk (*i.e.* génotype GI.1) à des volontaires sains ont ainsi permis de montrer une persistance du caractère infectieux du virus pendant au moins 61 jours lorsque celui-ci est placé dans de l'eau à température ambiante et à l'obscurité. Dans cette même étude, les génomes viraux ont quant à eux pu être détectés dans la matrice pendant plus de 3 ans, sans décroissance significative de leur concentration pendant les 427 premiers jours.

Malgré le manque d'information concernant la stabilité de ces pathogènes, un récent bilan des connaissances relatives à la persistance des virus entériques dans les aliments souligne que ces derniers sont capables de se maintenir à la surface des fruits rouges, des salades ou encore dans les coquillages pendant une période excédant largement la durée de conservation des produits (Cook *et al.*, 2016, 2015). Il apparaît également qu'en cas de congélation, ces virus sont capables de persister plusieurs mois sous forme infectieuse à la surface de différents aliments (*e.g.* fraises, framboises, persils, basilic, oignons, feuilles d'épinard) (Baert *et al.*, 2008; Butot *et al.*, 2008).

I.3.2 Interaction avec les denrées alimentaires

Comme évoqué précédemment, la présence de pathogènes entériques à la surface de certains végétaux ou dans les coquillages est facilement explicable par leur mode de culture et de production qui permet potentiellement un contact avec des eaux souillées. D'autres facteurs doivent cependant être considérés. En effet, si on s'intéresse par exemple aux coquillages, il apparaît que l'accumulation des microorganismes est largement majorée lorsqu'il s'agit de virus (Di Girolamo *et al.*, 1977).

Dans le cas précis des NoV, plusieurs études ont mis en évidence dans les huîtres la présence de carbohydrates servant de ligands à ces pathogènes (Le Guyader *et al.*, 2006b; Ma *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2007, 2006). Ces ligands baptisés « HBGA-like » par homologie avec les récepteurs viraux présents dans le corps humain (*i.e. Histo-Blood Group Antigens*) seraient donc à l'origine de l'accumulation spécifique des NoV dans les coquillages.

L'expression de ces ligands dans les coquillages est variable selon la saison et comme ce qui est observé dans le corps humain, leur affinité avec les NoV est différente selon le génogroupe considéré, avec une accumulation qui semble plus marquée pour le génotype I.1 (Maalouf *et al.*, 2011, 2010). Ce type de ligand a également pu être mis en évidence à la surface de certains végétaux comme les laitues (Esseili *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2016) et leur présence expliquerait en partie la difficulté d'y éliminer les NoV même en cas de lavage mécanique (Cook *et al.*, 2016). Notons que de la même manière, certains carbohydrates présentant une affinité particulière pour le VHA sont également décrits dans les coquillages (Ko *et al.*, 2011).

Enfin, il est important de souligner qu'en dépit du rôle de ces ligands particuliers qui favoriseraient l'accumulation de certains pathogènes, d'autres interactions non spécifiques sont elles aussi largement impliquées dans l'adhésion des microorganismes aux matrices alimentaires (Berger *et al.*, 2010; DiCaprio *et al.*, 2015).

II. EVALUATION DE LA CONTAMINATION FECALE DES MATRICES HYDRIQUES ET ALIMENTAIRES

II.1 Contexte réglementaire actuel : les indicateurs bactériens de pollution fécale

L'utilisation de certains microorganismes indicateurs pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau est établie depuis plus d'un siècle (Ashbolt *et al.*, 2001). En effet, la recherche de tous les pathogènes susceptibles de contaminer les matrices hydriques ou les aliments étant non réalisable en routine car trop coûteuse, laborieuse et limitée par de nombreuses difficultés techniques, l'utilisation de tels indicateurs est essentielle pour gérer le danger associé à la pollution fécale. La présence dans l'environnement de microorganismes originaires du tractus digestif étant le témoignage d'une contamination par des matières fécales, elle est potentiellement associée à la présence de pathogènes entériques.

Parmi l'ensemble des microorganismes composant la flore intestinale, *Escherichia coli* est aujourd'hui considéré d'après l'OMS comme l'indicateur le plus précis pour estimer la pollution fécale de l'environnement (Lin & Ganesh, 2013; Tallon *et al.*, 2005). Sa recherche est inclue dans différentes réglementations, qu'il s'agisse des critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires définis par le Règlement (CE) n° 2073/2005 (Parlement Européen, 2005) ou encore de ceux relatifs à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (Commission Européenne, 1998; Ministère de la santé et des solidarités, 2007).

Si l'on s'intéresse plus particulièrement au domaine conchylicole, la qualité microbiologique des coquillages est régit en Europe par le Règlement (CE) 854/2004, précisé depuis le 1er Janvier 2017 par le Règlement (UE) 2015/2285 dans un soucis d'harmonie avec les exigences fixées par le *codex alimentarius* (Commission Européenne, 2015; Parlement Européen, 2004). Cette législation assure la classification des zones conchylicoles professionnelles selon différents niveaux de pollution fécale estimés là aussi par la recherche d'*E. coli* dans les coquillages **(Tableau V)**. Cette classification détermine alors la conduite à tenir avant la commercialisation des produits **(Figure 3)**. Ainsi, si les coquillages élevés et récoltés en zones classées A peuvent directement être mis sur le marché pour la consommation humaine (*i.e.* < 230 *E. coli* / 100 g de chair et liquide intervalvaire [CLI]), ceux récoltés dans les zones classées B ou C doivent subir au préalable un traitement dans le but de diminuer leur niveau de contamination. Il peut s'agir dans ce cas soit d'une purification par immersion en eau propre pendant une période donnée, soit d'un traitement thermique.

Tableau V : Classement sanitaire des zones conchylicoles en Europe.

Classification Européenne	Critère microbiologique (*E. coli* pour 100 g de chair et liquide intervalvaire [CLI])
Zone A	80 % < 230 *E. coli* /100 g CLI Aucun > 700 *E. coli* /100 g CLI
Zone B	90 % < 4 600 *E. coli* /100 g CLI Aucun > 46 000 *E. coli* /100 g CLI
Zone C	100 % < 46 000 *E. coli* /100 g CLI
Zone non classée	> 46 000 *E. coli* /100 g CLI

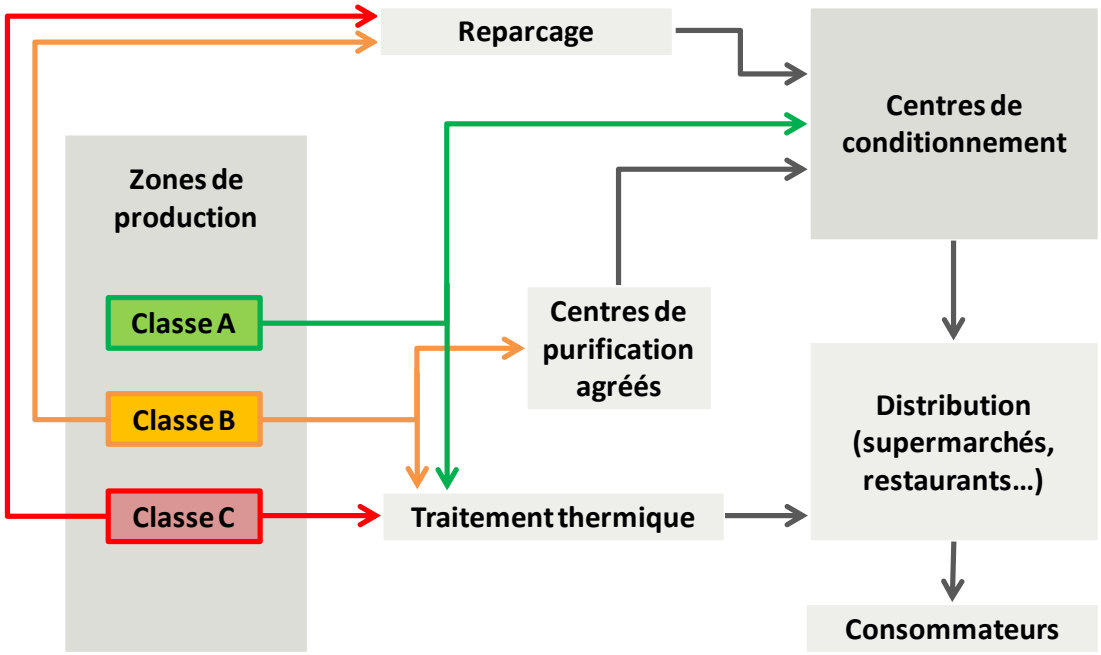

Figure 3 : Conduite à tenir avant la distribution des mollusques bivalves selon leur zone de production, d'après l'EFSA, 2016.

Concernant les coquillages provenant des zones classées B, leur purification est effectuée en centres agréés par immersion dans des bassins alimentés en eau de mer naturellement propre ou ayant subi un traitement approprié (*i.e.* ozone, chlore, rayonnements UV) (FAO, 2010). En France, cette étape de purification est couramment réalisée pendant une période de 48 heures, temps généralement suffisant pour réduire le nombre de bactéries afin d'obtenir des produits conformes à la législation (*i.e.* < 230 *E. coli* /100 g de CLI). Le reparcage des coquillages dans une zone naturelle de qualité satisfaisante est également possible mais cette pratique n'est pas répandue en France, faute de zones suffisamment contrôlées.

Concernant la purification des coquillages provenant des zones classées C, un reparcage d'une durée minimum de deux mois peut être proposé. Cette pratique étant également limitée en France, la cuisson est alors généralement la seule alternative à la commercialisation des produits. Enfin, la commercialisation des coquillages provenant des zones non classées est interdite (*i.e.* > 46 000 *E. coli* /100 g CLI).

En Europe, 40 % des zones conchylicoles commerciales sont classées A, 50 % sont classées B et 5 % sont classées C (EFSA, 2011). Il apparaît donc que la majorité des coquillages doit subir une étape de purification avant leur mise sur le marché.

II.2 Limites des indicateurs bactériens et besoins actuels

Si de manière générale la recherche des indicateurs bactériens de pollution fécale permet une bonne gestion de la qualité microbiologique des ressources et contribue à limiter l'incidence des épidémies bactériennes, deux aspects constituent des limites qui leurs sont fréquemment associées, en particulier lorsqu'il s'agit d'évaluer le danger viral. Il s'agit d'une part de leur incapacité à déterminer l'origine d'une contamination et d'autre part, de leur comportement très différent de celui des virus entériques dans l'environnement.

II.2.1 Les indicateurs bactériens pour déterminer l'origine d'une contamination fécale

Alors que le risque sanitaire lié à la pollution fécale est particulièrement perçu dans les pays en développement, pouvoir déterminer l'origine d'une contamination est une démarche majoritairement entreprise dans les pays industrialisés qui imposent les exigences les plus strictes en matière de surveillance de la qualité microbiologique des eaux.

Pouvoir déterminer la source d'une contamination apparaît aujourd'hui être un paramètre essentiel pour assurer une meilleure gestion du danger microbiologique, puisqu'il permet d'une part de garantir la protection des individus contre les pathogènes zoonotiques transmis en cas de pollution d'origine animale et d'autre part, d'identifier la pollution fécale d'origine humaine souvent jugée plus préoccupante. Il semble en effet que ce type de contamination soit associé à un danger plus important, en raison notamment de la forte spécificité d'hôte de certains pathogènes comme les virus (Cabelli *et al.*, 1982; Soller *et al.*, 2016, 2010).

Concernant les indicateurs conventionnels de pollution fécale, ces derniers étant présents à la fois dans le tractus digestif des animaux et de l'Homme, leur recherche ne permet pas actuellement de déterminer l'origine d'une contamination (Scott *et al.*, 2002; US EPA, 2005; Wicki *et al.*, 2015).

II.2.2 Les indicateurs bactériens pour indiquer la présence des virus entériques pathogènes

En dépit de l'utilisation universelle d'*E. coli* pour prédire la présence de pathogènes d'origine entérique dans l'eau ou les aliments, il est largement admis aujourd'hui que cet indicateur bactérien ne permet pas d'apprécier la présence des pathogènes de nature virale.

Il apparaît en effet que les différences en matière de taille et de structure entre virus entériques et indicateurs bactériens sont à l'origine de comportements très différents dans l'environnement (Leclerc *et al.*, 2000; Payment & Locas, 2011). De nombreuses publications parues ces dernières décennies démontrent par exemple que les virus sont moins sensibles que les bactéries aux différents paramètres physico-chimiques responsables de l'inactivation des microorganismes, que ce soit au cours du traitement des eaux usées ou encore durant leur séjour dans l'environnement (Harwood *et al.*, 2005; Havelaar *et al.*, 1993; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jofre *et al.*, 1995). La moindre résistance de ces indicateurs a ainsi conduit très tôt à observer une absence de corrélation entre ces derniers et les virus entériques dans le milieu naturel (Gerba *et al.*, 1979; Metcalf, 1979; US EPA, 2015).

Dans le cas particulier du domaine conchylicole, d'autres paramètres que la simple différence de stabilité entre indicateurs bactériens et virus doivent être considérés. Il apparaît en effet que des cinétiques très différentes d'accumulation mais également d'élimination lors des procédés de purification appliqués aux coquillages sont observées pour ces microorganismes.

Concernant les NoV, une plus forte accumulation dans les coquillages est par exemple observée durant les mois d'hiver. Ce phénomène s'explique en partie par la surexpression des ligands spécifiques des NoV pendant cette période dans les coquillages (Maalouf *et al.*, 2011, 2010), par la saisonnalité des épidémies à l'origine de la circulation et du relargage massif de ces pathogènes dans l'environnement (Hellmer *et al.*, 2014; Lopman *et al.*, 2004; Mounts *et al.*, 2000), et enfin par les températures plus basses, offrant une meilleure stabilité aux virus dans le milieu naturel. A l'inverse, il semble qu'aucune tendance saisonnière ne soit observée concernant l'accumulation d'*E. coli* dans les coquillages (Doré *et al.*, 1998; Flannery *et al.*, 2012, 2009).

Il apparaît dès lors que la catégorisation des zones conchylicoles effectuée en se basant sur la recherche d'*E. coli* est généralement peu représentative de la pollution de type viral (Flannery *et al.*, 2009; Lowther *et al.*, 2008). L'analyse de 167 lots d'huîtres provenant de 17 zones conchylicoles irlandaises réalisée par Flannery *et al.* (2009) a par exemple montré

que cette classification ne permettait pas de renseigner sur la prévalence et la concentration des NoV dans les coquillages **(Tableau VI).** Dans cette étude, alors que 31 % des coquillages provenant des zones A étaient positifs pour la recherche des NoV, leurs concentrations n'étaient pas significativement différentes de celles mesurées dans les coquillages provenant des zones classées B. De la même manière, aucune différence n'a était observée entre les lots des catégories B et C.

Tableau VI : Prévalence des norovirus dans les coquillages selon leur niveau de pollution estimé par la recherche d'*E. coli*, d'après Flannery *et al.*, 2009.

Catégorie	Nombre d'échantillons	Détection des NoV	
		% Positifs (n)	Concentration (unité de PCR)
A	119	31 (37)	60,7
B	42	54 (23)	120,3
C	6	33 (2)	190,1

Si on s'intéresse cette fois aux procédés de purification régulièrement appliqués aux coquillages, il est généralement admis qu'une période de 48 heures est suffisante pour réduire les concentrations d'*E. coli* afin de retrouver des teneurs acceptables d'un point de vue règlementaire (Doré *et al.*, 2010; Doré & Lees, 1995; Lees, 2000; Muniain-Mujika *et al.*, 2002). A l'inverse, une persistance très longue des NoV dans les coquillages est généralement observée dans ces mêmes conditions, avec des temps nécessaires pour réduire leur concentration d'une unité logarithmique (T_{90}) pouvant atteindre 28 jours (Choi & Kingsley, 2016; Drouaz *et al.*, 2015; Lees, 2000; Schwab *et al.*, 1998). De ce fait, différentes études montrent que la prévalence et les concentrations des NoV sont de manière générale significativement identiques dans les coquillages ayant subi une étape de purification ou non (Formiga-Cruz *et al.*, 2002; Savini *et al.*, 2009).

Dans ce contexte, il est fréquent d'observer des épidémies de gastro-entérites en lien avec la consommation de coquillages qui pourtant répondent à toutes les exigences réglementaires en matière de qualité microbiologique (Chalmers & McMillan, 1995; Doré *et al.*, 2010; EFSA, 2012; Le Guyader *et al.*, 2006a; Lowther *et al.*, 2010).

De la même manière, les limites d'*E. coli* sont décrites lorsqu'il s'agit d'évaluer la qualité microbiologique d'autres types de matrices. Citons par exemple le cas d'une épidémie d'hépatite A survenue dans une base militaire suite à la consommation d'eau (Bosch *et al.*, 1991). En plus du VHA, les analyses microbiologiques ont révélé la présence de rotavirus et d'entérovirus dans cette eau, alors même que les indicateurs bactériens de pollution fécale

étaient absents. Par ailleurs, les analyses chimiques ont révélé que l'eau en question présentait des teneurs en chlore satisfaisantes pour assurer une élimination efficace des bactéries mais vraisemblablement insuffisantes pour garantir l'inactivation des virus.

Rappelons toutefois que la recherche d'*E. coli* demeure une première étape indispensable à la gestion du risque puisque si cet indicateur est présent dans une matrice hydrique ou un aliment, il ne fait alors aucun doute quant au danger microbiologique associé. A l'inverse, l'absence de cet indicateur ne garantit pas l'absence de virus entériques pathogènes.

Face à ces observations, la communauté scientifique s'accorde aujourd'hui à souligner l'incapacité des indicateurs bactériens pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau et des aliments lorsque des virus y sont présents. Cette limite est également perçue au niveau législatif puisque le Règlement (CE) n° 2073/2005 précise par exemple que « les indicateurs fécaux conventionnels ne sont pas fiables pour démontrer la présence ou l'absence de virus de type Norwalk (*i.e.* NoV) et que le recours à l'élimination des indicateurs bactériens fécaux pour déterminer les durées de purification des mollusques constitue une pratique dangereuse ». Le règlement précise alors qu'« il conviendrait en particulier de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants lorsque les méthodes d'analyse seront suffisamment développées » (Parlement Européen, 2005).

II.3 Alternatives pour déterminer l'origine d'une contamination fécale

Face aux limites des indicateurs conventionnels, d'autres approches sont régulièrement proposées pour identifier l'origine d'une contamination fécale. Les premiers travaux de ce type ont été initiés par Geldreich à la fin des années 1960. A cette époque, on propose alors de mesurer le ratio coliformes fécaux/streptocoques fécaux dans les eaux afin de différencier les contaminations d'origine humaine de celles d'origine animale. Il semblait en effet qu'un ratio élevé (*i.e.* >4) était synonyme d'une pollution humaine tandis qu'un ratio plus faible (*i.e.* < 0,7) était plutôt observé dans les eaux polluées par l'animal (Geldreich & Litsky, 1976). Peu concluante, notamment à cause de la survie différente de ces microorganismes dans l'environnement (Edwards *et al.*, 1997), cette approche n'est aujourd'hui plus recommandée (US EPA, 2005). Elle fut néanmoins à l'origine d'un panel d'autres stratégies qui ont vu leur essor dans les années 1980 et qui sont actuellement regroupées sous la terminologie « *Microbial Source Tracking* ».

Ces approches microbiologiques ont pour objectif d'identifier et dans certains cas de quantifier la pollution fécale des matrices hydriques par la recherche de certains

microorganismes ou de leurs caractéristiques préférentiellement associées à un type d'hôte. Elles sont distinguées des approches chimiques qui consistent à rechercher dans l'environnement certaines molécules associées à l'Homme, telles que la caféine, certains stérols, les agents blanchissants, les parfums ou encore certains médicaments (Field & Samadpour, 2007; Harrault *et al.*, 2014; Linden *et al.*, 2015; Sidhu *et al.*, 2013; US EPA, 2005). Parmi les méthodes microbiologiques, on oppose classiquement les techniques requérant la création d'une base de données de référence (*i.e.* bibliothèque-dépendantes) à celles qui n'en nécessitent pas (*i.e.* bibliothèque-indépendantes) **(Tableau VII)**.

II.3.1 Méthodes bibliothèque-dépendantes

Les méthodes bibliothèque-dépendantes reposent sur la construction de banques de données de référence, réalisées à partir de bactéries isolées de matrices dont l'origine de la pollution fécale est connue. Les caractéristiques des microorganismes isolés des matrices à analyser sont ensuite comparées à celles des modèles des banques de données afin de déterminer leur origine (Mott & Smith, 2011). Ces techniques reposent principalement sur la recherche d'*E. coli*, des entérocoques ou des streptocoques (Stoeckel & Harwood, 2007; US EPA, 2005) et concernent dans ce cas aussi bien l'étude de leurs particularités phénotypiques (*e.g.* résistance aux antibiotiques, profil d'utilisation du carbone, structure des esters méthyliques d'acides gras) que de leurs caractéristiques génotypiques. Dans ce derniers cas, les bactéries sont généralement isolées par culture puis une empreinte génétique est définie en utilisant différentes techniques moléculaires comme le ribotypage (Carson *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2005), l'amplification de séquences répétitives (Carson *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004), l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (Sigler & Pasutti, 2006) ou encore en champ pulsé (Furukawa & Suzuki, 2013; Parveen *et al.*, 2001). Les analyses génotypiques peuvent également être appliquées à l'ensemble d'une communauté bactérienne ce qui permet alors de s'affranchir de l'isolement des bactéries par culture (Field & Samadpour, 2007).

Certaines limites sont fréquemment associées aux approches bibliothèque-dépendantes (US EPA, 2005). Il s'agit notamment de la complexité et du coût lié à la construction de banques de données dont la taille et la représentativité sont suffisantes pour garantir l'efficacité de ces techniques comparatives. Par ailleurs, ces approches sont parfois controversées en raison de leur instabilité temporelle et de l'existence de bactéries cosmopolites empêchant la transposition des méthodes d'une région géographique à une autre (Ahmed *et al.*, 2007; Ebdon & Taylor, 2006; Mclellan *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2003; USEPA, 2005). Ainsi, chaque étude de suivi de l'origine d'une contamination devrait idéalement établir une nouvelle base de données relative à la région concernée.

Tableau VII : Méthodes microbiologiques disponibles pour déterminer l'origine d'une pollution fécale.

Méthodes	Références
Bibliothèque-dépendantes	
Profil de résistance aux antibiotiques (ARA, MAR et ARP)	(Carroll *et al.*, 2005; Ebdon & Taylor, 2006; Harmon *et al.*, 2014)
Profil d'utilisation du carbone (CUP)	(Evenson & Strevett, 2006)
Esters méthyliques d'acides gras (FAME)	(Duran *et al.*, 2009, 2006; Parveen *et al.*, 2001)
Ribotypage	(Carson *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2005)
Amplification de séquences répétitives (REP-PCR)	(Carson *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004)
Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP)	(Leung *et al.*, 2004)
Electrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)	(Sigler & Pasutti, 2006)
Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)	(Betancor *et al.*, 2004)
Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)	(Furukawa & Suzuki, 2013; Parveen *et al.*, 2001)
Bibliothèque-indépendantes	
Rapport coliformes fécaux/streptocoques fécaux	(Geldreich, 1976; Geldreich & Kenner, 1969; Raji *et al.*, 2015)
Bifidobacteria spp.	(Ballesté & Blanch, 2011; Bonjoch *et al.*, 2005; Muniesa *et al.*, 2015; Mushi *et al.*, 2010)
Rhodococcus coprophilus	(Wicki *et al.*, 2015, 2012)
Bactériophages de *bacteroides fragilis*	(Jofre *et al.*, 2014; McMinn *et al.*, 2014; Payan *et al.*, 2005)
Bactériophages ARN F-spécifiques	(Blanch *et al.*, 2006; Mieszkin *et al.*, 2013; Ravva *et al.*, 2015)
Adénovirus	(Bofill-Mas *et al.*, 2013; Kokkinos *et al.*, 2017; Viancelli *et al.*, 2012)
Entérovirus	(Fong & Lipp, 2005; Harwood *et al.*, 2013; Jimenez-Clavero *et al.*, 2005)
Polyomavirus	(Rachmadi *et al.*, 2016; Sidhu *et al.*, 2013; Symonds *et al.*, 2017)
Norovirus	(Harwood *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Kokkinos *et al.*, 2017)
Bacteroides	(Boehm *et al.*, 2013; Mauffret *et al.*, 2012; Mcquaig *et al.*, 2012; Oladeinde *et al.*, 2014; Symonds *et al.*, 2017)
Teschovirus	(Prodělalová, 2012)
Methanobrevibacter smithii	(Johnston *et al.*, 2013; Mcquaig *et al.*, 2012; Sidhu *et al.*, 2013)
Pepper mild mottle virus	(Han *et al.*, 2014; Kuroda *et al.*, 2015)
Gène de virulence (*E. coli,* entérocoques)	(Chern *et al.*, 2004; Khatib *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2005)
Rhodococcus coprophilus	(Savill *et al.*, 2001)

II.3.2 Méthodes bibliothèque-indépendantes

Les approches bibliothèque-indépendantes sont basées sur la recherche directe de certains microorganismes spécifiques d'un hôte donné. Considérées plus performantes que les méthodes bibliothèque-dépendantes (Harwood & Stoeckel, 2011), ces techniques se sont largement développées ces dernières années et la recherche de nombreux microorganismes, pathogènes ou non, est actuellement proposée pour déterminer l'origine d'une contamination fécale dans l'environnement. Si certains de ces microorganismes peuvent être isolés de manière plus ou moins aisée par culture, la grande majorité des microorganismes qui constituent la flore intestinale ne sont pas cultivables et de ce fait, les approches bibliothèque-indépendantes reposent très souvent sur des techniques moléculaires ciblant alors des éléments génétiques des virus ou bactéries spécifiques d'un hôte (Field & Samadpour, 2007; Santo Domingo *et al.*, 2007). Leur rapidité et la possibilité de détecter une multitude de microorganismes relativisent considérablement leur coût par rapport à la culture, si bien que des systèmes de PCR sont également décrits pour rechercher des microorganismes cultivables (Johnston *et al.*, 2013; Rusiñol *et al.*, 2014; Symonds *et al.*, 2017; Wicki *et al.*, 2012).

Parmi les bactéries proposées pour discriminer l'origine d'une pollution fécale, citons par exemple certaines espèces du genre *Bifidobacteria*, spécifiques de l'Homme (Bonjoch *et al.*, 2005; Casanovas-Massana *et al.*, 2015; Mushi *et al.*, 2010), ou encore *Rhodococcus coprophilus*, principalement retrouvé chez les herbivores (Wicki *et al.*, 2012). Les approches moléculaires permettent également de cibler des gènes de virulence distribués différemment chez certaines bactéries en fonction de leur hôte. Les gènes des toxines STIb, STII et LTIIa d'*E. coli* sont par exemple respectivement associés à l'Homme, aux bovins et aux porcins (Stoeckel & Harwood, 2007; USEPA, 2005). Enfin, les membres de l'ordre des *Bacteroidales* et plus précisément le genre *Bacteroides* est particulièrement étudié en raison de son abondance dans le tube digestif des mammifères (Salyers, 1984). Des systèmes de PCR ciblant leur ARN ribosomal 16S sont actuellement proposés pour distinguer les pollutions d'origine humaine (marqueur HF183), bovine (marqueurs Rum2Bac, BacCow) et porcine (Pig2Bac). Ces derniers marqueurs se sont particulièrement distingués par leur sensibilité et leur stabilité géographique (Boehm *et al.*, 2013; Ebdon *et al.*, 2007; Haugland *et al.*, 2010; Layton *et al.*, 2013; Mauffret *et al.*, 2012; Mcquaig *et al.*, 2012; Nshimyimana *et al.*, 2017).

Certains virus peuvent également être recherchés dans l'environnement pour identifier l'origine d'une contamination fécale du fait de leur forte spécificité d'hôte. Parmi eux, les pathogènes entériques sont très étudiés. Il s'agit entre autre des adénovirus humains (Jiang, 2006; Wong *et al.*, 2012), bovins (Hundesa *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2012) ou porcins (Hundesa *et al.*, 2009; Viancelli *et al.*, 2012) ; des entérovirus bovins (Jimenez-Clavero *et al.*,

2005) ; des NoV humains (Harwood *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Kokkinos *et al.*, 2017) et des teschovirus et circovirus porcins (Jimenez-Clavero *et al.*, 2003; Prodělalová, 2012; Viancelli *et al.*, 2012). D'autres virus sont également à l'étude, comme certains polyomavirus (JCPyV et BKPyV) répandus dans la population humaine sous forme latente et excrétés dans les urines (Albinana-Gimenez *et al.*, 2009; Bofill-Mas *et al.*, 2013; Egli *et al.*, 2009) ou encore le pepper mild mottle virus, un phytovirus abondamment retrouvé dans les selles humaines (Kuroda *et al.*, 2015; Rosario *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006).

Enfin, la recherche de certains bactériophages fécaux comme les phages infectants *Bacteroides fragilis* ou les bactériophages ARN F-spécifiques est également proposée (Blanch *et al.*, 2004; Brooks & Field, 2017; Jofre *et al.*, 2014; Payan *et al.*, 2005). Ces deux groupes de phages étant également étudiés comme de potentiels indicateurs de pollution virale, leur utilisation sera développée plus loin.

Face à l'abondance des techniques proposées pour tenter d'identifier l'origine d'une contamination fécale dans l'environnement, aucun consensus n'est aujourd'hui défini quant à la meilleure stratégie à adopter. Des études multi-laboratoires sont régulièrement menées en aveugle afin d'évaluer ces différentes approches, de les standardiser et d'identifier les plus efficaces (Blanch *et al.*, 2006; Ebentier *et al.*, 2013; Griffith *et al.*, 2003; Harwood *et al.*, 2013, 2009; Shanks *et al.*, 2016). Les données les plus récentes tendent à considérer l'ensemble de ces méthodes comme une boite à outils et la recherche concomitante de différents marqueurs est souvent préconisée puisque certains marqueurs s'avèrent plus ou moins pertinents selon le contexte.

II.4 Alternatives pour mieux apprécier le danger viral

II.4.1 Recherche des virus pathogènes les plus préoccupants

Afin de pallier aux limites décrites concernant l'utilisation des indicateurs conventionnels pour apprécier le danger viral, l'une des stratégies actuellement envisagée consiste à détecter directement ces pathogènes. Parmi l'ensemble des virus entériques en question, l'attention est logiquement portée sur les NoV et le VHA, tous deux considérés comme particulièrement préoccupants (WHO & FAO, 2008). La recherche des NoV appartenant aux génogroupes GI et GII apparaît en effet légitime au vu de leur implication dans les TIAC, tandis que la recherche du VHA, bien que plus rarement retrouvé dans les denrées alimentaires, est justifiée par les conséquences dramatiques que peuvent avoir les épidémies engendrées par ce virus (Conaty *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2009; Shieh *et al.*, 2007).

II.4.1.1 Recherche des génomes de norovirus et du virus de l'hépatite A : la norme ISO 15216

Les NoV et le VHA étant difficilement cultivables en routine, de nombreux protocoles assurant leur détection par des techniques de biologie moléculaire ont vu le jour ces dernières années (Lees, 2010). Si cet engouement reflète évidemment la volonté de disposer de techniques plus efficaces pour estimer le danger viral associé aux aliments, il est néanmoins rapidement apparu nécessaire de valider et de standardiser ces techniques de détection, et d'y inclure une démarche qualité indispensable à la validation des résultats.

Dans cette perspective, le groupe de travail CEN/TC275/WG6/TAG4 a été initié en 2004 au sein du comité européen de normalisation (CEN) afin d'élaborer et de valider des procédures harmonisées pour l'analyse de matrices alimentaires et ainsi établir un système de surveillance des virus entériques. Les méthodes de détection proposées s'intéressent particulièrement aux matrices alimentaires régulièrement à l'origine de TIAC d'origine virale. Parmi ces aliments à risque, on retrouve évidemment les coquillages, les fruits rouges et les salades, mais des procédures permettant l'analyse d'eaux embouteillées et de surfaces alimentaires diverses sont également proposées.

En 2013, la norme ISO 15216 **(Figure 4)** relative à l'extraction, à la détection et à la quantification des génomes des NoV et du VHA par RT-PCR en temps réel dans les aliments a ainsi été diffusée sous un statut temporaire et expérimental et sa version définitive est parue en 2017 (International Organization for Standardization, 2017).

II.4.1.1.1 Description

La première étape concerne l'extraction des particules virales à partir des matrices alimentaires. Les protocoles utilisés dans ce but sont variables selon la nature des aliments analysés **(Figure 4)** mais quoi qu'il en soit, les virus étant généralement présents en quantité très faible et leur isolement conduisant à la perte d'une fraction non négligeable de ces particules, cette étape est particulièrement critique. Afin d'évaluer cette perte, un virus témoin présentant des caractéristiques similaires aux pathogènes recherchés (*e.g.* mengovirus, ECBO virus) est ajouté en quantité connue à l'échantillon avant son traitement. Sa recherche en fin d'analyse permettra alors de calculer un rendement d'extraction.

Après extraction ou élution des virus à partir des aliments, l'extraction des génomes est réalisée en utilisant une méthode appropriée (*e.g.* kit NucliSens®, BioMérieux), dérivée de la technique proposée par Boom *et al.* (1990). L'un des objectifs de cette étape est de purifier les acides nucléiques afin d'éliminer au maximum les inhibiteurs de (RT-)PCR présents dans l'échantillon. Elle permet également de les concentrer afin d'en faciliter la détection.

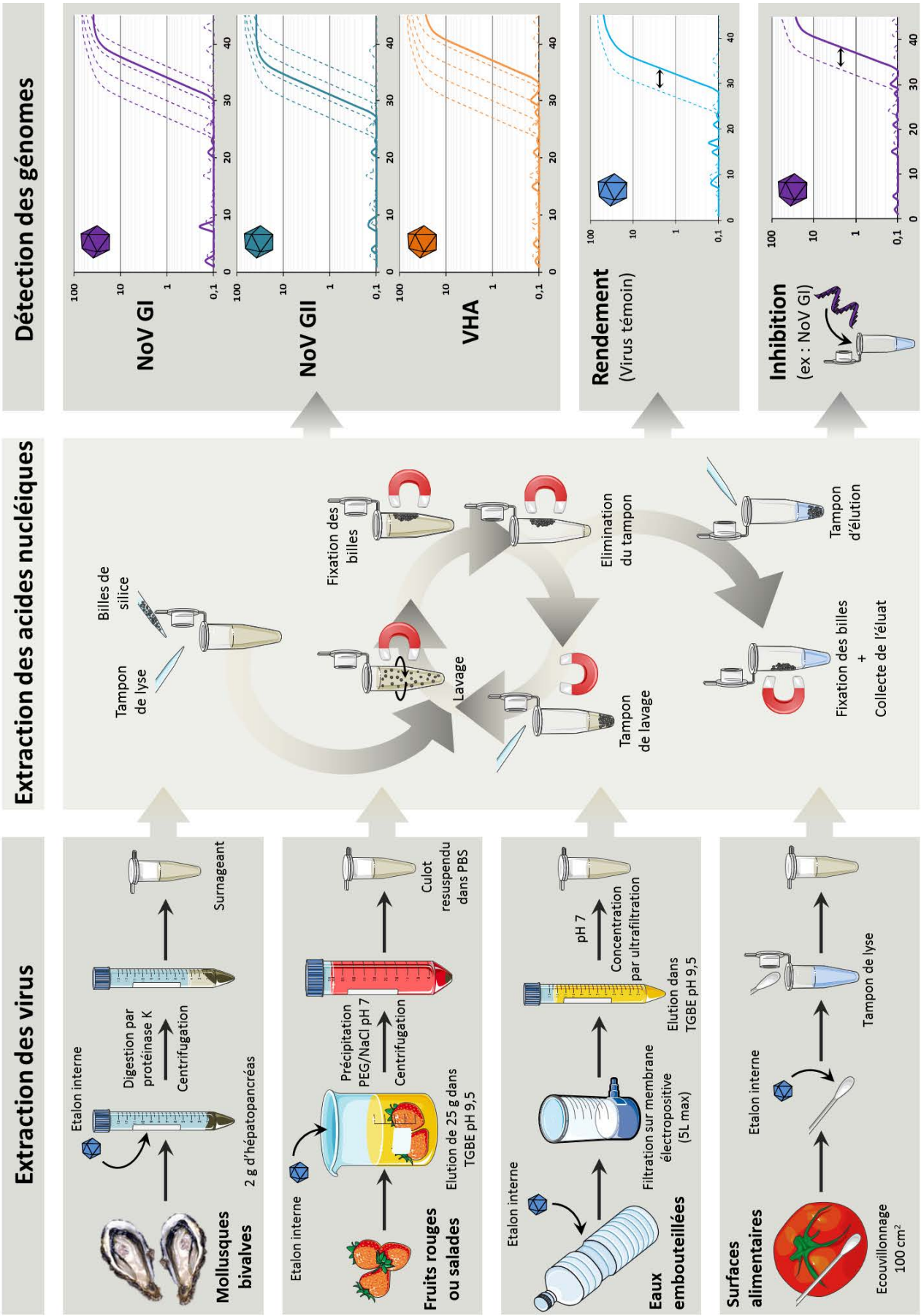

Figure 4 : Description schématique de la norme ISO 15216 relative à la recherche du virus de l'hépatite A et des norovirus dans les aliments par RT-PCR en temps réel.

La lyse des capsides virales est réalisée dans un tampon contenant un agent chaotropique (*i.e.* thiocyanate de guanidine) et les acides nucléiques libérés sont alors piégés par des particules de silice magnétique. Après leur fixation sur un système aimanté, les particules de silice sont lavées par différents tampons afin de purifier les acides nucléiques qui seront ensuite élués par chauffage dans un tampon adapté.

Concernant la détection des génomes, le suivi de la norme ISO 15216 impose l'utilisation de réactifs permettant d'effectuer la réaction de RT-PCR en temps réel et en une seule étape, afin de réduire le risque de contamination des échantillons. Cette technique semble également plus simple à standardiser. La norme ISO 15216 suggère l'utilisation du kit RNA Ultrasense™ One-Step qRT-PCR (Thermofisher) et propose également des amorces et sondes d'hydrolyse garantissant une sensibilité suffisante et l'absence de réaction croisée **(Tableau VIII)**. Afin de maximiser la sensibilité de la technique, la détection des génomes des différents virus est réalisée séparément. Leur quantification est assurée par la réalisation en parallèle d'une série de dilution de plasmides d'ADN double brin portant la séquence d'intérêt, permettant d'établir une courbe étalon.

Tableau VIII : Amorces et sondes utilisées pour la détection du virus de l'hépatite A et des norovirus du génogroupe GI et GII dans les matrices alimentaires, d'après la norme ISO 15216 (2017).

Cible	Amorces/ Sondes	Séquence	Référence
VHA	HAV68 (F)	TCA CCG CCG TTT GCC TAG	(Costafreda *et al.*, 2006)
	HAV240 (R)	GGA GAG CCC TGG AAG AAA G	(Costafreda *et al.*, 2006)
	HAV150(-) (S)	FAM-CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA-MGBNFQ	(Costafreda *et al.*, 2006)
NoV GI	QNIF4 (F)	CGC TGG ATG CGN TTC CAT	(Da Silva *et al.*, 2007)
	NV1LCR (R)	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC	(Svraka *et al.*, 2007)
	*NVGG1p (S)	FAM-TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT-TAMRA	(Svraka *et al.*, 2007)
	*TM9 (S)	FAM-TGG ACA GGA GAT CGC-MGBNFQ	(Hoehne & Schreier, 2006)
NoV GII	QNIF2 (F)	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	(Loisy *et al.*, 2005a)
	COG2R (R)	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	(Kageyama *et al.*, 2003)
	QNIFs (S)	FAM-AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG-TAMRA	(Loisy *et al.*, 2005a)

F = Amorce sens, R = Amorce antisens, S = Sonde
*Deux constructions différentes sont proposées pour la sonde d'hydrolyse permettant la détection des NoV du génogroupe GI.

L'estimation du rendement d'extraction des virus et des acides nucléiques est permise grâce au virus témoin ajouté aux échantillons en début d'analyse (Hennechart-Collette *et al.*, 2015). Pour ce faire, la même quantité de virus témoin est extraite en parallèle, afin d'obtenir un signal en PCR correspondant à un rendement de 100 %. La quantité de virus témoin retrouvée dans les extraits est alors comparée à cette valeur. La norme ISO 15216 impose

un rendement d'extraction supérieur à 1 % pour considérer le résultat acceptable. Par ailleurs, pour chacun des virus ciblés, l'ajout puis la détection d'une quantité connue d'ARN portant la séquence d'intérêt dans l'échantillon ainsi que dans une matrice exempte d'inhibiteurs de (RT-)PCR permet d'évaluer l'influence de ces derniers. Le résultat est alors considéré acceptable si le pourcentage d'inhibition dans l'échantillon est inférieur à 75 %. Dans le cas contraire, et afin de rendre la quantification la plus précise possible, les résultats obtenus lors de l'analyse des échantillons d'ARN dilués au 10ème doivent être considérés.

Notons enfin que l'estimation du rendement et de la présence d'inhibiteurs est ici uniquement utilisée comme un paramètre d'assurance qualité et que ces valeurs ne doivent en aucun cas servir à ajuster les concentrations de génomes mesurées dans les matrices.

Si la norme ISO 15216 permet donc de détecter et de mesurer les quantités de génomes de NoV et de VHA présentes dans différents types de matrices, son application pour évaluer la qualité microbiologique des denrées alimentaires demeure cependant discutable puisque certains arguments suggèrent que la détection des génomes viraux pourrait sous-estimer le danger ou qu'à l'inverse elle pourrait le surestimer.

II.4.1.1.2 Sous-estimation du danger viral

Les techniques de biologie moléculaire sont considérées comme particulièrement sensibles pour rechercher des microorganismes puisqu'elles permettent théoriquement de détecter la présence d'une unique copie de génome. Cette sensibilité doit cependant être relativisée par rapport au volume d'échantillon engagé dans l'analyse. En effet, si l'on applique par exemple la norme ISO 15216 à l'analyse des coquillages, les différentes étapes de préparation des échantillons conduisent à une limite de détection (LOD), c'est-à-dire à une concentration minimale de génomes dans l'échantillon assurant la présence d'au moins une copie de génome (cg) dans un puits de PCR, de l'ordre de 10^2 cg/2 g de tissus digestifs. De la même manière, la limite de quantification (LOQ), qui correspond cette fois à la dilution la plus faible de la gamme étalon donnant un résultat positif (*i.e.* généralement 10 cg par puits de PCR) est alors proche de 10^3 cg/2 g de tissus. En pratique, il apparaît que la LOD et la LOQ sont très largement supérieures à ces valeurs théoriques puisqu'elles sont directement impactées par les rendements mais aussi par la présence d'inhibiteurs de (RT-)PCR. Si l'on considère alors les paramètres les moins favorables en accord avec la norme, c'est-à-dire un rendement d'extraction de 1 % et un taux d'inhibition de 75 %, la LOD et la LOQ sont dans ce cas respectivement supérieures à 10^4 et 10^5 cg/g de tissus digestifs.

Des essais ont permis de confirmer une LOD pratique (*i.e.* plus petite concentration cible dans un échantillon qui peut être détectée de façon reproductible dans les conditions expérimentales) proche de 10^4 cg/g de tissus digestifs dans le cas des NoV du génogroupe GII (document interne). La sensibilité de cette technique apparaît dès lors perfectible si ces valeurs sont comparées aux doses minimales infectieuses annoncées pour les NoV et le VHA (Teunis *et al.*, 2008; Yezli & Otter, 2011).

En deuxième lieu, il est également important de souligner les limites liées à l'échantillonnage des matrices alimentaires. Alors que le fait d'extrapoler des résultats obtenus par l'analyse d'une faible fraction d'une matrice est un biais commun à toutes les méthodes analytiques, cette limite est particulièrement perçue en biologie moléculaire et en particulier lors d'analyses d'échantillons faiblement contaminés ou qui le sont de manière hétérogène (Butot *et al.*, 2014; EFSA, 2012). D'un point de vue statistique, il apparaît ainsi que l'analyse de 10 coquillages (*i.e.* comme préconisé par la norme ISO 15216), provenant d'un lot contenant 25 % de spécimens contaminés par des NoV à une concentration moyenne de 100 cg/g de tissu, conduirait à leur détection dans seulement 39 % des cas, et cela, toujours en considérant la LOD théorique, c'est-à-dire non corrigée par le rendement d'extraction ou la présence d'inhibiteurs **(Tableau IX)**.

Tableau IX : Probabilité de détecter des génomes de norovirus dans des lots de coquillages en fonction de leur prévalence et de leur concentration, d'après l'EFSA, 2012.

Fréquence de spécimens positifs dans un lot	Concentration moyenne en génomes (cg/g de tissus digestifs)				
	1	**100**	**200**	**500**	**1 000**
1 %	0,1 %	4,0 %	6,3 %	8,9 %	9,5 %
2 %	0,1 %	7,6 %	12 %	17 %	18 %
5 %	0,2 %	17 %	26 %	37 %	40 %
10 %	0,3 %	27 %	43 %	61 %	65 %
25 %	0,5 %	39 %	62 %	88 %	94 %
50 %	0,5 %	41 %	66 %	93 %	99 %
75 %	0,5 %	41 %	66 %	93 %	100 %
95 %	0,5 %	41 %	66 %	93 %	100 %

L'ensemble de ces observations conduit donc à supposer que les techniques de détection proposées dans la norme ISO 15216 ne permettraient pas systématiquement d'identifier le danger viral, et cette hypothèse est aujourd'hui appuyée par la non détection de génomes de NoV dans des coquillages qui pourtant ont été à l'origine de TIAC (EFSA, 2012; Le Mennec *et al.*, 2017; Lowther *et al.*, 2012a, 2010; Severi *et al.*, 2015).

II.4.1.1.3 Surestimation du danger viral

Alors que les limites méthodologiques décrites ci-dessus suggèrent que l'application de la norme ISO 15216 pourrait sous-estimer le danger lié à la présence de virus pathogènes dans les matrices alimentaires, d'autres arguments supposent au contraire qu'elle pourrait le surestimer.

La norme ISO 15216 permet en effet de rechercher les NoV et le VHA dans les matrices alimentaires en ciblant uniquement leurs génomes. Or, il est aujourd'hui largement démontré que le génome des virus présente une bien meilleure stabilité que leur caractère infectieux et qu'ainsi, seule une infime proportion des génomes détectés dans l'environnement correspond réellement à des virus infectieux (Choi & Jiang, 2005; Gassilloud *et al.*, 2003; Girones *et al.*, 2010; Kirs & Smith, 2007; Ogorzaly *et al.*, 2010).

Il est également important de souligner que selon la cause de l'inactivation des virus, ce phénomène peut être accentué. A titre d'exemple, citons le cas des rayonnements UV qui agissent principalement en causant des dommages au niveau du génome des virus sans pour autant affecter la capside du virus (Wigginton *et al.*, 2012) ou la chaleur qui agit plutôt sur la capside sans altérer le génome (Brié *et al.*, 2016; Wigginton *et al.*, 2012). Ainsi, dans le cas des coquillages, la bioaccumulation de particules virales non infectieuses (*i.e.* capsides plus ou moins intactes contenant un génome altéré) semble envisageable et ces dernières demeurent alors détectables par les techniques de biologie moléculaire puisqu'elles ne ciblent qu'un court fragment du génome (Campos & Lees, 2014; Gassilloud *et al.*, 2003; Simonet & Gantzer, 2006). En conséquence, des génomes de NoV ou du VHA sont très fréquemment retrouvés dans les coquillages puisque selon les études, 5 à 76 % des lots commerciaux seraient positifs pour leur recherche (Costantini *et al.*, 2006; EFSA, 2012; Loisy *et al.*, 2005a; Lowther *et al.*, 2012b; Polo *et al.*, 2015; Schaeffer *et al.*, 2013; Suffredini *et al.*, 2014). De la même manière, Baert *et al.* (2011) et Loutreul *et al.* (2014) ont observé qu'en moyenne, 7 à 34 % des produits maraîchers de type fruits rouges, salades vertes, tomates ou concombres sont positifs pour la recherche des génomes de NoV.

Face à ces arguments, il semble alors particulièrement difficile d'interpréter ces résultats en termes de danger pour le consommateur et rappelons d'ailleurs que malgré la forte prévalence des génomes viraux dans les matrices alimentaires, le nombre de TIAC en lien avec leur consommation demeure relativement faible. D'un point de vue réglementaire, cette difficulté d'interprétation est également soulignée. Dans le cas des coquillages à l'origine de TIAC causées par les NoV, la législation prévoit par exemple la réouverture de la zone conchylicole concernée après un délai de 28 jours, alors même que des génomes

viraux puissent encore être détectés dans les coquillages compte tenu de leur persistance (DGAL, 2013). La difficulté de savoir si ces génomes correspondent ou non à la présence de particules infectieuses peut alors conduire dans certains cas à la survenue de nouvelles TIAC (Le Mennec *et al.*, 2017).

II.4.1.1.4 Mise en place d'un seuil de risque

Afin de mieux hiérarchiser le danger lié à la présence de virus entériques dans les matrices alimentaires et face à la forte prévalence de leur génome, la mise en place de valeurs seuils, telles qu'elles sont par exemple établies par la législation pour la recherche d'*E. coli* est actuellement proposée, en particulier dans le cas des coquillages (CEFAS, 2014; EFSA, 2016; Hassard *et al.*, 2017).

Cette approche apparaît d'ores et déjà discutable. En effet, bien qu'une relation soit parfois observée entre la quantité de génomes de NoV détectée dans des lots de coquillages et leur implication dans des TIAC (Doré *et al.*, 2010; Lowther *et al.*, 2012a), des concentrations très fortes (*i.e.* $>10^4$ cg/g) sont parfois détectées dans des lots n'ayant pas provoqué de TIAC, et inversement, certaines études n'ont retrouvé que peu, voire aucun génome dans des échantillons à l'origine d'épidémies (EFSA, 2012; Lowther *et al.*, 2012a, 2010).

Par ailleurs, en admettant que la mise en place d'un tel seuil permette de déterminer si oui ou non, un aliment est dangereux pour le consommateur, il est important de souligner qu'il est extrêmement difficile de quantifier avec précision les génomes viraux à partir des matrices alimentaires. Il apparaît en effet que leurs concentrations dans les coquillages à l'origine de TIAC sont fréquemment estimées entre la LOD et la LOQ des méthodes de détection actuelles et que dans la plupart des cas, ces échantillons sont donc non quantifiables au regard des exigences décrites dans la norme ISO 15216 (EFSA, 2012; Fitzgerald *et al.*, 2014; Hassard *et al.*, 2017; Lowther *et al.*, 2012a; Woods *et al.*, 2016).

De la même façon, si on considère la valeur critique de 10^3 cg/g de tissus digestifs qui est actuellement envisagée pour hiérarchiser le danger viral, cette dernière correspondrait alors à la présence de seulement 25 cg/puits de PCR (CEFAS, 2014). Or, en se référant au guide de bonnes pratiques MIQE des techniques de qPCR (Bustin *et al.*, 2009), il apparaît qu'une variabilité importante est observée lors de la détection de telles quantités de génome, empêchant le plus souvent les techniques de qPCR conventionnelles de fournir un résultat précis et reproductible. Dans ce dernier cas de figure, le recours aux récentes techniques de Digital PCR semble alors constituer une alternative intéressante en assurant une quantification plus précise des échantillons faiblement chargés en génomes (Coudray-Meunier *et al.*, 2015; Polo *et al.*, 2016; Rački *et al.*, 2014).

II.4.1.2 Détection des virus infectieux par biologie moléculaire

Il apparaît donc évident aujourd'hui que la recherche directe des génomes viraux dans les aliments ne permet pas d'estimer efficacement la présence concomitante des particules infectieuses et donc du danger associé (Choi & Jiang, 2005; Gassilloud *et al.*, 2003; Hot *et al.*, 2003). Aussi, certaines alternatives ont été proposées comme par exemple le recours à des approches moléculaires qui assurent la détection spécifique des particules virales infectieuses (Cliver, 2009; Hamza *et al.*, 2011a; Knight *et al.*, 2012; Rodriguez *et al.*, 2009). Ces techniques se basent principalement sur l'évaluation de deux paramètres qui sont l'intégrité de la capside et celle du génome viral. Il s'agit en effet de deux prérequis essentiels pour garantir le caractère infectieux d'un virus.

Concernant l'intégrité du génome viral, il apparaît par exemple que la détection d'un long fragment de génome dans un échantillon (*i.e.* long-rang PCR) est plus efficace pour estimer la présence de virus infectieux (Pecson *et al.*, 2011; Simonet & Gantzer, 2006).

Concernant les méthodes permettant d'évaluer l'intégrité de la capside, Nuanualsuwan & Cliver (2002) ont proposé un prétraitement combinant protéinase K et RNases, assurant la dégradation respective des capsides virales endommagées et des ARN libres. Cette technique permet alors de détecter par PCR uniquement les génomes présents dans des virus intacts. De la même manière le recours aux agents intercalants de type propidium ou éthidium monoazide (PMA, EMA) est proposé (Fuster *et al.*, 2016; Karim *et al.*, 2015; McLellan *et al.*, 2016; Parshionikar *et al.*, 2010). Ces molécules sont capables de se lier au génome viral lorsque celui-ci est accessible (*i.e.* capside virale endommagée) et empêchent alors la réaction de PCR de se produire. Ces agents étant uniquement capables de s'intercaler au niveau des régions double brin du génome, cette approche nécessite au préalable l'identification de structures secondaires dans le cas des virus possédant un génome monocaténaire (*e.g.* NoV et VHA) (Knight *et al.*, 2012; Parshionikar *et al.*, 2010).

En dernier lieu, d'autres alternatives consistant à mesurer les dégâts liés à l'oxydation des groupements carbonyle au niveau de la capside (Sano *et al.*, 2015, 2010) ou encore à évaluer la capacité des particules virales à interagir avec certains ligands ou anticorps sont proposées (Dancho *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2009).

Appliquées à la recherche des NoV et du VHA dans les aliments, l'ensemble de ces techniques se heurte toutefois aux mêmes limites en termes de sensibilité que celles déjà décrites pour les approches moléculaires traditionnelles (Jeong *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Moreno *et al.*, 2015; Randazzo *et al.*, 2016).

II.4.2 Les autres indicateurs pour apprécier la pollution virale et le danger associé

Face aux limites largement décrites concernant l'incapacité des indicateurs bactériens à renseigner sur le danger lié à la présence des pathogènes viraux dans l'environnement, la définition d'autres indicateurs plus pertinents est aujourd'hui envisagée. Valider l'utilisation de tels indicateurs est alors une étape déterminante.

II.4.2.1 L'indicateur de pollution idéal

Le concept d'indicateur de pollution idéal a été suggéré par Bonde en 1963 qui lista les différents critères qui devraient qualifier un microorganisme permettant de signaler une contamination fécale (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991). Ces critères ont par la suite été étoffés par différents auteurs, en considérant notamment que cet indicateur devrait également renseigner sur l'origine de la pollution, la proximité de la source, ainsi que sur l'efficacité des procédés de désinfection classiquement utilisés pour réduire la charge microbienne des matrices hydriques ou alimentaires (Berg, 1978; Cabelli, 1978; Gerba, 2009; Yates, 2007).

Dans cette même logique, Mossel et Ingram ont défini deux concepts pour caractériser les microorganismes selon le type d'informations qu'ils fournissent (Jofre, 2007; Mossel, 1983). Les auteurs définissent sous le terme « index » un microorganisme recherché de manière prédictible, c'est-à-dire dont la présence dans l'environnement est corrélée à celle d'un ou plusieurs pathogènes donnés et donc à un danger pour la santé des individus. Cette corrélation peut être directe (*i.e.* index de virus entériques humains) ou indirecte (*i.e.* index de pollution fécale). Cette définition est donc très proche des attentes de ce qu'on appelle communément un indicateur de pollution fécale. Par opposition, la notion d'« indicateur » est définie par les auteurs comme un microorganisme modèle ayant un comportement et des caractéristiques similaires à celles d'un pathogène, présentant une résistance identique voire supérieure à ce dernier face aux différents stress rencontrés dans l'environnement, mais qui n'a cependant pas nécessairement une origine fécale. Le terme indicateur est employé dans ce cas pour désigner un microorganisme recherché par exemple pour évaluer l'efficacité des traitements utilisés afin de limiter la présence des microorganismes pathogènes dans l'eau ou les aliments. En conséquence, le marqueur de pollution idéal devrait en principe remplir ces deux fonctions (Ashbolt *et al.*, 2001; Jofre, 2007).

En tenant compte des besoins actuels et en particulier de l'importance de pouvoir déterminer l'origine d'une pollution au vu de la spécificité d'hôte des virus entériques, les critères rassemblés dans le **Tableau X** caractériseraient aujourd'hui au mieux ce marqueur.

Tableau X : Caractéristiques de l'indicateur idéal appliquées à la pollution de type viral, adapté de Armon & Kott, 1996; Harwood & Stoeckel, 2011; Jofre *et al.*, 2014; WHO & OECD, 2003; Yates, 2007.

Caractéristiques	Indicateur idéal	Indicateur potentiel
Discriminer l'origine d'une pollution		
Spécificité d'hôte	Présent uniquement chez une espèce donnée	Distribué différemment chez les espèces
Distribution dans la population	Distribué de manière homogène et à des concentrations similaires chez tous les membres d'une espèce	Distribué de manière hétérogène mais stable à l'échelle d'une population (*i.e.* présent dans les sources majeures de pollution comme les eaux usées)
Distribution géographique	Associé à un type d'hôte dans toutes les zones géographiques	Associé à un type d'hôte dans la zone étudiée
Stabilité temporelle	Concentration constante chez les individus au cours du temps	Prévalence et concentration constante au cours du temps à l'échelle d'une population
Indiquer une contamination virale		
Pertinence	Dérivé d'un indicateur réglementaire de pollution fécale	Corrélé avec un indicateur de pollution fécale
Persistance dans l'environnement	Pas de multiplication dans l'environnement, cinétique d'inactivation similaire à celles des pathogènes	Pas de multiplication dans l'environnement, cinétique d'inactivation connue
Corrélation avec les pathogènes	Corrélation avec le danger lié à l'ensemble des pathogènes transmis par l'eau	Constitue lui-même un danger pour la santé ou corrélé avec certains pathogènes
Méthode de détection		
Suffisamment abondant dans l'environnement pour assurer sa détection Détectable par des méthodes rapides et peu coûteuses et si possible quantitatives Non pathogène afin de minimiser le danger lors des analyses		

En résumé, le marqueur de pollution idéal adapté aux virus entériques pathogènes doit avoir une origine entérique, être spécifique de l'Homme et une fois excrété dans l'environnement, ce dernier doit être incapable de s'y multiplier et présenter un comportement similaire à celui des pathogènes, en particulier en termes de résistance face aux différents stress environnementaux afin de maintenir une bonne corrélation avec ces derniers. De ce fait, le recours à des marqueurs de nature virale semble aujourd'hui particulièrement prometteur.

II.4.2.2 Les indicateurs de nature virale

Dans la mesure ou certains microorganismes proposés pour identifier les contaminations fécales d'origine humaine sont des virus (*i.e.* adénovirus, entérovirus, pepper mild mottle virus, polyomavirus, torque teno virus), on envisage parfois que leur recherche

permettrait également de renseigner sur le danger viral associé (Albinana-Gimenez *et al.*, 2009; De Giglio *et al.*, 2017; Fernandez-Cassi *et al.*, 2016; Griffin *et al.*, 2008; Hamza *et al.*, 2011a; Haramoto *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2017; Lin & Ganesh, 2013; McQuaig & Noble, 2011; Rames *et al.*, 2016). Cette approche se heurte cependant à deux limites.

En premier lieu, et comme déjà décrit pour les NoV, la plupart de ces virus sont actuellement recherchés en utilisant des approches moléculaires. La persistance des génomes dans l'environnement peut alors être considérée comme un inconvénient, empêchant d'identifier les épisodes de pollution les plus récents qui sont préférentiellement associés au danger (Santo Domingo *et al.*, 2007).

A l'opposé, une autre limite fréquemment avancée concerne la faible densité virale généralement rencontrée dans l'environnement. Il est alors impératif d'utiliser des techniques de concentration à partir des eaux ou des matrices solides (*i.e.* adsorption-élution, ultrafiltration, ultracentrifugation, floculation) afin d'augmenter la sensibilité des méthodes de détection classiquement appliquées à la recherche des virus entériques pathogènes (Bosch *et al.*, 2011; Bosch, 1998; Cashdollar & Wymer, 2013; Katayama *et al.*, 2002; McQuaig & Noble, 2011; Schwartzbrod, 2000). Notons enfin que la présence d'inhibiteurs de PCR très répandus dans les matrices environnementales complique grandement leur détection (Ijzerman *et al.*, 1997; Schrader *et al.*, 2012; Schriewer *et al.*, 2011).

De ce fait, d'autres microorganismes de nature virale (*i.e.* bactériophages fécaux) sont actuellement largement étudiés comme indicateurs dans l'environnement (Jofre *et al.*, 2016). En effet, leur présence en forte concentration dans les selles et eaux usées, leur morphologie (*i.e.* taille et structure proches de celles des virus entériques) et la possibilité pour certains de les cultiver très facilement en font des indicateurs au potentiel intéressant.

II.4.2.3 Les bactériophages fécaux

Les bactériophages sont des virus capables d'infecter des bactéries. Ils représenteraient l'entité biologique la plus abondante sur Terre (Suttle, 2005). Actuellement, plus de 5 500 phages sont décrits et leur classification est principalement basée sur la morphologie de leur capside et la nature de leur génome (Ackermann, 2007, 2001). L'ordre des *Caudovirales*, unique ordre reconnu par le Comité International de Taxonomie des Virus, rassemble aujourd'hui la majorité des bactériophages connus **(Figure 5)**. Il s'agit principalement de virus nus à ADN double brin, de taille comprise entre 47 et 105 nm et pourvus d'une queue. Les autres phages regroupés sous l'appellation PFP (Polyèdre, Filamenteux, Pléomorphe) représentent actuellement moins de 4 % des phages identifiés.

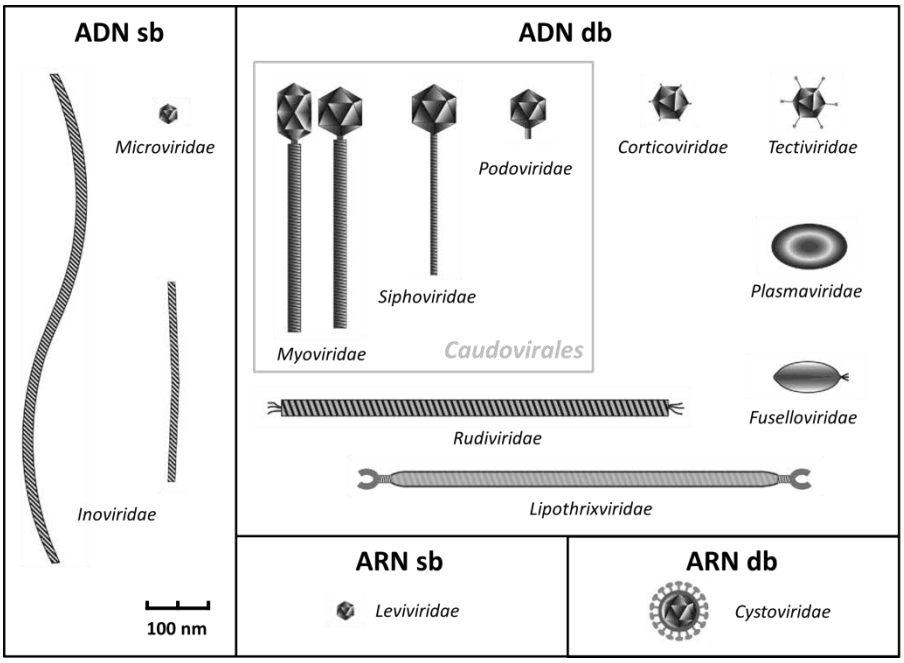

Figure 5 : Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages, adaptée de Ackermann 2007; King *et al.* 2011. sb : simple brin ; db : double brin.

Les bactériophages fécaux, c'est-à-dire capables d'infecter certaines bactéries entériques, sont à l'heure actuelle très étudiés en tant qu'indicateurs de pollution virale dans l'environnement mais certains d'entre eux sont également proposés pour discriminer l'origine d'une pollution. Découverts de manière concomitante au milieu des années 1910 (d'Hérelle, 1917; Twort, 1915) les bactériophages fécaux ont été envisagés pour la première fois comme indicateurs de pollution fécale par Guélin (1948). Cette possibilité fut rapidement appuyée dans les années 1950 par les premières études montrant la présence de ces microorganismes dans des eaux contaminées par des matières fécales (Jofre *et al.*, 2011).

Certains de ces phages possèdent des caractéristiques structurales très proches de celles des virus entériques pathogènes, suggérant alors qu'ils seraient plus adaptés que les indicateurs bactériens pour évaluer leur devenir dans l'environnement mais également lors des procédés de désinfection des eaux.

Actuellement, trois groupes de bactériophages fécaux sont proposés pour signaler la présence des virus entériques dans l'environnement (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991). Il s'agit des coliphages somatiques, des phages infectants *Bacteroides spp.* et des bactériophages ARN F-spécifiques. Leur recherche est aujourd'hui parfaitement standardisée, en particulier lorsqu'il s'agit de les détecter dans les matrices hydriques (International Organization for Standardization, 2001a, 2001b, 2000). Les bactériophages ARN F-spécifiques seront tout particulièrement abordés dans la partie III.

II.4.2.3.1 Les coliphages somatiques

Les coliphages somatiques sont définis par leur capacité à infecter les entérobactéries au niveau de leur paroi. La plupart des coliphages somatiques possèdent un génome à ADN et appartient aux familles des *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Microviridae* ; ils représentent donc un groupe très hétérogène de virus en termes de structure (Ackermann, 2009).

Ces phages étant présents à la fois dans le tractus digestif de l'Homme et de l'animal, leur recherche ne permet pas actuellement de discriminer l'origine d'une contamination fécale (Grabow *et al.*, 1995; Havelaar *et al.*, 1986). Leur forte concentration dans les selles (*i.e.* jusqu'à 10^8 unités formant plages [UFP]/g chez l'animal mais généralement inférieure à 10^3 UFP/g chez l'Homme) et leur présence dans les eaux usées à des concentrations bien supérieures à celles des virus pathogènes (*i.e.* 10^7 à 10^8 UFP/L) constituent néanmoins des arguments forts pour leur utilisation en tant qu'indicateurs de pollution fécale de nature virale (Contreras-Coll *et al.*, 2002; Grabow, 2001; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jofre *et al.*, 2016; Lucena *et al.*, 2003; Yahya *et al.*, 2015). Certains travaux suggèrent cependant que les coliphages somatiques pourraient se multiplier dans l'environnement dans des conditions biens particulières, ce qui compromettrait évidement leur utilisation (Grabow, 1990; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Vaughn & Metcalf, 1975).

II.4.2.3.2 Les bactériophages de *Bacteroides spp.*

Les bactéries du genre *Bacteroides* représentent une part importante de la flore intestinale des animaux à sang chaud (Salyers, 1984; Wexler, 2007). Leur abondance dans le tractus digestif (*i.e.* 10^9 à 10^{10} bactéries/g de selles), bien supérieure à celle d'*E. coli*, justifie aujourd'hui l'intérêt qui est porté aux bactériophages capables de les infecter (Contreras-Coll *et al.*, 2002; Grabow *et al.*, 1995; Jofre *et al.*, 2011).

Les phages de *Bacteroides spp.* et en particulier de *B. fragilis* appartiennent majoritairement à la famille des *Siphoviridae* ; il s'agit donc d'un groupe de virus plutôt homogène. Ces phages présentent une structure binaire, constituée d'une capside icosaédrique d'environ 60 nm de diamètre et d'une queue non contractile (Queralt *et al.*, 2003).

Le premier argument justifiant leur recherche dans l'environnement en tant qu'indicateurs de pollution concerne leur faible probabilité de pouvoir s'y multiplier, compte tenu de la condition d'anaérobie stricte nécessaire à la croissance de leurs bactéries hôtes (Tartera & Jofre, 1987). Tout comme les coliphages somatiques, ces phages présentent par ailleurs une

résistance bien supérieure à celle des indicateurs bactériens face aux différents stress environnementaux (Jofre *et al.*, 2011).

Les phages de *Bacteroides* sont également étudiés dans le but de déterminer l'origine d'une contamination fécale (Diston & Wicki, 2015; Leknoi *et al.*, 2016; Payan *et al.*, 2005; Venegas *et al.*, 2015). Il apparaît en effet que selon la souche bactérienne utilisée comme hôte pour leur détection, des résultats très variables sont observés lors de l'analyse d'échantillons de selles provenant de différentes espèces animales. Les souches RYC2056 et VPI3625 de *B. fragilis* permettent par exemple d'isoler des phages à partir de matrices contaminées par l'Homme ou l'animal (Blanch *et al.*, 2006; Jofre *et al.*, 2014; Puig *et al.*, 1999) alors que les souches HSP40 et GB124 de *B. fragilis* ainsi que la souche GA17 de *B. thetaiotaomicron* assurent plus spécifiquement la détection des phages associés à une pollution d'origine humaine, avec cependant une efficacité plus ou moins marquée selon la zone géographique considérée (Blanch *et al.*, 2006; Ebdon *et al.*, 2007; Payan *et al.*, 2005; Tartera & Jofre, 1987). Les souches HSP40 et GA17 seraient en effet adaptées à la détection des phages d'origine humaine dans le sud de l'Europe mais s'avèrent inefficaces en Grande Bretagne (Blanch *et al.*, 2006; Jofre *et al.*, 2011; Tartera & Jofre, 1987) tandis que la souche GB124 serait utilisable en Grande Bretagne ainsi qu'aux États-Unis (Ebdon *et al.*, 2007; McMinn *et al.*, 2014).

Les principales limites associées à ces indicateurs concernent leur faible prévalence (Chung *et al.*, 1998; Skraber *et al.*, 2002). En utilisant une souche particulièrement permissive (*i.e. B. fragilis* HSP40), on estime en effet que la prévalence de ces phages chez l'Homme est de l'ordre de 5 à 10 % (Grabow *et al.*, 1995; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Tartera & Jofre, 1987). Plus fréquemment retrouvés dans les eaux usées, leur concentration demeure de l'ordre de 10^4 à 10^5 UFP/L, c'est-à-dire bien inférieure à celle des coliphages somatiques (Blanch *et al.*, 2006; Grabow, 2001; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Tartera *et al.*, 1989). Par ailleurs, leur détection est relativement laborieuse puisqu'elle nécessite l'utilisation de milieu de culture complexe et le respect des conditions d'anaérobie.

III. LES BACTERIOPHAGES ARN F-SPECIFIQUES

L'existence des bactériophages F-spécifiques a été rapportée pour la première fois par Loeb (1960) qui isola à partir d'eaux usées 7 phages capables de croître sur *E. coli K12*. Parmi eux, 6 présentaient une structure sphérique et contenaient un génome à ARN (*i.e.* bactériophages ARN F-spécifiques), alors que le 7ème présentait une structure filamenteuse et contenait un génome à ADN (*i.e.* bactériophages ADN F-spécifiques) (Loeb & Zinder, 1961; Zinder *et al.*, 1963).

III.1 Description

Les bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH) sont des virus nus mesurant entre 25 et 30 nm de diamètre (Golmohammadi *et al.*, 1993; Valegård *et al.*, 1990). Contrairement aux phages ADN F-spécifiques dont l'écologie est encore peu documentée, les FRNAPH sont particulièrement étudiés en virologie environnementale à cause des nombreuses similitudes structurales qu'ils présentent avec les entérovirus, les calicivirus, les astrovirus et les virus des hépatites A et E (Grabow, 2001; Jofre *et al.*, 2011). Ces phages appartiennent aux genres *Levivirus* et *Allolevivirus*, tous deux regroupés au sein de la famille des *Leviviridae* (Bollback & Huelsenbeck, 2001). Les bactériophages F-spécifiques sont caractérisés par leur capacité à infecter leurs bactéries hôtes par l'intermédiaire des *pili* sexuels ou F-*pili* qu'elles synthétisent **(Figure 6)**. Ces *pili* sont des structures filamenteuses de type protéique présentent chez certaines bactéries Gram négatif exprimant le plasmide F ; elles sont impliquées dans le transfert de matériel génétique par conjugaison (Brinton Jr. *et al.*, 1964).

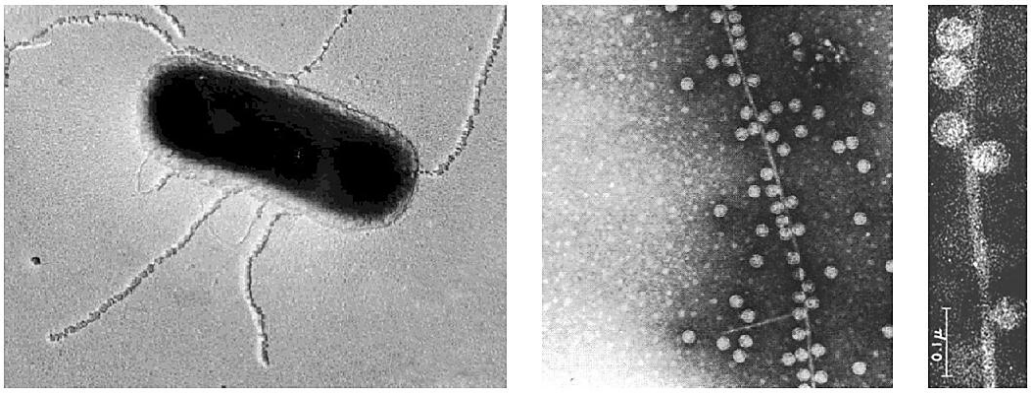

Figure 6 : Bactériophages ARN F-spécifiques adhérés à la surface des *pili* sexuels d'une bactérie *Escherichia coli*. Gauche et milieu : bactériophage MS2 ; droite : bactériophage f2, d'après Caro *et al.*, 1966; King *et al.*, 2012; Valentine & Strand, 1965.

III.1.1 Génome

Le génome des membres de la famille des *Leviviridae* est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive qui présente une organisation relativement simple. Sa taille est comprise entre 3,5 et 4,2 kb et il assure le codage de seulement quatre gènes, dont un diffère selon le genre **(Figure 7)**. Les trois gènes communs aux genres *Levivirus* et *Allolevivirus* codent :

- La protéine de maturation : également appelée protéine A, elle est le site d'interaction entre le phage et son récepteur situé au niveau des *pili* sexuels de la bactérie hôte.
- La protéine de capside : protéine majoritaire, elle est l'unité structurale de base de la capside.
- La réplicase : ARN polymérase ARN dépendante, elle est nécessaire à la réplication du génome viral au sein de la bactérie hôte.

Dans le cas des *Levivirus*, le dernier gène code une protéine impliquée dans la lyse bactérienne assurant la libération des virions après leur multiplication dans le cytoplasme bactérien. En ce qui concerne les membres du genre *Allolevivirus*, la lyse bactérienne est assurée par la protéine de maturation (Karnik & Billeter, 1983; Winter & Gold, 1983) et le 4ème gène code une protéine *read-through* qui est une extension de la protéine de capside **(Figure 7)** (King *et al.*, 2012; Klovins *et al.*, 2002).

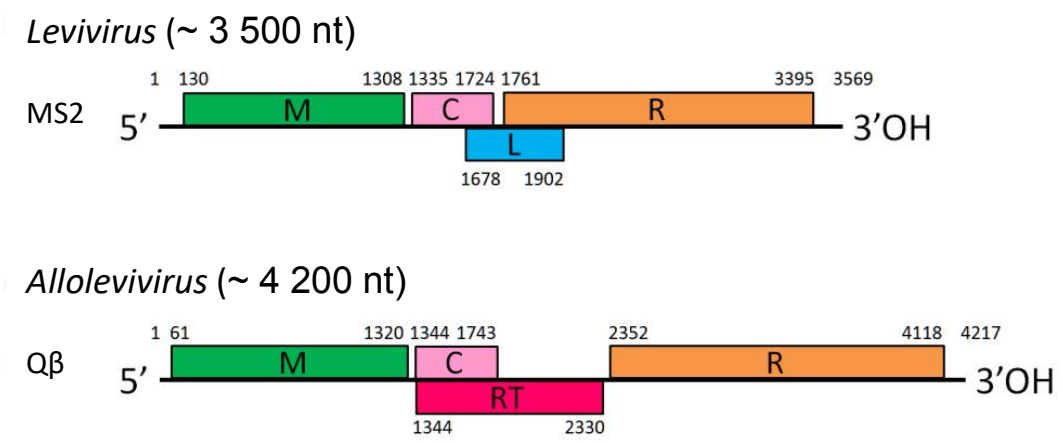

Figure 7 : Organisation du génome des bactériophages MS2 (*Levivirus*) et Qβ (*Allolevivirus*), adaptée de King *et al.*, 2011. M : gène de la protéine de maturation ; **C :** gène de la protéine de capside ; **R :** gène de la réplicase ; **L :** gène de la protéine de lyse ; **RT :** gène de la protéine *read-through*.

III.1.2 Capside

La capside des *Leviviridae* présente une structure icosaédrique ayant un nombre de triangulation T = 3, à 12 sommets et 20 faces. Cette enveloppe d'environ 2 nm d'épaisseur est composée essentiellement de protéines de capside dont la masse moléculaire est de 13,7 kDa dans le cas du bactériophage MS2 (Kuzmanovic *et al.*, 2003). Ces protéines peuvent présenter trois conformations (A, B et C) et s'assemblent deux à deux pour former des dimères A/B ou C/C. On a longtemps supposé que la structure icosaédrique de la capside s'organisait en 90 dimères (*i.e.* 60 dimères A/B et 30 dimères C/C), soit 180 copies de la protéine de capside **(Figure 8)**. Néanmoins, il apparaît qu'un exemplaire de la protéine de maturation est également présent au niveau de la capside, cette dernière étant indispensable à l'adhésion du virus au niveau des *pili* sexuels de la bactérie hôte. De récents travaux supposent alors que cette protéine de 44 kDa prendrait la position d'un dimère C/C et qu'elle serait donc associée à seulement 178 copies de la protéine de capside **(Figure 9)** (Dent *et al.*, 2013; Koning *et al.*, 2016; Rumnieks & Tars, 2017). Notons enfin que dans le cas particulier des *Allolevivirus*, certaines protéines de capside sont remplacées par des exemplaires de la protéine *read-through*, également impliquée dans le processus d'infection de la bactérie hôte.

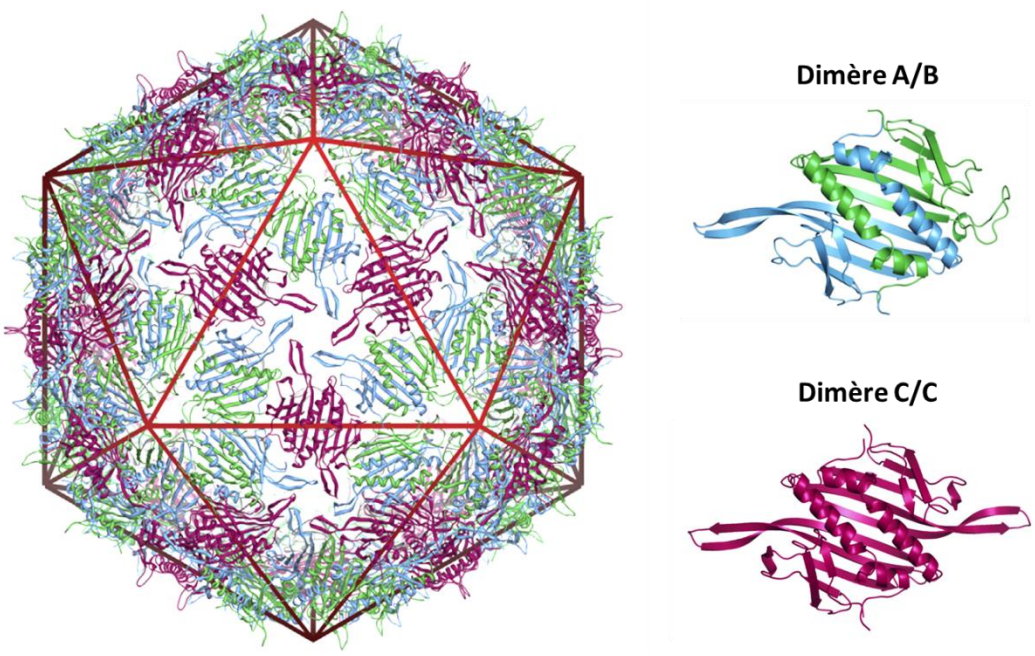

Figure 8 : Structure de la capside du bactériophage MS2, d'après Dent *et al.*, 2013; Toropova *et al.*, 2008. Les protéines de capside présentent trois conformations A(bleu), B (vert) et C (rose) et sont organisées en dimères A/B ou C/C. Dans cette représentation, l'assemblage de 60 dimères A/B et 30 C/C est proposé.

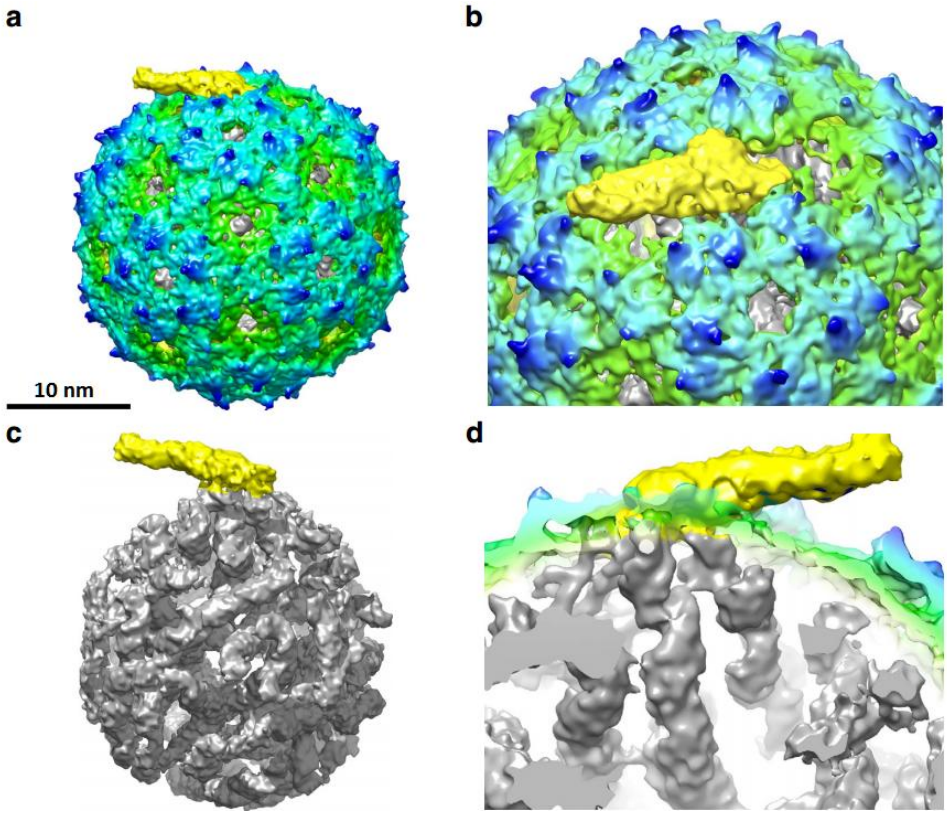

Figure 9 : Structure asymétrique de la capside du bactériophage MS2, d'après Koning *et al.*, 2016. a. et b. Protéine de maturation (jaune) associée aux protéines de capside (gradient bleu-vert). **c. et d.** La protéine de maturation est connectée au génome (gris) présent à l'intérieur de la capside.

III.1.3 Classification

Au sein des genres *Levivirus* et *Allolevivirus*, les FRNAPH sont également classés en quatre sous-groupes, initialement définis par des tests sérologiques (*i.e.* sérogroupes) (Furuse *et al.*, 1978) ou par l'étude de l'activité de la réplicase des virus (Haruna *et al.*, 1971; Miyake *et al.*, 1971). Cette classification a plus récemment été confirmée par des analyses phylogénétiques, permettant de définir quatre génogroupes **(Tableau XI)** (Bollback & Huelsenbeck, 2001). Ainsi, le genre *Levivirus* est constitué des génogroupes I et II (FRNAPH-I et -II), avec les phages MS2 et BZ13 désignés respectivement comme modèles tandis que le genre *Allolevivirus* est constitué des génogroupes III et IV (FRNAPH-III et -IV), représentés respectivement par le phage Qβ et le phage FI (Miyake *et al.*, 1969; Sakurai *et al.*, 1968).

D'un point de vue génétique, les FRNAPH-II se distinguent des FRNAPH-I par une délétion d'environ 60 nt au niveau de la région 3' non codante ainsi qu'une délétion de 35 nt au niveau du gène codant la réplicase. Concernant les FRNAPH-III, la différence majeure observée avec les FRNAPH-IV concerne une délétion d'environ 90 nt au niveau du gène codant la protéine de maturation (Bollback & Huelsenbeck, 2001).

Tableau XI : Classification des *Leviviridae* établie par le Comité International de Taxonomie des Virus (ictvonline.org)

Genre	Génogroupe	Espèce
Levivirus (11 espèces)	FRNAPH-I	*Enterobacteria phage f2* *Enterobacteria phage fr* *Enterobacteria phage JP501* *Enterobacteria phage M12* ***Enterobacteria phage MS2 **** *Enterobacteria phage R17*
	FRNAPH-II	***Enterobacteria phage BZ13 **** *Enterobacteria phage GA* *Enterobacteria phage JP34* *Enterobacteria phage KU1* *Enterobacteria phage TH1*
Allolevivirus (10 espèces)	FRNAPH-III	*Enterobacteria phage M11* ***Enterobacteria phage Qβ **** *Enterobacteria phage ST* *Enterobacteria phage TW18* *Enterobacteria phage VK*
	FRNAPH-IV	***Enterobacteria phage FI **** *Enterobacteria phage ID2* *Enterobacteria phage NL95* *Enterobacteria phage SP* *Enterobacteria phage TW28*
Non classés	34 espèces infectant *Caulobacter*, *Enterobacteria*, *Pseudomonas*	

***Phages prototypes**

NB : La section taxonomie du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) recense également *les phages ZR* (FRNAPH-I), *BO1*, *JP500*, *SD*, *TL2* (FRNAPH-II), *MX1* (FRNAPH-III) et *TW19* (FRNAPH-IV) en tant qu'espèces.

III.2 Méthodes de détection

III.2.1 Culture

Tout comme dans le cas des coliphages somatiques, la recherche des FRNAPH infectieux par culture est facilement réalisable et peu coûteuse. Leur détection est d'ailleurs l'objet aujourd'hui de différentes techniques normalisées, quantitatives ou non **(Figure 10)**, qui ont principalement été développées pour l'analyse des matrices hydriques (International Organization for Standardization, 2001a; US EPA, 2001a, 2001b). Des protocoles dérivés, adaptés à la recherche des phages infectieux dans des matrices plus complexes comme par exemple les coquillages, sont également disponibles (CEFAS, 2007; Doré *et al.*, 2003).

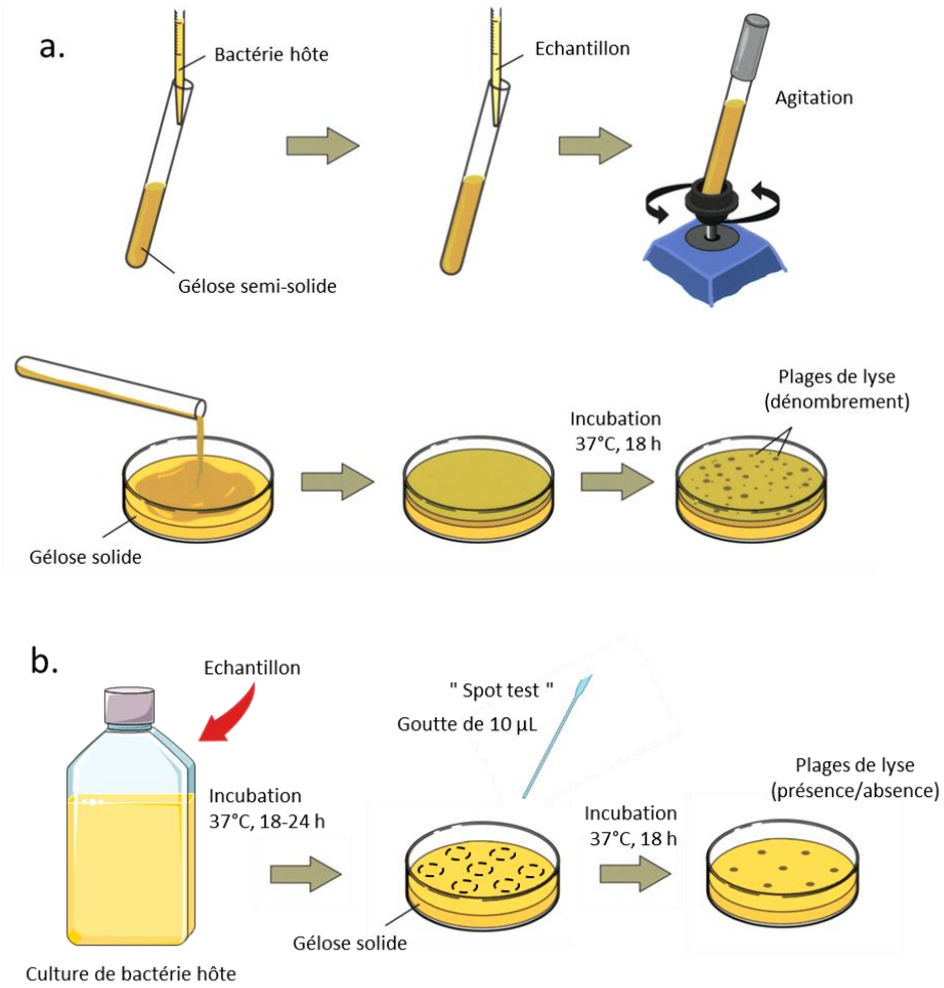

Figure 10 : Détection des bactériophages infectieux, adaptée de Gerba, 2009; Jofre *et al.*, 2016. a. Méthode quantitative : chaque plage de lyse traduit la présence initiale d'une particule infectieuse. **b. Méthode qualitative (*i.e.* spot test) :** la formation d'une plage de lyse traduit la présence de particules infectieuses dans la matrice analysée.

Brièvement, la détection des FRNAPH par culture consiste à rassembler dans un milieu nutritif l'échantillon que l'on souhaite analyser avec un inoculum de bactéries hôtes en phase de croissance exponentielle (*i.e.* associée à la synthèse maximale des *pili* sexuels). Après étalement sur une boîte de Pétri et incubation à 37°C pendant 18 h, la présence de phages infectieux va se traduire par l'apparition de plages de lyse dans le tapis bactérien. Dans le cas des techniques quantitatives, on considère alors que la formation d'une plage de lyse résulte de la présence initiale d'une particule infectieuse.

Afin de distinguer les FRNAPH des phages ADN F-spécifiques capables eux aussi d'infecter les bactéries produisant des *pili* sexuels, l'analyse en parallèle de l'échantillon en présence d'une RNase empêchant l'infection des phages à ARN est préconisée (International Organization for Standardization, 2001a). La quantité de FRNAPH est alors obtenue par soustraction. En pratique, les phages à ADN représenteraient environ 10 % des phages

F-spécifiques ; leur proportion est donc souvent considérée négligeable et cette étape apparaît alors superflue, coûteuse (Grabow, 2001; Haramoto *et al.*, 2012) et surtout, elle ne permet pas l'isolement des FRNAPH afin de mieux les caractériser.

Lors de la détection des phages infectieux, le choix de la bactérie utilisée comme hôte est primordial puisqu'il détermine la spécificité mais également la sensibilité de la technique. Les souches bactériennes *E. coli* HS(pFamp)R (ATCC#700891) et *Salmonella typhimurium* WG49 de type 3 Nal^r (F'42 lac::Tn5) (NCTC#12484 ou ATCC#700730) sont traditionnellement utilisées pour la détection des FRNAPH (International Organization for Standardization, 2001a; US EPA, 2001a, 2001b). Ces bactéries sont en effet capables de synthétiser les *pili* sexuels nécessaires au processus d'infection des FRNAPH mais sont peu, voire insensibles à l'infection par les coliphages somatiques. La souche *Salmonella typhimurium* WG49 a d'ailleurs été conçue dans ce but puisqu'elle résulte du transfert du plasmide F présent chez *E. coli* à une salmonelle afin de la rendre permissive aux FRNAPH. La délétion des gènes de pathogénicité a par ailleurs permis de disposer d'une souche adaptée au travail en laboratoire (Havelaar & Hogeboom, 1984).

A l'inverse, la recherche concomitante des coliphages somatiques et des FRNAPH est parfois souhaitée, dans le but par exemple d'avoir une indication plus globale du niveau de pollution microbiologique. Dans ce cas, la souche *E. coli* CB390 semble la plus adaptée (Agulló-Barceló *et al.*, 2016; Guzmán *et al.*, 2008; Jofre *et al.*, 2016).

Enfin, dans le but de rendre la détection plus rapide, des méthodes permettant d'observer plus précocement la lyse bactérienne par rapport aux techniques conventionnelles ont été mises au point. Dans ce cas, l'infection des bactéries hôtes par les phages présents dans un échantillon est réalisée dans en milieu liquide et la lyse bactérienne qui est associée à la libération des enzymes cytoplasmiques (*e.g.* β-galactosidase) est alors observée grâce à un substrat présent dans le milieu de culture qui formera un produit coloré visible en quelques heures (Ijzerman *et al.*, 1994, 1993; Jofre *et al.*, 2016; Salter *et al.*, 2010).

III.2.2 Biologie moléculaire

Les techniques de RT-PCR peuvent également être utilisées pour détecter, voire quantifier (*i.e.* RT-qPCR) les FRNAPH dans l'environnement. Ces approches semblent néanmoins moins fréquemment employées que la culture. Comme déjà abordé concernant la détection des virus entériques pathogènes, ces méthodes ne permettent pas de renseigner sur la présence de particules infectieuses, ce qui, selon la stratégie envisagée, représente un inconvénient majeur par rapport à la culture.

Ces approches fournissent néanmoins certains avantages puisqu'elles permettent par exemple de mieux caractériser les FRNAPH. En effet, compte tenu de leur diversité génétique, divers systèmes de PCR assurant la détection spécifique de chacun des quatre génogroupes de FRNAPH sont aujourd'hui disponibles (Dryden *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2011; Kirs & Smith, 2007; Ogorzaly & Gantzer, 2006; Wolf *et al.*, 2010, 2008). En l'absence de système de PCR capable de détecter l'ensemble des FRNAPH, leur concentration totale est d'ailleurs estimée en sommant les résultats obtenus lors de la recherche de chacun des génogroupes.

III.2.3 Typage des bactériophages ARN F-spécifiques

Historiquement, les premiers essais permettant de différencier les membres de chacun des groupes de FRNAPH étaient basés sur le sérotypage (Furuse *et al.*, 1983, 1978; Osawa *et al.*, 1981; Watanabe *et al.*, 1967). Brièvement, ces méthodes consistaient à cultiver un phage en présence d'un panel de sérums contenant des anticorps dirigés contre un sérogroupe donné. Selon le sérum utilisé, la neutralisation ou non du phage déterminait alors son appartenance à un sérogroupe. Ces techniques sérologiques restent globalement longues et fastidieuses et les résultats sont limités par la spécificité des anticorps utilisés (*e.g.* anti-MS2, anti-GA, anti-Qβ). Elles ont donc progressivement été remplacées par des approches génétiques à partir des années 1990 (Beekwilder *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1995). Dans ce cas, les phages isolés au préalable par culture sont transférés sur une membrane de nylon puis caractérisés après immersion dans une solution contenant des sondes oligonucléotidiques marquées, complémentaires de régions du génome spécifiques de chacun des génogroupes (*i.e.* hybridation *in situ*).

D'autres méthodes plus récemment décrites sont directement dérivées de ces deux approches. Vinjé *et al.* (2004) proposent par exemple une technique d'hybridation inverse, consistant à déposer sur une membrane préalablement fonctionnalisée par des sondes, des produits de RT-PCR spécifiques de chacun des genres *Levivirus* et *Allolevivirus*. Love *et al.* (2007) exploitent quant à eux à nouveau le typage sérologique, en mettant au point une technique d'agglutination utilisant des billes de latex sur lesquelles des anticorps spécifiques de chacun des sérogroupes sont greffés.

Face aux difficultés méthodologiques souvent associées à ces approches (Wolf *et al.*, 2008), les techniques de RT-PCR, voire de RT-qPCR sont aujourd'hui privilégiées lorsqu'il s'agit de typer les FRNAPH et de nombreux systèmes ont été développés dans ce but (Friedman *et al.*, 2011, 2009; Kirs & Smith, 2007; Ogorzaly & Gantzer, 2006; Vinjé *et al.*,

2004; Wolf *et al.*, 2010, 2008). Ces techniques sont aussi bien employées à la caractérisation de phages infectieux isolés par culture (Harwood *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2009; Mauffret *et al.*, 2012; Ogorzaly *et al.*, 2009; Ravva *et al.*, 2015) qu'à l'analyse directe d'une matrice environnementale après extraction des génomes qu'elle contient (Ogorzaly *et al.*, 2009; Vergara *et al.*, 2015; Wolf *et al.*, 2008).

Bien que le génotypage par RT-PCR semble donc aujourd'hui être la technique la plus fiable pour caractériser les FRNAPH, il est important de souligner que le design des couples d'amorces et des sondes utilisés reste toutefois établi à partir d'un nombre limité de séquences de phages disponibles dans les bases de données. La sensibilité de la technique mise en place est alors un paramètre extrêmement important à maîtriser (Haramoto *et al.*, 2012).

III.3 Utilisation des bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution dans l'environnement

Plusieurs arguments justifient la recherche des FRNAPH comme indicateurs de pollution dans l'environnement. Leur recherche est d'ailleurs envisagée ou déjà inclue dans la réglementation de différents pays concernant la surveillance des eaux souterraines (US EPA, 2006), des eaux récréatives (Lévesque & Gauvin, 2007; US EPA, 2016, 2015) ou pour évaluer la qualité microbiologique des coquillages (ASQAAC, 2016; FDA, 2015; ISSC, 2009). Cependant, certaines interrogations persistent encore quant à leur efficacité.

III.3.1 Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution fécale

Tout comme dans le cas des phages infectant *B. fragilis*, la prévalence des FRNAPH dans les selles est relativement faible. Lors de l'analyse de selles provenant de 90 individus, Grabow *et al.* (1995) ont par exemple détecté la présence de FRNAPH dans seulement 26 % des échantillons. De la même manière, Schaper *et al.* (2002b) isolent des FRNAPH chez seulement 10 % des individus. Cette faible prévalence constitue évidemment une limite non négligeable concernant leur utilisation en tant qu'indicateurs de pollution fécale et de manière plus générale, une prévalence chez l'Homme inférieure à 5 % est souvent rapportée dans la littérature, alors qu'elle semble plus importante chez l'animal (Calci *et al.*, 1998; Grabow *et al.*, 1995; Havelaar *et al.*, 1990; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Osawa *et al.*, 1981).

Il apparaît néanmoins qu'en dépit de leur faible distribution à l'échelle de l'individu, les FRNAPH sont particulièrement abondants dans les eaux souillées, quelle que soit leur nature. Les FRNAPH sont en effet massivement retrouvés dans les eaux usées domestiques, hospitalières ainsi que dans les eaux rejetées par les abattoirs dans le monde entier et à des concentrations moyennes de l'ordre 10^3 à 10^5 UFP/mL d'eaux usées brutes (Blanch *et al.*, 2006, 2004; Cole *et al.*, 2003; Debartolomeis & Cabelli, 1991; Gourmelon *et al.*, 2007; Havelaar *et al.*, 1990; Long *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 1998; Schaper *et al.*, 2002b; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006). Ils sont ensuite retrouvés dans les effluents de stations d'épuration ainsi que dans les eaux environnementales (*i.e.* rivières, eaux maritimes, eaux souterraines) à des concentrations généralement inférieures à 100 UFP/mL (Cole *et al.*, 2003; Contreras-Coll *et al.*, 2002; Haramoto *et al.*, 2012; Ibarluzea *et al.*, 2007; Lucena *et al.*, 2006, 2003; McMinn *et al.*, 2017; Skraber *et al.*, 2002). Leur concentration dans les eaux usées brutes reste donc inférieure à celle des coliphages somatiques mais surpasse largement celle des phages infectant *B. fragilis* (McMinn *et al.*, 2017).

Cette relative abondance des FRNAPH par rapport à ce qui est observé dans les selles n'est aujourd'hui pas totalement expliquée et suppose alors que ces derniers seraient capables de se multiplier en dehors du tractus digestif des animaux à sang chaud. Notons cependant que si une multiplication est envisageable dans certains environnements (*i.e.* station d'épuration), de nombreux arguments justifient qu'il soit peu probable qu'elle puisse avoir lieu dans le milieu naturel. Il apparaît en effet que la multiplication des phages n'est possible que lorsque leur bactérie hôte est présente à des concentrations relativement importantes (*i.e.* 10^4 unités formant colonies [UFC]/mL), et cette condition est rarement observée dans l'environnement (Wiggins & Alexander, 1985; Woody & Cliver, 1997). Woody & Cliver (1995) ont par ailleurs démontré que la synthèse des *pili* sexuels nécessaires à l'infection des bactéries par les FRNAPH nécessite des conditions de température bien particulières et que la réplication des FRNAPH n'est pas possible en dessous de 25°C. Enfin, la multiplication des phages dans l'environnement semble également compromise par la pauvreté nutritive du milieu (Woody & Cliver, 1997) et notamment par la faible concentration en cations divalents (*e.g.* Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}) qui favorisent grandement le processus d'infection des phages (IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991).

En considérant donc l'absence de synthèse des *pili* sexuels, la faible probabilité de rencontre entre les FRNAPH et leur bactérie hôte, ainsi que les paramètres physicochimiques défavorables, il semble aujourd'hui admis par la communauté scientifique que les FRNAPH ne peuvent pas se multiplier une fois rejetés dans le milieu naturel (Grabow, 2001; Jofre *et al.*, 2011). Leur présence traduit de ce fait une contamination fécale.

III.3.2 Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution virale

Comme abordé précédemment, les trois groupes de phages actuellement étudiés comme indicateurs viraux sont fréquemment isolés du tube digestif des animaux à sang chaud et/ou des eaux usées. Alors que la difficulté de cultiver les phages de *Bacteroides spp.* et leur faible prévalence sont deux points qui limitent leur utilisation, l'abondance des coliphages somatiques et la possibilité de les détecter de manière rapide constituent de réelles plus-values pour estimer la pollution virale dans les matrices hydriques.

Les FRNAPH sont cependant les seuls à présenter une structure similaire à celle des virus entériques pathogènes (Ackermann, 2007), ce qui suppose alors qu'ils seraient les modèles/indicateurs les plus adaptés au suivi de ce type de pollution (Grabow, 2001; Jofre, 2007).

III.3.2.1 Stabilité des FRNAPH dans l'environnement

L'origine fécale des FRNAPH étant bien établie, l'étape suivante pour valider l'utilisation de ces indicateurs est de vérifier s'ils présentent une persistance similaire, voire supérieure, à celle des virus entériques pathogènes dans l'environnement. Les connaissances concernant leur résistance face à différents types de stress sont donc essentielles, en particulier si on s'intéresse aux traitements classiquement appliqués aux eaux usées avant leur rejet dans l'environnement. Il en est de même concernant leur résistance à la chaleur et aux rayonnements UV, les deux paramètres majeurs en termes d'inactivation virale dans le milieu naturel.

Du fait de leur similarité structurale avec la majorité des virus entériques pathogènes, les FRNAPH ont souvent été utilisés comme modèles afin d'étudier le transport, l'adhésion mais aussi l'inactivation des virus dans le milieu hydrique (Fauvel *et al.*, 2017a, 2017b, 2016; Frohnert *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2014) ou au cours des procédés de désinfection utilisés en agroalimentaire (Brandsma *et al.*, 2012; Dawson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2015; Wengert *et al.*, 2017). De nombreuses données sont donc disponibles concernant leur stabilité face aux agents chimiques (*e.g.* chlore, ammoniums quaternaires, acide peracétique, ozone, dioxyde de titane) (Brion & Silverstein, 1999; Morin *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016; Syngouna & Chrysikopoulos, 2017; Zanetti *et al.*, 2007), à la chaleur (Bertrand *et al.*, 2012; Brié *et al.*, 2016; Mocé-llivina *et al.*, 2003), à la lumière du soleil (Carratalà *et al.*, 2013; Flannery *et al.*, 2013b), aux rayonnements UV (Beck *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017; Lee & Ko, 2013; Simonet & Gantzer, 2006), aux hautes pressions hydrostatiques (Guan *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2016)

et aux procédés utilisés pour le traitement des eaux (Amarasiri *et al.*, 2017; De Luca *et al.*, 2013; Haramoto *et al.*, 2015; Hata *et al.*, 2013; Marti *et al.*, 2011; Verbyla & Mihelcic, 2014).

Pour évaluer le potentiel des FRNAPH en tant qu'indicateurs de pollution virale, ces données doivent évidemment être comparées à celles concernant la stabilité des virus pathogènes dans les mêmes conditions. Notons cependant que la majorité des données aujourd'hui disponibles relatives à la stabilité des FRNAPH concerne leur inactivation (*i.e.* perte du caractère infectieux), tandis que la stabilité des virus entériques est généralement évaluée en suivant la dégradation de leurs génomes puisque ces derniers sont pour la plupart non cultivables. La meilleure stabilité des génomes qui a déjà été évoquée plus tôt constitue alors une limite non négligeable dans ce type de comparaison.

Afin de limiter les confusions dans la suite de ce document, le terme « inactivation » sera réservé à la perte du caractère infectieux des particules virales, le terme « dégradation » sera relatif aux génomes tandis que le terme « élimination » sera quant à lui réservé à la disparition physique des particules virales (*e.g.* adhésion à un support, élimination lors des procédés de filtration). Dans ce dernier cas, un parallèle pourra être fait entre la disparition des particules infectieuses et celle des génomes correspondants. De la même façon, la persistance plus importante des génomes oblige de préciser systématiquement le paramètre qui a été recherché dans ces différentes études comparatives. Aussi, le terme « génome » ou « infectieux » sera associé à chaque virus pathogène sauf dans le cas des NoV pour lesquels les méthodes de culture ne sont pas encore démocratisées (Ettayebi *et al.*, 2016) et qui sont donc obligatoirement recherchés par des méthodes moléculaires. Inversement, les FRNAPH étant dans la majorité des cas recherchés par des méthodes de culture, sans autres mentions c'est donc cette méthode qui aura été utilisée.

Malgré les difficultés d'interprétation mentionnées ci-dessus, certaines études ont néanmoins révélé le potentiel des phages en comparant leur inactivation à celle des entérovirus, des virus pathogènes cultivables connus pour leur stabilité dans le milieu naturel (Havelaar *et al.*, 1993; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991).

Par ailleurs, l'ensemble des travaux rapportés dans la littérature s'accorde à démontrer la meilleure persistance des FRNAPH par rapport aux indicateurs bactériens conventionnels tels que *E. coli* et les entérocoques (Jofre, 2007; Jofre *et al.*, 2016).

III.3.2.1.1 Comportement lors du traitement des eaux usées

Tout comme pour les FRNAPH, de nombreuses données sont disponibles concernant l'élimination des pathogènes lors du traitement des eaux usées, en particulier si on s'intéresse aux NoV (Campos *et al.*, 2016; Cheng *et al.*, 2012; Da Silva *et al.*, 2007; Katayama *et al.*, 2008; La Rosa *et al.*, 2010; van den Berg *et al.*, 2005).

L'épuration des eaux usées comporte en général un traitement primaire et secondaire, associés ou non à un traitement tertiaire. Ces différents procédés n'ont pas le même mode d'action sur les virus. Les traitements primaires (*e.g.* filtration, décantation) et le traitement biologique secondaire (*i.e.* adhésion aux flocs) sont en effet majoritairement responsables de l'élimination physique des particules virales, le suivi du comportement des virus via la recherche de leurs génomes ou de leur caractère infectieux est alors comparable. Certains traitements tertiaires (*e.g.* rayonnements UV, chloration, ozonation) sont quant à eux plutôt à l'origine de l'inactivation des virus, ce qui suppose dans ce cas la persistance plus importante de leurs génomes.

Dans ce contexte, l'élimination des FRNAPH infectieux et des NoV semble comparable uniquement en l'absence de traitement tertiaire. Dans ce cas, Pouillot *et al.* (2015) rapportent dans leur méta-analyse une élimination des FRNAPH infectieux de -2,4 ± 0,5 unités logarithmiques et des résultats très comparables sont observés pour les NoV (*i.e.* -2,5 ± 1,1 dans le cas des NoV du génogroupe GII).

De la même manière, dans une récente revue regroupant les données de 89 publications provenant de 25 pays, McMinn *et al.* (2017) rapportent des abattements respectifs pour les coliphages somatiques, les FRNAPH et les phages de *Bacteroides spp* de 1,46 ± 1,24, 1,46 ± 1,18 et 1,29 ± 1,33 unité logarithmique. Face à ces résultats et bien que ces données concernent également les situations dans lesquelles un traitement tertiaire est appliqué, les auteurs concluent que les trois types de bactériophages sont des modèles performants pour évaluer l'efficacité des traitements des eaux usées en termes d'élimination des virus. En effet, contrairement à ce qui est observé pour les indicateurs bactériens, aucune différence significative n'est constatée entre la disparition des phages et celle des virus entériques infectieux ou des NoV (*i.e.* -1,6 ± 0,93 unité logarithmique) **(Figure 11)**.

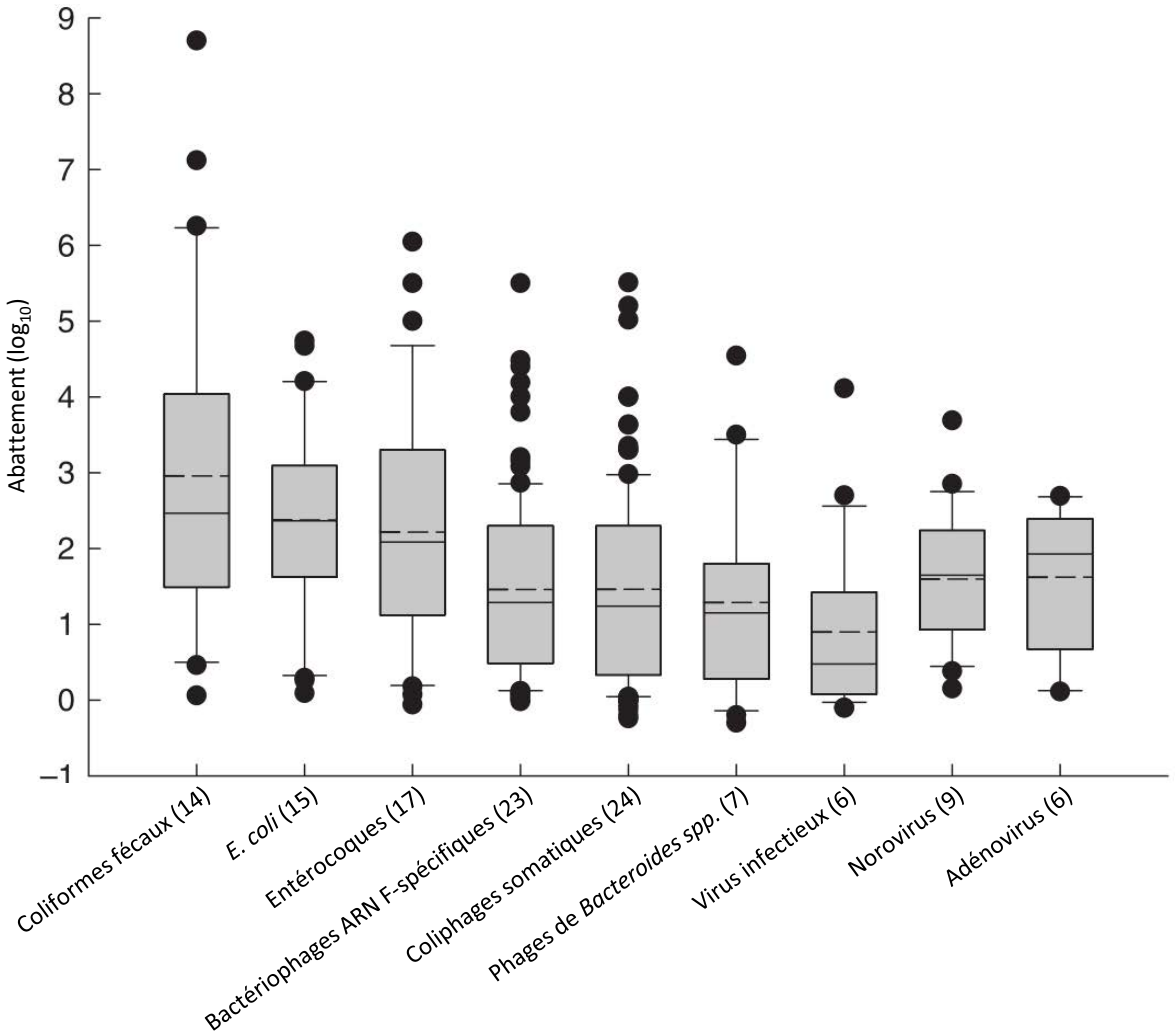

Figure 11 : Elimination de différents indicateurs et virus pathogènes lors de l'épuration des eaux usées, d'après McMinn *et al.* (2017). Les traits pleins figurant dans les diagrammes en boîte représentent l'abattement moyen tandis que les traits en pointillés représentent les valeurs médianes. Pour chacun des microorganismes, le nombre d'études pris en compte est indiqué entre parenthèses. Les virus infectieux font référence à ceux cultivés sur les lignées cellulaires BGM (*e.g.* entérovirus, reovirus), Caco-2 (*e.g.* astrovirus, entérovirus, reovirus) ou MA-104 (*e.g.* rotavirus).

Des abattements très variables sont cependant observés d'une étude à l'autre (Amarasiri *et al.*, 2017; Pouillot *et al.*, 2015) et comme évoqué plus tôt, ces variations sont principalement notées lorsque des procédés d'inactivation sont intégrés aux traitements des eaux (*i.e.* traitement tertiaire). A titre d'exemple, alors qu'un comportement similaire a globalement été observé par Pouillot *et al.* (2015) entre FRNAPH infectieux et NoV lors du traitement biologique, un abattement 10 fois supérieur est rapporté dans le cas des FRNAPH lorsqu'un traitement tertiaire utilisant des rayonnements UV est appliqué **(Tableau XII)**. Compte tenu du mécanisme d'action des UV et les différentes méthodes utilisées pour rechercher ces deux types de microorganismes (*i.e.* culture vs approches moléculaires), il n'est pas surprenant d'observer dans ce cas une diminution plus importante concernant les FRNAPH infectieux puisque, alors même que les rayonnements UV inactivent les virus en

provoquant des modifications au niveau de leurs génomes, la détection des courts fragments par les techniques moléculaires est toujours efficace (Pecson *et al.*, 2011; Simonet & Gantzer, 2006).

Tableau XII : Abattement des norovirus et des phages ARN F-spécifiques infectieux lors de l'épuration des eaux usées, en fonction du type de traitement tertiaire utilisé, d'après Pouillot *et al.* (2015).

Type de traitement tertiaire	Virus	Abattement (Log_{10})		
		Moyenne	Médiane	$IC_{95\%}$
Aucun	NoV GI	- 2,2	- 2,2	- 0,8 – - 3,7
	NoV GII	- 2,5	- 2,5	- 1,6 – - 3,4
	FRNAPH	- 2,4	- 2,4	- 1,9 – - 2,9
Chloration	NoV GI	- 2,4	- 2,4	- 1,1 – - 3,9
	NoV GII	- 2,7	- 2,7	- 1,9 – - 3,6
	FRNAPH	- 2,9	- 2,8	- 2,4 – - 3,4
Rayonnements UV	NoV GI	- 3,0	- 3,0	- 1,5 – - 4,6
	NoV GII	- 3,3	- 3,3	- 2,3 – - 4,4
	FRNAPH	- 4,3	- 4,3	- 3,7 – - 4,9

NB : les abattements sont calculés en recherchant les FRNAPH par culture (*i.e.* FRNAPH infectieux) tandis que les NoV sont détectés par RT-PCR (*i.e.* génomes viraux).

Notons enfin que lorsqu'il s'agit de comparer les résultats de ces différentes études, des disparités géographiques ou en lien avec la taille de la population et la concentration initiale des microorganismes dans les eaux usées brutes sont également relevées (Eftim *et al.*, 2017; Hewitt *et al.*, 2011; Pouillot *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc une élimination similaire entre les FRNAPH et les pathogènes lors du traitement biologique des eaux usées. Bien que la stricte comparaison du comportement des FRNAPH infectieux et des NoV ne semble pas envisageable en cas de traitement tertiaire, soulignons que les FRNAPH présentent une résistance particulière à ces différents procédés. En prenant comme référence le caractère infectieux, les FRNAPH figurent en effet parmi les virus à ARN les plus résistants aux UV, compte tenu de la faible taille de leur génome (Hijnen *et al.*, 2006; Simonet, 2007; Simonet & Gantzer, 2006). De la même manière, la résistance des FRNAPH à la chloration ou à l'ozonation est bien documentée, que ce soit en comparant leur inactivation à celle des virus entériques cultivables ou en comparant la dégradation de leurs génomes à celle des génomes des virus non cultivables (Durán *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 2013; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Shin *et al.*, 2003; Shin & Sobsey, 1998; Tree *et al.*, 2003).

III.3.2.1.2 Comportement dans les eaux environnementales

Une fois libérés dans l'environnement, la température et les rayonnements UV sont les deux principaux facteurs influençant la survie des microorganismes. Comme décrit précédemment, la résistance des FRNAPH aux UV ou plus largement à la lumière naturelle est bien documentée. Elles est par exemple supérieure à celle des coliphages somatiques (Costán-Longares *et al.*, 2008; Montemayor *et al.*, 2008) et le phage prototype MS2 est considéré aujourd'hui comme le meilleur modèle pour étudier l'effet des rayonnements UV sur les virus, que ce soit dans les eaux usées ou dans les eaux environnementales (Mattle *et al.*, 2015; Verbyla & Mihelcic, 2014).

Concernant l'effet de la température, la bonne stabilité des FRNAPH dans le milieu naturel est également bien documentée en dessous de 20°C, que ce soit dans les eaux usées (McMinn *et al.*, 2014; Mocé-llivina *et al.*, 2003), dans les eaux de surface (Long & Sobsey, 2004; Ravva & Sarreal, 2016; Skraber *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2016; Yang & Griffiths, 2013) ou encore dans les eaux souterraines (Ogorzaly *et al.*, 2010). Comme pour l'ensemble des microorganismes, leur stabilité diminue néanmoins au fur et à mesure que la température augmente, et dans ce cas, une résistance inférieure à celle d'autres microorganismes est parfois rapportée, suggérant alors leur limite en tant qu'indicateurs (Jofre *et al.*, 2016). En cas de températures plus importantes (*i.e.* > 50°C), une meilleure résistance des coliphages somatiques est par exemple notée (Bertrand *et al.*, 2012; Mocé-llivina *et al.*, 2003). A des températures plus proches de celles généralement relevées dans l'environnement, certains virus pathogènes recherchés par culture (*e.g.* astrovirus, poliovirus, adénovirus, VHA) semblent également présenter une meilleure résistance par rapport aux FRNAPH (Bertrand *et al.*, 2012). Ce phénomène est également rapporté pour *E. coli* puisque Allwood *et al.* (2003) vont jusqu'à noter une inactivation plus rapide du phage MS2 (*i.e.* T_{90} de 2,7 jours) par rapport à l'indicateur bactérien à 37°C. Dans l'environnement, les études de persistance révèlent également que durant la période estivale, la cinétique d'inactivation des FRNAPH est très proche de celle d'*E. coli* (*i.e.* T_{90} < 24 h), alors que la meilleure stabilité des coliphages somatiques et des phages de *Bacteroides spp.* est toujours observée (Durán *et al.*, 2002; Jofre *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces résultats suggèrent alors que la recherche des FRNAPH comme indicateurs viraux pourrait s'avérer moins pertinente dans certaines situations, en particulier dans les régions chaudes ou plus largement en période estivale lorsque les eaux de surface présentent une température élevée (Jofre *et al.*, 2016). Néanmoins, peu d'informations sont aujourd'hui disponibles concernant la température à partir de laquelle la chaleur devient le facteur d'inactivation majoritaire par rapport à l'effet des rayonnements UV.

En conclusion, si l'ensemble de ces données tend à démontrer que les FRNAPH miment de manière plus ou moins efficace le comportement des virus entériques dans l'environnement, leur plus-value par rapport aux indicateurs bactériens conventionnels est aujourd'hui largement admise (Jofre, 2007; Jofre *et al.*, 2016). Notons cependant que la plupart des études concernant leur stabilité sont menées en recherchant les phages infectieux dans leur globalité, sans distinction des quatre génogroupes. De la même manière, les études de persistance réalisées en laboratoire utilisent préférentiellement le phage prototype MS2. Or il est important de souligner ici que les différents génogroupes de FRNAPH sont caractérisés par des comportements très différents lors du traitement des eaux usées (Boudaud *et al.*, 2012; Haramoto *et al.*, 2015) mais également dans l'environnement (Long & Sobsey, 2004; Muniesa *et al.*, 2009; Ravva & Sarreal, 2016; Yang & Griffiths, 2013).

La recherche spécifique de certains génogroupes étant proposée pour discriminer l'origine d'une contamination fécale, les aspects concernant leur survie respective seront développés plus loin.

III.3.2.2 Corrélation avec les virus entériques pathogènes

Afin d'évaluer le potentiel des FRNAPH comme indicateurs de pollution virale, l'association entre ces indicateurs et les virus pathogènes a particulièrement été étudiée dans l'environnement que ce soit dans l'eau, mais également dans certaines matrices alimentaires comme les coquillages. Dans l'interprétation de ces résultats, il faut cependant tenir compte des mêmes considérations que précédemment exposées concernant la recherche du caractère infectieux des virus ou de leurs génomes.

III.3.2.2.1 Les bactériophages ARN F-spécifiques et les virus entériques pathogènes dans les eaux environnementales

En 1993, Havelaar *et al.* furent parmi les premiers auteurs à observer une corrélation entre la présence de FRNAPH infectieux et celle de virus entériques infectieux (*i.e.* entérovirus) dans les eaux environnementales. Les auteurs suggèrent alors que les FRNAPH seraient des indicateurs adaptés au suivi d'une pollution virale dans les eaux de surfaces (Havelaar *et al.*, 1993). Par la suite, plusieurs études ont permis de renforcer l'intérêt porté aujourd'hui à ces indicateurs. En 2001, Jiang *et al.* observent par exemple une association entre la présence des génomes d'adénovirus et celle des FRNAPH infectieux dans des eaux côtières aux États-Unis (Jiang *et al.*, 2001). De la même manière, Haramoto

et al., (2005) notent une corrélation avec les génomes de différents virus entériques humains dans une rivière japonaise et Ballester *et al.* (2005) soulignent une corrélation entre virus entériques infectieux et coliphages (*i.e.* coliphages somatiques et FRNAPH) en l'absence des indicateurs bactériens conventionnels. En 2010, Lodder *et al.*, notent également un lien entre les concentrations de FRNAPH et celles des entérovirus infectieux mesurées dans des eaux de sources utilisées pour la production d'eau de boisson aux Pays-Bas (Lodder *et al.*, 2010).

De manière plus exhaustive, une revue de Wu *et al.* (2011) permet de conclure que bien qu'aucun indicateur ne soit parfaitement corrélé avec la présence des pathogènes, les FRNAPH font partie des outils les plus intéressants pour évaluer la contamination des eaux environnementales. Dans cette revue incluant les données provenant de 540 études réalisées entre 1970 et 2009, les auteurs précisent que leurs conclusions tiennent compte à la fois du type de pathogène recherché dans chacune des études, du type d'eau analysée, de la taille de l'échantillonnage, de la méthode de détection, mais aussi des approches statistiques utilisées ainsi que l'année de publication. Enfin, plus récemment encore, Rezaeinejad *et al.* (2014) observent une corrélation entre la présence des FRNAPH et celle des NoV dans les eaux marines de Singapour.

A l'inverse, certaines études ont très tôt souligné l'absence de corrélation entre les FRNAPH et les virus entériques pathogènes dans l'environnement. En 2001, Grabow *et al.* remettent en cause l'utilisation des indicateurs bactériens mais aussi la recherche des indicateurs viraux par culture pour évaluer la qualité microbiologique des eaux, et cela au profit de la recherche des virus pathogènes par les techniques de biologie moléculaire qui semblent alors plus adaptées (Grabow *et al.*, 2001). Les auteurs en arrivent à cette conclusion car ils ne retrouvent aucun de ces indicateurs dans des échantillons d'eaux potables (n = 413), parmi lesquels 23 % sont positifs pour la recherche de virus entériques par RT-PCR (*i.e.* 17 % positifs pour la recherche d'entérovirus, 4 % pour la recherche d'adénovirus et 3 % pour la recherche du VHA). Il est cependant important de souligner ici qu'aucun virus infectieux n'a pu être isolé dans ces mêmes échantillons, ce qui limite alors fortement les conclusions quant à l'évaluation du risque sanitaire (AFSSA, 2007).

De la même façon, dans une récente revue regroupant les résultats des analyses de 1 155 eaux de surfaces, Jones *et al.* (2017) observent globalement une absence de corrélation entre la présence des FRNAPH infectieux et les génomes des NoV et des rotavirus.

Les résultats contradictoires de ces différentes études sont largement discutables aujourd'hui et plusieurs limites doivent être évoquées. La première concerne bien évidement

le fait que les bactériophages soient volontiers recherchés par culture tandis que la recherche des virus entériques est essentiellement réalisée par des approches moléculaires. Notons dans ce sens que l'absence de corrélation entre les coliphages somatiques et les génomes des virus entériques est également observée dans l'environnement (Borchardt *et al.*, 2004; Hot *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2007; Wyer *et al.*, 2012). Dans cette situation, le recours à des approches moléculaires pour rechercher les FRNAPH pourrait apporter de nouvelles informations permettant de discuter la corrélation ou non entre ces indicateurs et les virus entériques pathogènes. Dans deux récentes études, Vergara *et al.* (2015) et Arredondo-Hernandez *et al.* (2017) ont par exemple observé une corrélation entre la présence des génomes des FRNAPH (en particulier les FRNAPH-II) et celle des génomes des virus pathogènes (*i.e.* NoV, adénovirus, rotavirus, astrovirus) dans les eaux environnementales. Précisons par ailleurs que ces deux études ont été menées respectivement à Singapour et au Mexique, des régions dont le climat chaud pourrait être en défaveur de l'utilisation des FRNAPH.

Parmi les autres limites qui peuvent être avancées, rappelons également le fait que les phages soient excrétés aussi bien par l'Homme que par l'animal. Ce phénomène autorise alors la présence des phages en l'absence de virus entériques dans l'environnement mais ne justifie pas leur absence lorsque des virus entériques d'origine humaine sont détectés. Par ailleurs, d'autres limites méthodologiques doivent être considérées puisque des volumes d'eau différents sont généralement analysés lorsqu'il s'agit de rechercher les FRNAPH infectieux et les pathogènes, conduisant alors à des limites de détection très différentes qui impactent fortement l'établissement ou non d'une corrélation (Jofre *et al.*, 2016). Notons enfin que dans ce type d'étude, l'absence de corrélation entre les pathogènes eux-mêmes est fréquemment soulignée (Jiang *et al.*, 2007; Jofre *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2017; Wyn-Jones *et al.*, 2011).

III.3.2.2.2 Les bactériophages ARN F-spécifiques et les virus entériques pathogènes dans les coquillages

Que ce soit en termes de prévalence ou encore en termes de bioaccumulation et d'élimination lors des procédés de purification classiquement appliqués aux coquillages, le comportement des FRNAPH et celui des pathogènes (en particulier les NoV) est aujourd'hui très étudié. Les microorganismes présents dans les eaux environnementales étant majoritairement accumulés dans les coquillages au niveau de leur glandes digestives (Atmar *et al.*, 1996; Burkhardt & Calci, 2000; Schwab *et al.*, 1998), c'est ce tissu qui est préférentiellement analysé lorsqu'il s'agit de détecter les virus. A l'instar de ce qui est

observé dans les eaux environnementales, une revue réalisée par Hodgson *et al.* (2017) souligne qu'un certain nombre de travaux démontrent un lien entre la présence des NoV et celle des FRNAPH dans les coquillages, tandis que d'autres non.

- **Corrélation entre FRNAPH et norovirus dans les coquillages issus des zones conchylicoles**

Parmi les résultats les plus marquants, citons par exemple les travaux de Lowther *et al.* (2008), qui ont observé lors de l'échantillonnage de 168 lots de coquillages pendant 31 mois un lien entre la présence des FRNAPH infectieux et celle des NoV. Dans cette étude, alors que la catégorisation des échantillons basée sur la recherche d'*E. coli* n'a pas permis de renseigner sur la présence ou non des NoV, les auteurs remarquent que les concentrations du pathogène dans les coquillages contenant plus de 1 000 FRNAPH/100 g de CLI sont 40 fois supérieures à celles mesurées dans les lots qui en contiennent moins de 100. Dans une étude similaire, Flannery *et al.* (2009) observent le même schéma pendant plus de 2 ans lors de l'analyse de 167 lots de coquillages provenant de 17 zones conchylicoles **(Tableau XIII)**. Dans cette étude, 96 % des échantillons positifs pour la recherche des NoV le sont également pour la recherche des FRNAPH.

Tableau XIII : Prévalence des norovirus dans les coquillages selon leur niveau de pollution estimé par la recherche des bactériophages ARN F-spécifiques, d'après Flannery *et al.*, 2009; Lowther *et al.*, 2008.

Concentration en FRNAPH infectieux (UFP/100 g CLI)	Concentration en NoV (Unité de PCR)	Nombre d'échantillons positifs pour la détection des NoV (%)	Référence
< 100	6	21/68 (31)	Lowther *et al.*, 2008
100 - 999	22	36/54 (67)	
> 1 000	108	32/46 (70)	
<1 000	3.9	23/117 (20)	Flannery *et al.*, 2009
1 000 – 10 000	64.6	28/38 (74)	
> 10 000	874.5	11/12 (92)	

Plus récemment, plusieurs études menées aux États-Unis dans le cadre du « *National Shellfish Sanitation Program* » ont également évalué la prévalence des FRNAPH et celle des NoV dans les coquillages. Parmi 161 lots analysés, 41 % étaient positifs pour la recherche des NoV et une association avec les FRNAPH a été observée pour 94 % d'entre eux (FDA, 2015). Ce rapport précise que parmi les quatre lots négatifs pour la recherche de phages, les concentrations en NoV étaient à peine supérieures à la limite de détection pour trois d'entre

eux. En ce qui concerne le 4ème lot, les auteurs expliquent qu'il provenait d'une zone contaminée par les rejets d'une station d'épuration utilisant un système de désinfection tertiaire par rayonnements UV, et que de ce fait, la détection des génomes de NoV dans les coquillages ne correspondait vraisemblablement pas à la présence de particules infectieuses.

Comme évoqué plus tôt, un certain nombre d'études soulignent au contraire l'absence de corrélation entre les FRNAPH et les virus entériques pathogènes dans les coquillages. Croci *et al.* (2000) notent par exemple l'absence de phages dans des fruits de mer provenant d'une zone classée B, alors que ces derniers sont positifs pour la recherche du VHA et des entérovirus par culture.

De manière plus générale, le projet Fair-CT98-4039 a également entaché l'utilisation des FRNAPH comme indicateurs de pollution virale dans les coquillages (AFSSA, 2007; Formiga-Cruz *et al.*, 2003; Hernroth *et al.*, 2002; Muniain-Mujika *et al.*, 2003). Dans ce projet, Muniain-Mujika *et al.* (2003) rapportent lors de l'analyse de 60 lots de coquillages, l'absence de FRNAPH dans 15 échantillons positifs pour la recherche des génomes de virus entériques (*i.e.* adénovirus, entérovirus, VHA) tandis qu'une meilleure corrélation concernant la présence des phages de *B. fragilis* est notée. Toujours dans ce projet, l'analyse de 475 lots de coquillages suggère que si les bactériophages fécaux ainsi que *E. coli* sont des indicateurs corrélés à la présence des pathogènes en cas de contamination importante (Formiga-Cruz *et al.*, 2003), les FRNAPH sont fortement associés aux NoV mais une moins bonne corrélation est observée avec les génomes des autres virus pathogènes (*i.e.* VHA, adénovirus, entérovirus). Dans cette étude, la plupart des lots positifs pour la recherche des génomes des virus entériques qui proviennent de zones classées A ou ayant subi une purification sont en effet négatifs pour la recherche des FRNAPH.

Enfin, citons les travaux de Myrmel *et al.* (2004) qui rapportent lors de l'analyse de 696 lots de coquillages en Norvège la présence de FRNAPH dans seulement 43 % des lots positifs pour la recherche des NoV.

A l'instar des conclusions concernant l'analyse des matrices hydriques, la principale limite que l'on peut évoquer dans ces études concerne le fait que les NoV ou autres pathogènes soient principalement recherchés dans les coquillages par RT-PCR tandis que les FRNAPH sont détectés par culture. Il apparaît donc encore une fois qu'une certaine proportion des génomes de pathogènes détectés dans ces études ne correspond pas à la présence concomitante de particules infectieuses. Rappelons toutefois les observations de Croci *et al.* (2000) qui par la recherche des entérovirus et des VHA infectieux remettent en

cause l'utilisation des FRNAPH mais aussi des coliphages somatiques, des phages de *B. fragilis* et d'*E. coli* comme indicateurs de contamination virale dans les coquillages.

- **Accumulation et élimination des FRNAPH dans les coquillages**

Hormis le manque de corrélation plus ou moins discutable entre les pathogènes et les FRNAPH dans les coquillages issus des zones conchylicoles, le comportement particulier des NoV en termes d'accumulation et surtout leur persistance lors de la purification des coquillages conduit souvent à penser qu'aucun indicateur ne serait suffisamment performant pour évaluer leur présence. Cette hypothèse est largement renforcée si on évoque le possible rôle des ligands spécifiques des NoV dans les coquillages (Le Guyader *et al.*, 2012; Maalouf *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2006).

Certains arguments attestent néanmoins du potentiel des bactériophages fécaux, y compris des FRNAPH en tant qu'indicateurs viraux. Très tôt, Vaughn & Metcalf (1975) observent par exemple une meilleure accumulation et une rétention plus longue des coliphages comparées à celles des entérovirus dans les coquillages. De la même manière, Chung *et al.* notent la présence de FRNAPH dans des huîtres à des concentrations plus importantes que celles d'*E.coli* alors que dans les eaux environnantes, le rapport entre ces deux indicateurs est inversé (Chung *et al.*, 1998). Lucena *et al.* (1994) suggèrent cependant que les FRNAPH seraient moins pertinents comme indicateurs de pollution virale dans les coquillages car leur élimination demeure plus rapide que celle des coliphages somatiques ou des phages infectant *B. fragilis*.

En 2000, Burkhardt *et al.* s'intéressent précisément à l'accumulation de différents microorganismes dans les huîtres. Il apparaît dans cette étude que lorsque des coquillages sont placés dans de l'eau de mer contaminée par addition d'eaux usées (concentrations finales en coliformes totaux et en FRNAPH respectivement de 1 300 ± 150 nombre le plus probable [NPP] et 212 ± 37 UFP/100 mL), les concentrations en FRNAPH détectées dans les coquillages sont en moyenne 19 fois supérieures à celles mesurées dans l'eau (Burkhardt & Calci, 2000). Cette bioaccumulation est inversement proportionnelle à la température de l'eau et une hyperaccumulation est observée entre octobre et janvier, avec des concentrations dans les coquillages 49,9 ± 7,4 fois supérieures à celles de l'environnement et un pic atteignant des concentrations 99 fois supérieures est relevé. De manière assez intéressante, les auteurs soulignent alors que cette période d'hyperaccumulation est associée à la déclaration de la majorité des TIAC causées par les virus entériques en lien avec la consommation de coquillages. Enfin, aucune variation saisonnière n'est observée concernant l'accumulation d'autres microorganismes comme les

coliformes totaux ou *E. coli* (*i.e.* × 4,4 ± 0,5 et × 3,8 ± 0,5 respectivement). Doré *et al.* (2000) soulignent également une hyperaccumulation marquée des FRNAPH pendant la saison froide et ces résultats sont confirmés dans une étude comprenant l'analyse de 608 lots de coquillages collectés dans 49 zones conchylicoles (Doré *et al.*, 2003). Dans ces deux études, les auteurs observent également une accumulation plus restreinte d'*E. coli* et qui demeure constante au cours de l'année.

L'accumulation des microorganismes dans les coquillages est un phénomène relativement rapide puisqu'un équilibre des concentrations est généralement atteint en quelques jours, que ce soit pour les NoV, *E. coli* ou les FRNAPH (Araud *et al.*, 2016; Choi & Kingsley, 2016; Doré & Lees, 1995; Drouaz *et al.*, 2015; Humphrey & Martin, 1993; Olalemi *et al.*, 2016; Ueki *et al.*, 2007). Ce phénomène a particulièrement été illustré par Flannery *et al.* (2013a) qui ont suivi l'accumulation des NoV et des FRNAPH dans des huîtres impactées par le débordement des eaux usées d'une station d'épuration **(Figure 12)**. Dans cette étude, alors que des génomes de FRNAPH-II sont initialement détectés dans les coquillages suggérant une contamination antérieure (*i.e.* 1 130 cg/100 g de tissu), l'échantillonnage réalisé seulement 12 heures après l'incident révèle la présence de génomes de NoV du génogroupe GII et des FRNAPH-II infectieux à des concentrations respectives de 1 570 cg et 1 050 UFP/100 g de tissu, ainsi qu'une augmentation de la concentration en génomes de FRNAPH-II atteignant 3 890 cg/100 g de tissu. Aucune diminution significative n'a ensuite été observée durant les 72 heures suivantes pour l'ensemble de ces paramètres.

Dans cette étude, compte tenu de la proximité de la station d'épuration et de la rapidité avec laquelle les analyses ont été réalisées, on peut raisonnablement supposer qu'une grande proportion des génomes de NoV détectés dans les coquillages correspond à des particules infectieuses. Dans ce cas, même si les méthodes de détection utilisées sont différentes, les cinétiques d'accumulation des NoV et des FRNAPH peuvent alors être comparées et apparaissent très similaires.

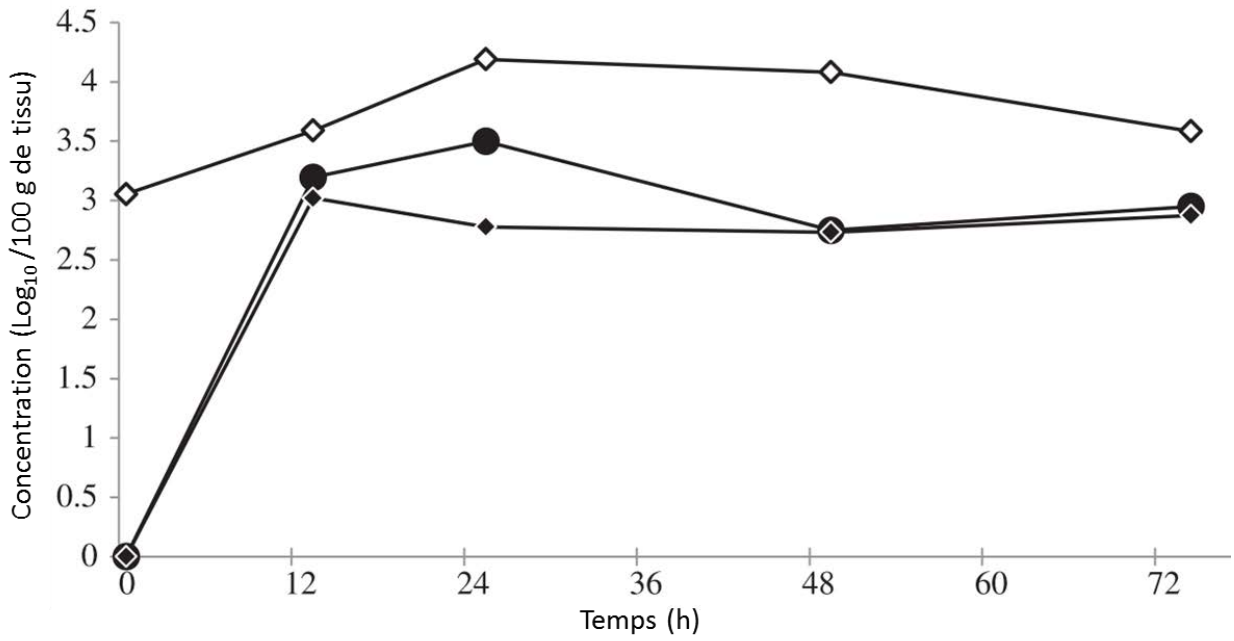

Figure 12 : Concentrations en FRNAPH-II (génomes ◇ et particules infectieuses ◆) et en norovirus du génogroupe GII (génomes ●) mesurées dans des huîtres impactées par le débordement d'un station d'épuration, d'après Flannery *et al.* (2013a).

Concernant cette fois la purification des coquillages, là encore, de nombreux arguments sont en faveur de l'utilisation des phages comme indicateurs viraux puisque très tôt, une meilleure persistance par rapport aux indicateurs bactériens conventionnels a pu être observée (de Mesquita *et al.*, 1991; Power & Collins, 1990). De Mesquita *et al.* (1991) observent par exemple, lors de la purification de moules naturellement contaminées, une diminution de 90 % de la concentration d'*E. coli* en moins de 48 heures, tandis que 25 à 60 jours sont nécessaires pour obtenir la même élimination dans le cas des FRNAPH infectieux. Doré & Lees (1995) observent également ce phénomène mais dans cette étude, les temps nécessaires pour obtenir un abattement d'une unité logarithmique sont significativement plus réduits (*i.e.* < 7 heures pour *E. coli* et 47,5 à 54,6 heures pour les FRNAPH).

Il apparaît donc que selon les études, les temps nécessaires à l'élimination des microorganismes des coquillages sont très variables **(Tableau XIV)** et les données sont donc difficilement comparables d'une étude à l'autre. La purification des coquillages dépend en effet de nombreux paramètres en lien notamment avec leur physiologie (*i.e.* débit de filtration variable selon la saison), la température, la salinité de l'eau, mais elle est également dépendante de la concentration initiale des microorganismes dans les tissus (Campos *et al.*, 2017; Lees, 2000; Olalemi *et al.*, 2016; Pommepuy *et al.*, 2003). En revanche, il semblerait

que la durée d'exposition des fruits de mer à la pollution n'influence pas la vitesse d'élimination des microorganismes lors de la purification (Doré & Lees, 1995; Humphrey & Martin, 1993).

Malgré cette forte variabilité, la meilleure persistance des FRNAPH infectieux comparée à celle d'*E. coli* dans les coquillages est aujourd'hui parfaitement établie. L'ensemble de ces travaux tend néanmoins à démontrer que les FRNAPH seraient plus rapidement éliminés des coquillages que les NoV, bien que les cinétiques de ces deux microorganismes n'aient rarement été directement comparées **(Tableau XIV)**.

Un projet initié par le CEFAS visant à évaluer l'efficacité de la purification des coquillages en y recherchant les NoV, les FRNAPH et *E. coli* résume parfaitement les conclusions de l'ensemble de ces études **(Figure 13)** (Neish, 2013). Ces résultats illustrent en effet la persistance intermédiaire des FRNAPH dans les coquillages par rapport à celle d'*E. coli* et des NoV. Dans ce rapport, alors que le possible rôle des ligands spécifiques qui favoriseraient la séquestration du pathogène dans les coquillages est évoqué (Le Guyader *et al.*, 2006b; Tian *et al.*, 2006), le biais lié à l'utilisation de techniques moléculaires pour le rechercher est également mentionné.

Il apparaît en effet que la disparition des FRNAPH infectieux lors de la purification des coquillages peut être liée à deux phénomènes qu'il conviendrait de distinguer, à savoir l'élimination physique des particules infectieuses ou leur inactivation au sein des fruits de mer. Si une élimination plus rapide des FRNAPH infectieux par rapport aux NoV infectieux est confirmée, leur intérêt en tant qu'indicateur viral serait alors compromis. Cette hypothèse n'est aujourd'hui pas vérifiable faute de méthode analytique permettant la détection des NoV infectieux. A l'inverse, si la persistance des NoV dans les coquillages est uniquement liée à la meilleure stabilité de leurs génomes par rapport à leur caractère infectieux, la recherche concomitante des génomes de FRNAPH apporterait alors de nouvelles informations concernant leur potentiel.

Tableau XIV : Cinétiques d'élimination des norovirus, FRNAPH et *E. coli* lors de la purification des coquillages. *Concentrations exprimées par gramme de tissus digestifs (hépatopancréas).

Matrice	Conditions	*E. coli*			FRNAPH			NoV			Référence
		C_0 (NPP/100 g tissu)	T_{90} (j)	T_{99} (j)	C_0 (UFP/100 g tissu)	T_{90} (j)	T_{99} (j)	C_0 (cg/g HP)	T_{90} (j)	T_{99} (j)	
	Conta. nat.										de Mesquita *et al.*, 1991
Moules	5°C	10^6	1,2	-	2×10^5	30-60	-				
	10°C	2×10^5	2	-	2×10^5	25-35	-				
	15°C	10^4	1-3	-	2×10^4	40-53	-				
	Conta. nat.										Humphrey & Martin, 1993
Huîtres	Eté	-	<7	-	-	10-14	-				
	Hiver	-	<3	<7	-	28	-				
	Conta. nat.										Doré & Lees, 1995
Huîtres	12°C	$1.8\text{-}4 \times 10^5$	0,3	1-2	$7\text{-}8 \times 10^4$	2,2-2,5	-				
Moules		$8\text{-}22 \times 10^4$	0,2	< 0,5	$5,5\text{-}12 \times 10^4$	1,7-2	-				
	Conta. nat.										Doré *et al.*, 1998
Huîtres	9°C				$3,4 \times 10^4$	>7	-				
	18°C					5	-				
	9°C				$2,8 \times 10^3$	2	-				
	18°C					1	5				
	Conta. nat.										Muniain-Mujika *et al.*, 2002
Moules	18°C	$3,5 \times 10^3$	<1	2	$7,5 \times 10^3$	2-3	4				
		$1,6 \times 10^4$	<1	<1	$2,6 \times 10^4$	2	3				
		6×10^2	1	>3	$7,3 \times 10^3$	2	>4				
	Conta. artif. (MS2)										Pommepuy *et al.*, 2003
Huîtres	8°C				$3,9 \times 10^4$*	8,6	-				
	18°C					6	-				
	22°C					3,8	-				
	Conta. nat.										
	12°C				$4\text{-}6 \times 10^1$*	20	-				
	20°C					6,2	-				
	25°C					4,7-5,5	-				
	Conta. artif. (MS2)										Loisy *et al.*, 2005b
Huîtres	22°C				$2,6 \times 10^3$	4	>7				
	Conta. artif. (GII.6)										Ueki *et al.*, 2007
Huîtres	10°C							$1,7\text{-}5,2 \times 10^3$	>10	-	
Huîtres	Conta. nat. (GII)										Doré *et al.*, 2010
	n.d.							$2,9 \times 10^3$	>17	-	
Huîtres	Conta. artif. (GI.1)										Drouaz *et al.*, 2015
	11°C							$1,4 \times 10^4$	28	>50	

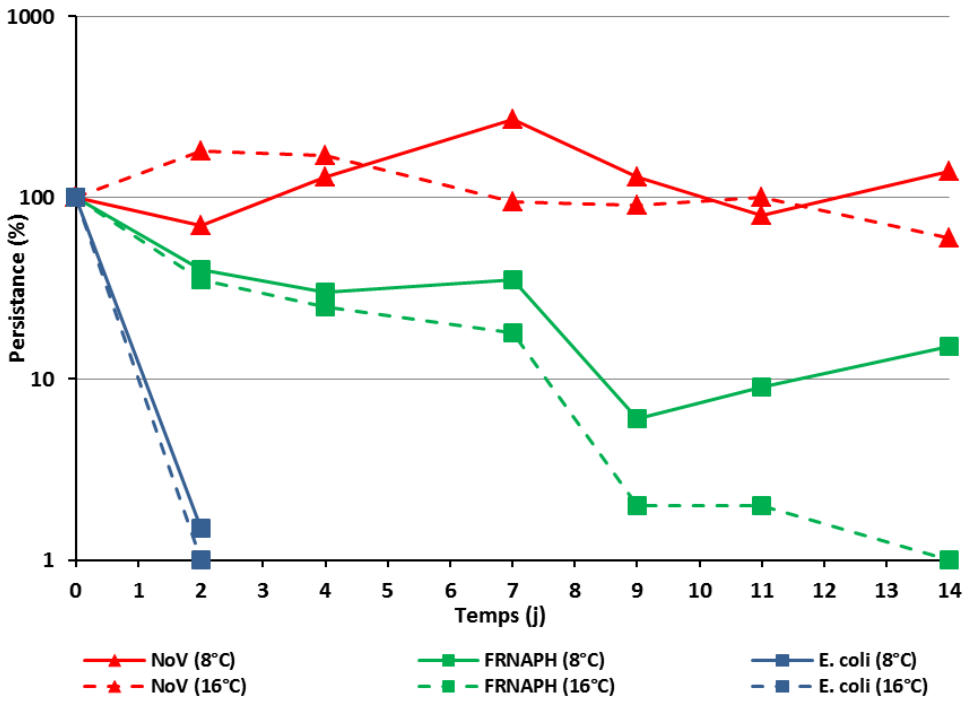

Figure 13 : Persistance des génomes de norovirus, des FRNAPH infectieux et d'*E. coli* lors de la purification des coquillages, d'après Neish, 2013.

III.3.2.3 Corrélation avec le danger viral pour l'Homme

Si de nombreuses études ont tenté de mieux préciser le potentiel des FRNAPH en tant qu'indicateurs de pollution fécale ou virale en étudiant leur corrélation avec les pathogènes dans l'environnement, très peu se sont intéressées au lien direct entre leur présence et le danger viral. Le nombre limité de données disponibles permet en effet actuellement une analyse quasi exhaustive de la littérature (Jofre *et al.*, 2016; US EPA, 2015).

La première étude de ce type a sans doute été celle conduite par von Schirnding *et al.* (1992) en Afrique du Sud. Au cours de cette étude, les auteurs ont évalué la prévalence des gastro-entérites chez 733 individus fréquentant deux plages dont les eaux étaient impactées par différents niveaux de pollution. Bien qu'aucune différence statistiquement significative n'ait pu être observée, les auteurs ont noté une fréquence des gastro-entérites plus importante chez les nageurs fréquentant la zone la plus polluée. En comparant ensuite différents paramètres microbiologiques des deux sites, les auteurs ont alors constaté des concentrations plus fortes en coliformes fécaux et en entérocoques dans la zone la plus polluée, mais aucune différence n'a pu être observée concernant les concentrations en phages infectieux (*i.e.* coliphages somatiques et FRNAPH).

Par la suite, d'autres études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence un lien étroit entre la présence des FRNAPH infectieux et le danger viral dans l'environnement. En Angleterre, Lee *et al.* (1997) observent par exemple dans une population de canoéistes (n = 473) un risque de gastro-entérite significativement associé à la densité de FRNAPH mesurée dans les eaux lors des activités récréatives. A l'inverse, aucune corrélation n'est observée avec les concentrations d'*E. coli* ou de streptocoques dans ces eaux. A partir d'une cohorte de près de 9 000 individus fréquentant une plage de Californie, Colford *et al.* (2007) observent également un lien significatif entre la fréquence des épisodes de gastro-entérites et les concentrations de FRNAPH infectieux mesurées au moment de la baignade. Wade *et al.* observent le même phénomène en étudiant une population de 6 350 individus fréquentant trois plages dans les états du Mississippi, de Rhode Island et d'Alabama (Benjamin-Chung *et al.*, 2017; Wade *et al.*, 2010). Il en est de même dans l'étude de Griffith *et al.* menée en Californie (n = 8 226 nageurs) (communication personnelle reprise dans US EPA, 2015) et celle réalisée par Sánchez-Nazario *et al.* (2014) aux abords de trois plages de Porto Rico (n = 641 individus).

Inversement, Medema *et al.* (1995) et van Asperen *et al.* (1998) n'observent aucun lien entre la présence des FRNAPH infectieux dans les eaux et le nombre de malades en étudiant respectivement deux cohortes de 314 et 827 triathlètes. Abdelzaher *et al.* (2011) vont quant à eux jusqu'à noter l'absence de FRNAPH dans les eaux maritimes d'un site pollué ayant servi de zone d'étude, où 31 cas de gastro-entérites ont pourtant été recensés parmi 652 nageurs (*i.e.* 1,7 fois plus que dans la population de non-nageurs). Dans cette étude, les auteurs soulignent toutefois que la non détection des FRNAPH serait vraisemblablement liée au faible volume d'eau analysé (*i.e.* 100 mL) en comparaison à l'étude menée par Colford *et al.* (2007) (*i.e.* 1 L).

Si l'on s'intéresse à présent au lien entre la présence des FRNAPH dans les fruits de mer et le danger pour le consommateur, plusieurs études font remarquer que la période d'hyperaccumulation des FRNAPH (*i.e.* hiver) correspond également à l'incidence la plus forte des gastro-entérites en lien avec leur consommation (Burkhardt & Calci, 2000; Doré *et al.*, 2000, 1998). L'ensemble de ces travaux ne souligne cependant qu'une tendance et la preuve formelle d'un lien entre la présence des FRNAPH dans les coquillages et le danger viral n'est actuellement pas démontrée. En effet, la plus forte prévalence des FRNAPH infectieux pourrait être uniquement liée à la meilleure stabilité de ces derniers pendant la période hivernale, qui indépendamment, est associée aux TIAC.

Très récemment, une étude visant à rechercher les FRNAPH infectieux dans 8 lots de coquillages à l'origine de TIAC causées par les NoV a été infructueuse pour 5 d'entre eux

(Woods *et al.*, 2016). Dans cette étude, alors que la contamination des 3 lots positifs est *a priori* liée aux rejets d'une station d'épuration et au relargage des eaux usées d'un bateau, les auteurs précisent que les autres lots ont vraisemblablement été impactés par une source de contamination ponctuelle. Par ailleurs, on peut remettre en question la méthode de détection utilisée ici pour la recherche des FRNAPH infectieux (Cabelli, 1988), puisque celle-ci est appliquée aux coquillages entiers et manque donc de sensibilité. Notons enfin que dans cette étude, la présence des pathogènes eux-mêmes dans les coquillages a parfois été difficile à démontrer. Ce phénomène est également observé dans les études réalisées sur les eaux environnementales (Abdelzaher *et al.*, 2011; Colford *et al.*, 2007; Jofre *et al.*, 2016).

III.3.3 Les bactériophages ARN F-spécifiques pour discriminer l'origine d'une contamination fécale

En plus de leur potentiel pour évaluer le comportement des virus entériques dans l'environnement, la dernière plus-value actuellement attribuée aux FRNAPH concerne la discrimination de l'origine d'une contamination fécale. Cette information paraît aujourd'hui essentielle et en lien direct avec la gestion du danger viral puisque sauf rares exceptions (*e.g.* virus de l'hépatite E), les virus pathogènes pour l'Homme contaminant le milieu naturel ont préférentiellement une origine humaine.

Les premières données concernant le potentiel des FRNAPH pour déterminer l'origine d'une contamination fécale datent du début des années 1980. A cette période, différents travaux réalisés principalement en Asie ont souligné que la distribution des quatre génogroupes de FRNAPH était différente selon l'hôte considéré (Furuse *et al.*, 1983, 1981, 1978; Osawa *et al.*, 1981). Il apparaît en effet que les FRNAPH-I et -IV sont majoritairement hébergés par l'animal tandis que les FRNAPH-II et -III sont préférentiellement présents chez l'Homme **(Tableau XV)**. Cette distribution a depuis été observée dans les selles et les eaux usées du monde entier (Blanch *et al.*, 2006; Schaper *et al.*, 2002b) et est aujourd'hui largement admise par la communauté scientifique, si bien que les FRNAPH sont régulièrement employés pour connaitre l'origine de la contamination fécale d'eaux usées (Lee *et al.*, 2009; Yahya *et al.*, 2015), d'eaux de surface (Haramoto *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Ogorzaly *et al.*, 2009; Ravva *et al.*, 2015), de coquillages (Mieszkin *et al.*, 2013; Wolf *et al.*, 2010), de sédiments (Haramoto *et al.*, 2009) ou de végétaux (Shahrampour *et al.*, 2015; Yazdi *et al.*, 2017).

Tableau XV : Distribution des quatre génogroupes de FRNAPH chez l'Homme et l'animal.

Origine des échantillons		FRNAPH isolés	Répartition des FRNAPH (%)					Référence
			-I	-II	-III	-IV	ND	
Humains								
Selles	n = 2	20	0	90	10	0	-	Schaper *et al.*, 2002
Eaux usées	n = 11	110	6	28	66	0	-	Schaper *et al.*, 2002
d'hôpital	n = 6	374	6	42	52	0	-	
	n = 8	1244	8	31	60	1	-	
Eaux usées	n = 50	1832	12	27	61	0		Furuse *et al.*, 1981
de station	n = 7	70	51	46	3	0	-	Schaper *et al.*, 2002
d'épuration	n = 5	50	28	72	0	0	-	
	n = 24	165	29	70	1	0	-	
	n = 7	559	33	43	22	2	-	
	n = 7	390	31	42	24	3	-	
	n = 23	1985	12	44	42	3	-	
	n = 5	538	2	61	35	2	-	
	n = 6	451	5	39	51	5	-	
	n = 6	527	27	40	30	3	-	
	-	65	8	46	23	4	19	Long *et al.*, 2005
	-	26	4	53	19	0	24	Cole *et al.*, 2003
	n = 55	105	72	11	0	2	14	
	n = 12	83	7	40	48	5	-	Blanch *et al.*, 2004
	n = 10	133	11	14	73	0	2	Stewart-Pullaro *et al.*, 2006
	n = 11	38	26	32	42	0	-	Lee *et al.*, 2009
Moyenne échantillons humains			14,5	**38,5**	**44,8**	**1,8**	**0,4**	
Bovins								
Selles	n = 14	90	100	0	0	0	-	Schaper *et al.*, 2002
	n = 2	27	17	13	0	70	-	
	n = 12	1	100	0	0	0	-	Lee *et al.*, 2009
Lisier	n = 2	32	5	18	13	64	-	Schaper *et al.*, 2002
	n = 17	12	33	17	0	33	17	Cole *et al.*, 2003
Abattoir	n = 9	95	100	0	0	0	-	Schaper *et al.*, 2002
Eaux usées	n = 34	20	70	10	5	0	15	Cole *et al.*, 2003
	n = 4	31	100	0	0	0	-	Long *et al.*, 2005
Porcins								
Selles	n = 4	157	2	1	0	97	-	Schaper *et al.*, 2002
	n = 33	64	53	28	0	19	-	
	n = 8	33	100	0	0	0	-	Lee *et al.*, 2009
Lisier	n = 9	322	47	24	2	27	-	Schaper *et al.*, 2002
	n = 11	57	53	5	24	18	-	
	n = 2	36	19	0	0	56	25	Lee *et al.*, 2009
Abattoir	n = 5	629	75	2	18	5	-	Schaper *et al.*, 2002
Eaux usées	n = 14	49	59	2	33	6	-	Long *et al.*, 2005
Oiseaux								
Fientes	n = 2	24	4	0	0	96	-	Cole *et al.*, 2003
	n = 14	46	80	0	0	20	-	Schaper *et al.*, 2002
	n = 5	350	72	7	1	20	-	
	n = 7	94	51	0	0	49	-	Stewart-Pullaro *et al.*, 2006
	n = 7	5	0	0	0	100	-	Lee *et al.*, 2009
	n = 2	20	90	5	0	5	-	
Abattoir	n = 6	917	18	1	9	72	-	Schaper *et al.*, 2002
Mélange animaux								
Abattoir	n = 6	802	86	7	3	4	-	Schaper *et al.*, 2002
Eaux usées	n = 12	71	34	12	28	26	-	Blanch *et al.*, 2004
Moyenne échantillons animaux			**56,1**	**5,7**	**7,1**	**30,7**	**0,4**	

D'un point de vue pratique, bien que la recherche des différents génogroupes de FRNAPH puisse être considérée comme une approche bibliothèque-dépendante, la simplicité de cette bibliothèque fait que cette technique est généralement apparentée aux méthodes bibliothèque-indépendantes (Stoeckel & Harwood, 2007; USEPA, 2005). En plus de sa simplicité, la recherche des FRNAPH figurent généralement parmi les approches les plus efficaces pour déterminer l'origine de la contamination des eaux environnementales lors d'essais réalisés en aveugle ou non (Blanch *et al.*, 2006; Griffith *et al.*, 2003; Harwood *et al.*, 2013; Noble *et al.*, 2003).

Notons cependant que comme l'ensemble des techniques de *« Microbial Source Tracking »*, la recherche des génogroupes de FRNAPH ne permet pas systématiquement de déterminer l'origine d'une contamination **(Tableau XV)**. Par exemple, dans l'étude réalisée par Blanch *et al.* (2004), les auteurs observent logiquement la forte prévalence des FRNAPH-II et -III dans les échantillons contaminés par l'Homme, mais ces deux génogroupes sont également majoritaires dans 27 % des matrices contaminées par l'animal. De manière similaire dans une seconde étude réalisée par les mêmes auteurs, si une distribution différente des FRNAPH-I, -II et -IV est observée selon l'origine de la contamination, les proportions de FRNAPH-III détectées dans les échantillons humains et animaux sont significativement identiques. Dans cette dernière étude, la distribution des quatre génogroupes telle qu'elle a été initialement décrite dans la littérature n'est alors observée que dans 65 % des échantillons analysés (Blanch *et al.*, 2006).

La répartition non absolue des différents génogroupes est évidemment problématique lorsqu'elle est observée dans la source de pollution fécale (*e.g.* selles, eaux usées) mais ce phénomène est encore plus accentué dans l'environnement. En effet, une autre limite fréquemment associée aux FRNAPH concerne la survie variable des différents génogroupes conduisant alors à une modification de leur répartition originale, en particulier en cas de contamination ancienne et/ou mixte.

Il est en effet parfaitement documenté que les FRNAPH-I suivis des FRNAPH-II présentent une bien meilleure résistance par rapport aux autres génogroupes, que ce soit face aux pH extrêmes, à la chaleur, à la salinité de l'eau ou aux agents chimiques utilisés pour la désinfection (*i.e.* chloration, ammoniac) (Schaper *et al.*, 2002a). De la même façon, les FRNAPH-IV sont fréquemment décrits comme étant les plus fragiles. Brion *et al.* (2002) observent par exemple que dans une eau de surface placée à 25°C à l'obscurité, la concentration du phage SP (FRNAPH-IV) décroît de 8 unités logarithmiques en 4 jours. De manière assez étonnante, le phage MS2 (FRNAPH-I) généralement présenté comme particulièrement résistant a montré une stabilité inférieure à celle des phages prototypes GA

(FRNAPH-II) et Qβ (FRNAPH-III) dans les mêmes conditions. L'étude de souches sauvages a également permis aux auteurs de démontrer des survies variables au sein d'un même génogroupe, et les FRNAPH-I et -II sauvages sont apparus comme les plus résistants. La meilleure stabilité de ces deux génogroupes a été confirmée dans l'environnement par Muniesa *et al.* (2009) lors d'essais *in situ* réalisés dans des eaux douces et des eaux de mer, et ce phénomène est également observé lors du traitement des eaux usées qui s'avère bien plus efficace pour éliminer les FRNAPH-III et -IV (Haramoto *et al.*, 2015; Muniesa *et al.*, 2009).

L'influence des paramètres environnementaux sur la distribution des FRNAPH est donc un paramètre important à considérer (Haramoto *et al.*, 2015; Muniesa *et al.*, 2009; Yang & Griffiths, 2013) et explique que les FRNAPH-I soient fréquemment retrouvés dans le milieu naturel, même en cas de pollution d'origine humaine (Cole *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 2016; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006).

2ème PARTIE

Peut-on utiliser les FRNAPH comme indicateurs de pollution virale dans les principales sources de contamination de l'environnement ?

Les résultats présentés dans cette partie s'intéressent à trois aspects fondamentaux de l'utilisation des FRNAPH comme indicateurs de contamination fécale dans les eaux et les coquillages. Le premier point concerne leur capacité à discriminer l'origine humaine et animale de la pollution fécale. Le deuxième vise à estimer si la survie des différents génogroupes est compatible avec leur utilisation en tant qu'indicateurs de pollution. Enfin le troisième aspect a pour objectif de vérifier si la concentration de ces indicateurs est toujours supérieure à celle des virus pathogènes dans les sources de pollution fécale (*i.e.* eaux usées) et ceci même en période épidémique.

Les deux premiers points ont fait l'objet d'un article scientifique paru dans *Applied and Environmental Microbiology* qui est joint (Hartard *et al.*, 2015). Concernant le dernier aspect, les résultats obtenus seront spécifiquement détaillés.

I. PEUT-ON UTILISER LES FRNAPH POUR IDENTIFIER LES CONTAMINATIONS FECALES D'ORIGINE HUMAINE ?

Dans le contexte précédemment décrit, le premier objectif de ce travail a été d'évaluer dans quelle mesure le génotypage des FRNAPH permettait de discriminer l'origine d'une contamination fécale et plus précisément, si cette approche pouvait être employée pour identifier les contaminations d'origine humaine.

Dans ce but, des FRNAPH ont été isolés par la méthode des plages de lyse afin d'être caractérisés, et cela à partir de différents types d'échantillons dont l'origine de la contamination fécale était connue (*i.e.* contamination humaine ou animale). Concernant les échantillons contaminés par l'Homme, les investigations ont porté sur l'analyse d'eaux usées brutes (n = 6) prélevées à l'entrée de stations d'épuration urbaines ainsi que les effluents d'eaux usées traitées (n = 2) prélevés avant leur rejet dans l'environnement. Concernant les échantillons contaminés par l'animal, les analyses ont été effectuées sur des eaux usées provenant d'un abattoir de bovins (n = 4), d'un abattoir de porcins (n = 4) et sur des selles fraiches de bovins (n = 10), porcins (n = 8), ovins (n = 9), équins (n = 10), gallinacés (n = 5) et anatidés (n = 5). Les différents protocoles utilisés et les résultats correspondants à cette étude sont présentés en détail dans la publication (Hartard *et al.*, 2015).

Comme fréquemment décrit dans la littérature, la prévalence des FRNAPH infectieux dans les selles analysées est globalement faible par rapport aux exigences que l'on peut attendre d'un indicateur de pollution fécale. En fonction de l'hôte, la fréquence d'échantillons

positifs varie de 0 à 40 % dans cette étude. A l'inverse, la totalité des échantillons d'eaux usées sont positifs, qu'ils proviennent des stations d'épuration urbaines ou des abattoirs.

Lors du titrage des différents échantillons, 376 plages de lyse ont été isolées dans le but de déterminer la répartition des différents génogroupes de FRNAPH. Le génotypage des plages de lyse a été effectué en utilisant le système de RT-PCR proposé par Wolf *et al.* (2010), basé sur l'utilisation d'amorces/sondes au design relativement récent, et qui plus est, permet une caractérisation optimisée des plages grâce au multiplexage. Parmi l'ensemble des plages de lyse analysées, 91,2 % (n = 343) ont fourni un résultat positif concernant leur appartenance à un génogroupe de FRNAPH. Le système utilisé ici a donc permis de caractériser efficacement la grande majorité des plages de lyse et de ce fait, d'avoir une idée précise de la répartition des différents génogroupes dans les matrices analysées **(Tableau XVI)**. Les plages de lyse non caractérisées peuvent correspondre quant à elles à des phages ADN F-spécifiques, d'autres phages capables d'infecter la bactérie utilisée comme hôte (*i.e.* phage de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium), ou encore des FRNAPH non reconnus par les amorces et sondes utilisées ici.

Tableau XVI : Génotypage des FRNAPH isolés par culture à partir de différents types de matrices dont l'origine de la contamination fécale est connue.

		Génotypage RT-qPCR (Wolf *et al.*, 2010)			
Origine	n	**FRNAPH-I**	**FRNAPH-II**	**FRNAPH-III**	**FRNAPH-IV**
Humaine					
Eaux usées brutes	6		**++**	**+++**	
Eaux usées traitées	2	**++**	**+**		
Animale					
Selles	47	**+++**	**+**		
Abattoir porcin	4	**+++**			**+**
Abattoir bovin	4			**+++**	

Dans les eaux usées brutes urbaines, la détection quasi exclusive des FRNAPH-II et -III confirme le potentiel de ces deux génogroupes à identifier une pollution d'origine humaine. De la même manière, les FRNAPH-I souvent décrits comme étant spécifiques de l'animal sont très fréquents dans les selles des divers animaux, ainsi que dans les eaux usées de l'abattoir de porcins.

Certains résultats sont cependant en contradiction avec le schéma classiquement observé dans les études à l'origine de l'intérêt porté aux FRNAPH pour discriminer l'origine d'une

contamination. En effet, contrairement à ce qui est observé dans les eaux usées brutes, les effluents des stations d'épuration urbaines analysés dans l'étude contiennent principalement des FRNAPH-I bien qu'une faible proportion de FRNAPH-II soit toujours détectée (14 % de l'ensemble des FRNAPH isolés). De la même manière parmi l'ensemble des échantillons de selles animales analysé, un échantillon provenant d'anatidé contenait principalement des FRNAPH-II (69 % des FRNAPH isolés). Enfin, parmi les 103 FRNAPH isolés à partir des eaux usées de l'abattoir de bovins, 97 % étaient des FRNAPH-III. Contrairement à l'analyse des échantillons individuels de selles, l'étude de ce type de matrice est particulièrement intéressante puisqu'elle permet d'avoir une estimation plus homogène de la présence de ces microorganismes chez un hôte donné. Dans ce cas précis, l'abattoir qui a été échantillonné procède à l'abattage quotidien de 250 bovins provenant d'une vaste région géographique et la collecte des différents échantillons a été effectuée pendant une période s'étalant sur 6 mois. Il semble donc ici que la présence des FRNAPH-III dans les eaux de cette structure ne soit pas un phénomène anecdotique.

Face à ces résultats, il apparaît donc que le génotypage des FRNAPH tel qu'il est parfois envisagé ne permet pas systématiquement de déterminer l'origine d'une pollution. En plus de la répartition initiale des différents génogroupes de FRNAPH qui déroge parfois au schéma classiquement observé dans la littérature, les différences de stabilité de chacun d'entre eux doivent être considérées. En effet, dans le cas des contaminations d'origine humaine, bien que les FRNAPH-II et -III soient effectivement majoritaires dans les eaux usées brutes, ce type de pollution est finalement essentiellement associé au relargage dans le milieu naturel des FRNAPH-I présents dans les eaux usées traitées. Ce génogroupe perd alors tout son intérêt lorsqu'il s'agit de discriminer l'origine d'une contamination.

Pour progresser sur la capacité des FRNAPH à discriminer l'origine d'une contamination fécale, les souches isolées des différents échantillons ont été séquencées afin de déterminer si des singularités en lien avec leur origine pouvaient être observées. Pour ce faire, une stratégie en deux phases a été adoptée. Dans un premier temps, le séquençage d'un panel représentatif de FRNAPH-I isolés des échantillons animaux et de FRNAPH-II et -III d'origine humaine a été entrepris. Dans un second temps, la plupart des souches de FRNAPH dont la distribution était « atypique » (*i.e.* FRNAPH-I isolés chez l'Homme et FRNAPH-II et -III provenant des matrices polluées par l'animal) ont été séquencées. L'analyse a porté sur le gène codant la protéine de maturation puisqu'il s'agit de la partie du génome qui présente la plus forte variabilité (Friedman *et al.*, 2009b). Du fait de la rareté des FRNAPH-IV, ce travail n'a pas été entrepris pour ce génogroupe.

L'analyse phylogénétique des FRNAPH-II (n = 70) a permis d'observer un regroupement des souches humaines dans différents clades, dont certains étaient très proches génétiquement du phage prototype GA. Concernant les FRNAPH d'origine animale, toutes les souches (n = 8) ont été isolées d'un même échantillon de selles d'anatidés et sont groupées dans un unique clade robuste, bien distinct des souches humaines.

Concernant l'analyse des FRNAPH-III (n = 92), les souches d'origine humaine sont également regroupées dans plusieurs clades et présentent un pourcentage d'homologie de 85,3 % ± 14,7 %. Un des clades comprend la majorité de ces souches (n = 34) et contient également la majorité des souches qui étaient déjà disponibles dans la base de données GenBank. L'ensemble des FRNAPH-III animaux séquencés (n = 42) était isolé des eaux usées de l'abattoir de bovins. La totalité de ces souches est regroupée dans un clade robuste, bien distinct de ceux formés par les FRNAPH humains. Leurs séquences présentent un pourcentage d'homologie compris entre 98,7 et 100 %, soit une variation maximale de 5 nucléotides.

Enfin, contrairement aux FRNAPH-II et -III, l'analyse des FRNAPH-I (n = 158), n'a pas permis de distinguer les souches humaines des souches animales. Les FRNAPH-I d'origine humaine provenaient exclusivement des effluents rejetés par les stations d'épuration tandis que les souches animales provenaient des selles de porcins (n = 12), ovins (n = 18), gallinacés (n = 24), anatidés (n = 13) ou des eaux usées de l'abattoir porcin (n = 37). Compte tenu de la forte prévalence des FRNAPH-I chez l'animal mais également dans les effluents des stations d'épuration urbaines, l'intérêt de pouvoir distinguer les souches humaines et animales au sein de ce génogroupe a motivé le séquençage de la totalité du génome. Là encore, aucune distinction génétique n'a pu être effectuée selon leur origine humaine ou animale.

Lors de cette étude, rappelons que tous les FRNAPH isolés puis séquencés ont été initialement caractérisés en utilisant la RT-PCR proposée par Wolf *et al.* (2010) afin de déterminer leur appartenance à un génogroupe donné. L'utilisation d'un autre système de PCR pour leur détection a fourni des résultats quelque peu différents. En effet, concernant les FRNAPH-II, l'utilisation du système de RT-PCR proposé par Ogorzaly & Gantzer (2006) a montré une sensibilité moindre puisque parmi les souches humaines testées (n = 26), seulement 81 % ont été détectées. De manière intéressante, aucune des souches provenant de l'animal (n = 8) n'a pu être détectée en utilisant ce système **(Figure 14)**.

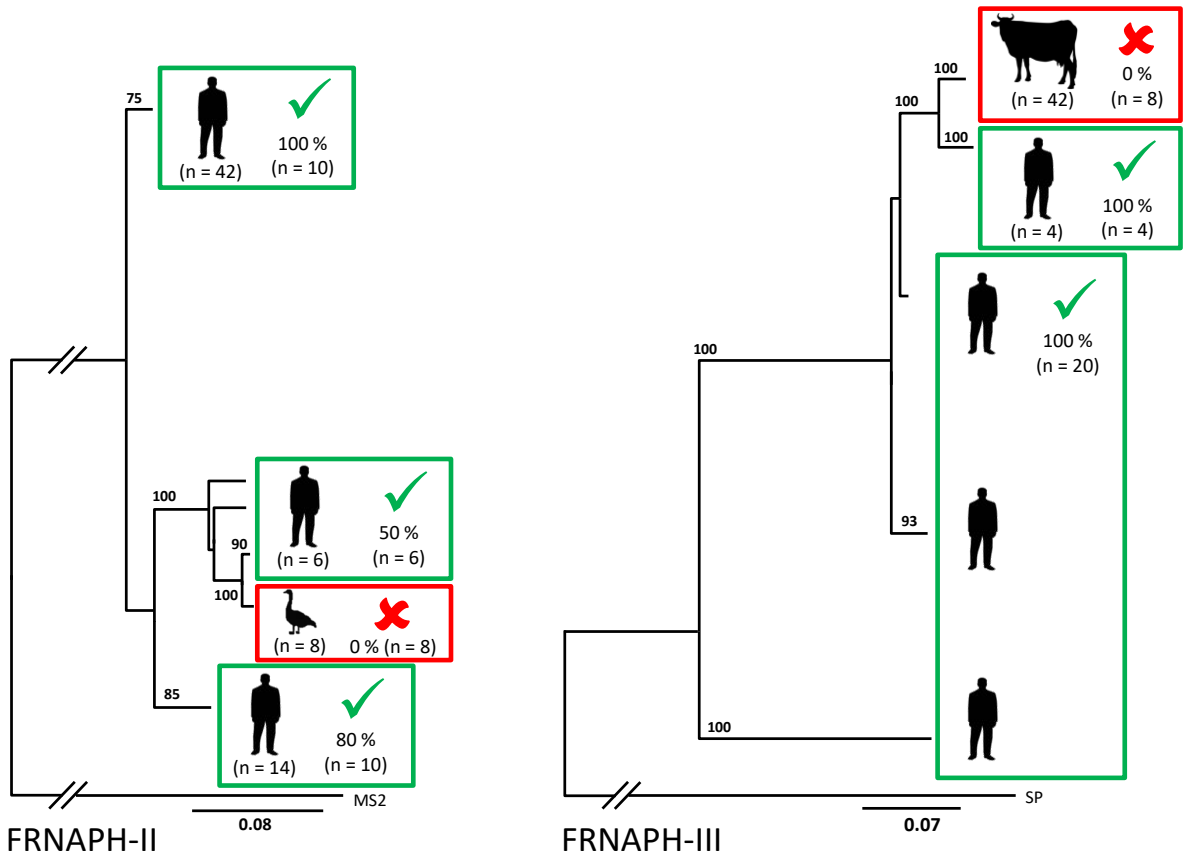

Figure 14 : Détection des FRNAPH-II et -III en utilisant les amorces et sondes proposées par Ogorzaly & Gantzer (2006). Les cadres verts et rouges schématisent respectivement la détection ou non des souches de FRNAPH appartenant à chacun des clades.

De la même façon concernant les FRNAPH-III, la RT-PCR mise au point par Ogorzaly & Gantzer (2006) a permis la détection de 100 % de souches humaines testées (n = 24) y compris les souches les plus proches du clade animal, tandis que parmi ce dernier, aucune souche testée n'a pu être détectée (n = 8).

Les raisons de la forte spécificité de la méthode de détection proposée par Ogorzaly & Gantzer (2006) lorsqu'il s'agit de détecter les souches d'origine humaine ne sont pas établies actuellement, si tant est l'hypothèse qu'au moment de sa mise au point, les séquences de phages disponibles dans les bases de données ayant servi à la construction des amorces et sondes étaient en nombre limité et provenaient essentiellement de souches isolées d'eaux usées urbaines (*i.e.* seulement 4, 5, 3 et 3 séquences génomiques, partielles ou complètes, étaient respectivement disponibles pour les FRNAPH-I, -II, -III et -IV). A titre de comparaison, le système de détection proposé par Wolf *et al.* (2010), plus récent, repose vraisemblablement sur un nombre plus conséquent de séquences utilisées pour la construction des amorces et sondes.

Ainsi, comme déjà souligné par d'autres études (Blanch *et al.*, 2006, 2004; Lee *et al.*, 2009), ces travaux démontrent que le FRNAPH-II et -III sont plus spécifiques de l'Homme que les FRNAPH-I. La recherche ciblée de ces deux génogroupes constitue alors une approche intéressante pour témoigner d'une pollution humaine en particulier lorsque le génotypage est réalisé avec la méthode de RT-PCR proposée par Ogorzaly et Gantzer (2006) qui apparaît plus spécifique que celle de Wolf *et al.* (2010). Cette plus forte spécificité est néanmoins associée à une perte de sensibilité. Les FRNAPH-I sont quant à eux des indicateurs de contamination fécale plus globale (pollution urbaine et animale). Leur présence majoritaire en sortie de stations d'épuration urbaines alors qu'ils étaient minoritaires en entrée montre enfin que la persistance des différents génogroupes de FRNAPH au cours du traitement des eaux est un paramètre important à prendre en compte.

II. LA SURVIE DES DIFFERENTS GENOGROUPES DE FRNAPH DANS LES EAUX USEES EST-ELLE COMPATIBLE AVEC LEUR UTILISATION EN TANT QU'INDICATEURS DE POLLUTION ?

Comme décrit dans la littérature et comme le suggèrent nos précédents résultats, la survie de chacun des génogroupes de FRNAPH est différente. Il s'agit là d'une limite importante quant à leur utilisation pour discriminer l'origine de la pollution fécale des eaux ou des coquillages. Ce phénomène est en effet à l'origine de la prévalence plus importante des FRNAPH-I par rapport à celle des autres génogroupes dans les eaux usées urbaines traitées et dans l'environnement. De ce fait, la recherche des FRNAPH-I ne permet pas actuellement de déterminer l'origine d'une contamination fécale (Cole *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 2016; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006).

Dans ce contexte, l'objectif ici a été d'étudier l'impact du traitement des eaux et du temps sur la distribution des différents génogroupes de FRNAPH dans les eaux usées urbaines, en s'intéressant à la fois à la persistance des particules infectieuses mais également à celle des génomes, puisque ces derniers devraient présenter une meilleure stabilité selon les données de la littérature. Les résultats concernant ce point sont présentés en détail dans la publication (Hartard *et al.*, 2015).

Pour connaitre le devenir des FRNAPH lors du traitement des eaux usées, des échantillons d'eau ont été collectés à l'entrée et à la sortie d'une station d'épuration, afin d'y rechercher les FRNAPH infectieux par culture et de génotyper les plages de lyse isolées en utilisant la RT-PCR proposée par Wolf *et al.* (2010). Les génomes de FRNAPH ont été directement recherchés dans les prélèvements en utilisant ce même système de RT-PCR.

Dans les eaux usées brutes analysées, les FRNAPH infectieux ont été retrouvés à des concentrations comprises entre 3,4 × 10^3 et 1,4 × 10^4 UFP/mL tandis que dans les eaux traitées, leurs concentrations étaient inférieures à 10^2 UFP/mL. Un abattement moyen de 2,3 unités logarithmiques a ainsi été calculé. Cet abattement est cependant variable pour chacun des génogroupes de FRNAPH. En effet, le génotypage des plages de lyse (n = 103) a permis d'estimer que les FRNAPH-II et -III représentaient respectivement 26,4 % et 72,6 % des FRNAPH isolés en entrée de station d'épuration, tandis que parmi les plages de lyse isolées à partir des effluents (n = 28), 86 % étaient formées par des FRNAPH-I et les autres correspondaient à des FRNAPH-II. Ainsi, si la proportion de FRNAPH-II infectieux reste plutôt constante au cours du traitement des eaux (*i.e.* 15 à 25 %), une disparition quasi totale des FRNAPH-III infectieux est observée, associée à une augmentation relative de la proportion des FRNAPH-I qui deviennent largement majoritaires dans les effluents de station d'épuration. L'ensemble de ces résultats est résumé dans la **Figure 15**.

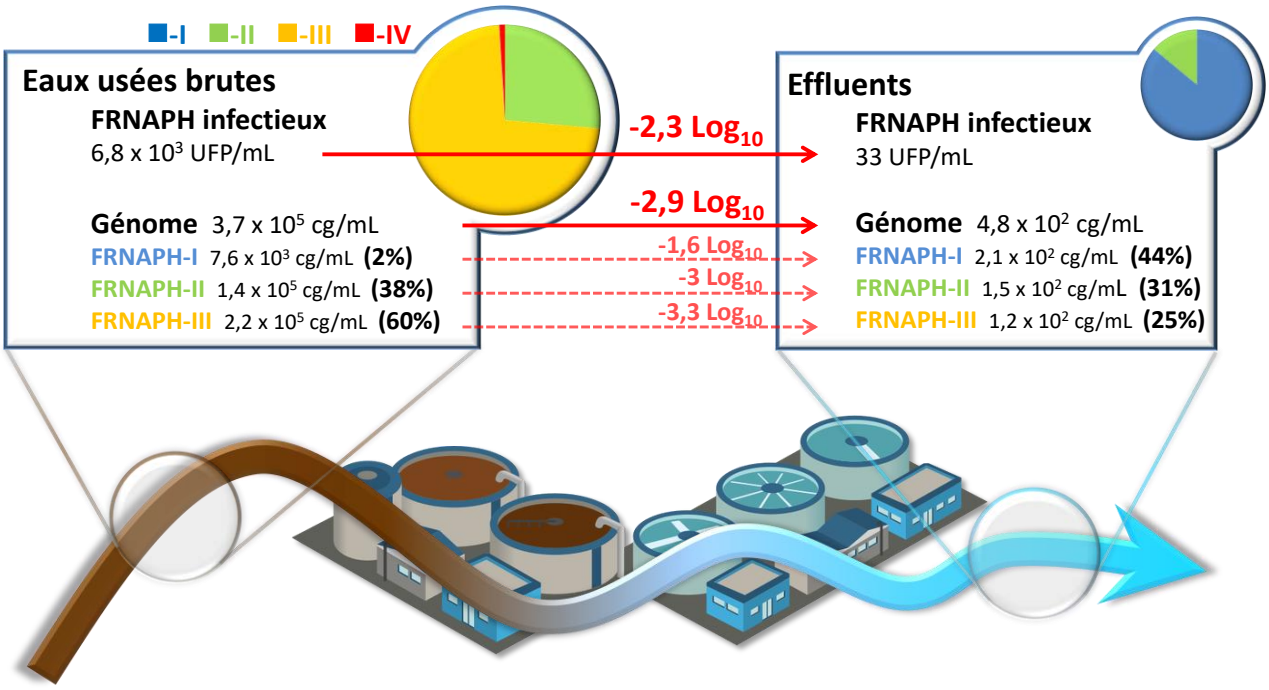

Figure 15 : Persistance des différents génogroupes de FRNAPH (génomes et particules infectieuses) lors du traitement des eaux usées urbaines.

Concernant leurs génomes, les concentrations mesurées dans les eaux brutes variaient entre 7,9 × 10^4 à 6,3 × 10^5 cg/mL et les proportions de chacun des génogroupes étaient en adéquation avec ce qui a été observé lors de leur recherche par culture. Dans le cas des

effluents, les concentrations de chacun des génogroupes étaient cette fois proches de 10^2 cg/mL, ce qui suppose à nouveau des abattements différents. L'abattement moyen observé dans le cas des FRNAPH-I était en effet de 1,6 unité logarithmique tandis que dans le cas des FRNAPH-II et -III, ils étaient respectivement estimés à 3 et 3,3 unités logarithmiques.

Les différences de comportement entre chacun des génogroupes de FRNAPH lors du traitement des eaux sont documentées dans la littérature scientifique (Boudaud *et al.*, 2012; Haramoto *et al.*, 2015, 2012). Ce phénomène est évidemment lié à des différences de survie avec notamment la meilleure persistance bien établie des FRNPAH-I (Muniesa *et al.*, 2009; Yang & Griffiths, 2013). D'autres paramètres doivent cependant être considérés. Par l'étude des phages prototypes MS2, GA et Qβ, Dika *et al.* (2013) ont par exemple démontré que la capacité d'adhésion des phages était dépendante de leur caractère hydrophobe et que les phages GA et Qβ (respectivement FRNAPH-II et -III) présentaient le plus fort degré d'hydrophobicité, ce qui leur assure une capacité d'adhésion à certains supports supérieure à celle du phage MS2 (FRNAPH-I) moins hydrophobe. Ce phénomène pourrait alors expliquer les résultats observés par Haramoto *et al.* (2015) qui rapportent comme ici l'abondance des FRNAPH-II et -III dans les eaux usées brutes et celle des FRNAPH-I dans les eaux traitées, mais dans ce cas, l'analyse des boues activées a révélé que ces dernières étaient riches en FRNAPH-II infectieux. Il semble alors que la faible prévalence des FRNAPH-II et -III dans les eaux traitées soit majoritairement liée à la séquestration des particules infectieuses dans les boues pour les premiers tandis que l'inactivation des particules virales peut également être évoquée dans le cas des FRNAPH-III.

Dans un second temps, la stabilité des FRNAPH a été évaluée au cours du temps. Pour ce faire, des prélèvements d'eaux usées brutes urbaines ont été stockés à 4°C à l'obscurité et échantillonnés pendant 100 jours afin d'y rechercher les FRNAPH **(Figure 16)**.

Le premier jour, la forte prévalence des FRNAPH-III (*i.e.* > 90 %) a été logiquement observée dans les eaux usées brutes d'origine urbaine. Par la suite, alors que la concentration en FRNAPH infectieux a régulièrement décru au cours du temps (T_{90} estimé à 21,7 jours), la distribution des différents génogroupes a considérablement été modifiée puisque après seulement 3 jours, les FRNAPH-III infectieux représentaient moins de 50 % des phages isolés. La proportion des FRNAPH-I a quant à elle augmenté au cours du temps et ce génogroupe est devenu majoritaire après 60 jours. Concernant les FRNAPH-II, ils représentaient 50 % des phages isolés à partir du 3ème jour et cette proportion a ensuite été maintenue tout au long de l'analyse.

A l'inverse, lorsque les FRNAPH ont été recherchés en utilisant des techniques moléculaires, très peu de variations sont apparues au cours du temps. Les génomes des FRNAPH-I sont apparus comme les plus résistants dans ces conditions, avec une perte de moins d'une unité logarithmique en près de 100 jours. Bien que les concentrations en génomes des FRNAPH-II et -III ont diminué plus rapidement (T_{90} estimés à environ 70 jours), la distribution originale des différents génogroupes a été conservée au cours du temps.

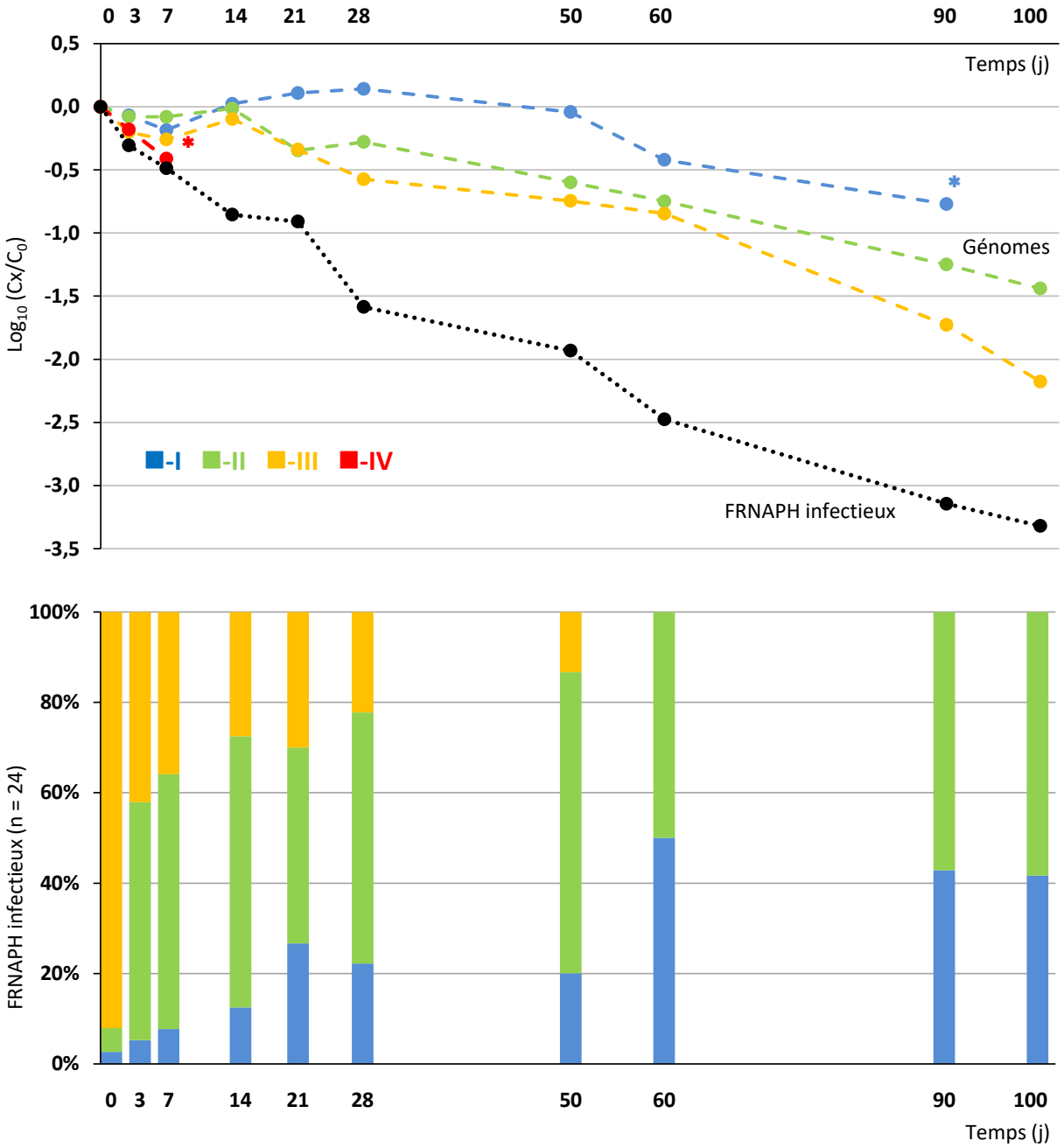

Figure 16 : Modification de la distribution des génogroupes de FRNAPH (particules infectieuses et génomes) au cours du temps dans les eaux usées urbaines (4°C, obscurité). Haut : Persistance des génomes de chacun des génogroupes et des particules infectieuses au cours du temps, * limite de quantification. **Bas :** Distribution des différents génogroupes de FRNAPH infectieux (plages de lyse) au cours du temps.

En conclusion, ces données apportent des informations importantes à deux niveaux. Il apparaît dans un premier temps qu'à cause de leurs cinétiques d'inactivation différentes, la recherche de l'ensemble des FRNAPH infectieux n'est pas efficace pour discriminer l'origine de la pollution fécale. Dans ce cas précis, il est judicieux de cibler directement les génomes des FRNAPH puisque ceux-ci présentent une persistance très supérieure au caractère infectieux et leur recherche permet donc de minimiser les biais liés à la survie plus faible de certains génogroupes (en particulier le FRNAPH-III).

D'autre part nous montrons que la survie des FRNAPH-I et FRNAPH-II reste compatible avec leur utilisation en tant qu'indicateur de pollution fécale globale pour le premier (*i.e.* origine humaine ou animale) et en tant d'indicateur de pollution fécale humaine pour le second. Enfin, la survie très limitée des FRNAPH-III fait que la recherche de ce génogroupe peut être proposée pour identifier les contaminations fécales très récentes d'origine humaine, liées par exemple aux rejets dans l'environnement d'eaux usées n'ayant pas subi de traitement d'épuration.

AEM
Journals.ASM.org

Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins

C. Hartard,[a,b] R. Rivet,[a,b] S. Banas,[a,b] C. Gantzer[a,b]

Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy, France[a]; CNRS, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564, Nancy, France[b]

F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) have been widely studied as tools for evaluating fecal or viral pollution in water. It has also been proposed that they can be used to differentiate human from animal fecal contamination. While FRNAPH subgroup I (FRNAPH-I) and FRNAPH-IV are often associated with animal pollution, FRNAPH-II and -III prevail in human wastewater. However, this distribution is not absolute, and variable survival rates in these subgroups lead to misinterpretation of the original distribution. In this context, we studied FRNAPH distribution in urban wastewater and animal feces/wastewater. To increase the specificity, we partially sequenced the genomes of phages of urban and animal origins. The persistence of the genomes and infectivity were also studied, over time in wastewater and during treatment, for each subgroup. FRNAPH-I genome sequences did not show any specific urban or animal clusters to allow development of molecular tools for differentiation. They were the most resistant and as such may be used as fecal or viral indicators. FRNAPH-II's low prevalence and low sequence variability in animal stools, combined with specific clusters formed by urban strains, allowed differentiation between urban and animal pollution by using a specific reverse transcription-PCR (RT-PCR) method. The subgroup's resistance over time was comparable to that of FRNAPH-I, but its surface properties allowed higher elimination rates during activated-sludge treatment. FRNAPH-III's low sequence variability in animal wastewater and specific cluster formation by urban strains also allowed differentiation by using a specific RT-PCR method. Nevertheless, its low resistance restricted it to being used only for recent urban pollution detection. FRNAPH-IV was too rare to be used.

Water contamination by pathogens is a major public health problem. Microorganisms affecting water quality are mainly excreted in feces, and water contamination is caused by discharge of fecal waste of animal origin (e.g., from runoff after rain, farms, and slaughterhouses [SH]) or human origin (e.g., from raw or treated urban wastewater) into the environment. Enteric pathogens include bacteria, protozoa, and enteric viruses (1). The last have been identified in many cases of waterborne and food-borne diseases in developed countries (2).

The virological quality of water is usually indirectly estimated from the number of fecal indicator bacteria, such as *Escherichia coli* and enterococci (3). However, these indicators have serious limitations, especially for the estimation of viral pollution. First, it has been largely demonstrated that viruses are more resistant than bacteria in the environment; therefore viral outbreaks may still be identified even in the absence of indicator bacteria (4, 5). Second, conventional indicators are present in human and animal feces, and they do not provide information about the origin of fecal contamination (6). Yet, this parameter is essential because the reservoir of many waterborne pathogens, especially viruses, is human (7). Finally, the direct estimation of viral pollution (e.g., noroviruses and hepatitis viruses) by molecular tools could be challenging, not only because of the low concentration in the matrix but also because of the difficulty in interpreting positive results without any information about infectivity. In this context, F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) may be useful tools in a number of situations.

FRNAPH are nonenveloped single-stranded RNA viruses, 20 to 30 nm in diameter, belonging to the *Leviviridae* family. They are classified in two genera, *Levivirus* and *Allolevivirus*, each containing 2 subgroups: FRNAPH-I (MS2-like) and -II (GA-like), which form the genus *Levivirus*, and FRNAPH-III (Qbeta-like) and -IV (SP-like), which form the genus *Allolevivirus* (8). These phages reside in the gut of warm-blooded animals and are characterized by their capacity to infect bacteria producing F pili, like *E. coli*. They get excreted in feces at high frequency and concentrations (9). Considering that they are present in large amounts in wastewater, they may be used as an indicator of viral pollution. These phages can be detected both by rapid culture and by molecular methods (reverse transcription-PCR [RT-PCR]), another advantage compared to pathogenic viruses, which can often only be detected by molecular techniques. FRNAPH are similar in size, shape structure, and genome makeup to the main waterborne pathogenic viruses (e.g., norovirus and hepatitis A virus), and they are often used as surrogates to assess the behavior of enteric viruses in water during treatment (10, 11). Finally, it is assumed that the distribution of the 4 FRNAPH subgroups can be used to dif-

Received 8 June 2015 **Accepted** 7 July 2015
Accepted manuscript posted online 10 July 2015
Citation Hartard C, Rivet R, Banas S, Gantzer C. 2015. Occurrence of and sequence variation among F-specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins. Appl Environ Microbiol 81:6505–6515. doi:10.1128/AEM.01905-15.
Editor: M. W. Griffiths
Address correspondence to C. Gantzer, christophe.gantzer@univ-lorraine.fr.
Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AEM.01905-15

ferentiate human from animal fecal contamination. Indeed, FRNAPH-I and -IV are generally associated with animal pollution, whereas FRNAPH-II and -III make up the majority in human wastewater (12, 13). For this reason, subgroup distribution has been widely studied to determine the origin of fecal contamination in river water (14, 15), shellfish (16, 17), and sediments (18).

However, there are two main limits to the use of these indicators to track the origin of fecal pollution. First of all, the distribution of phage subgroups is not absolute. (i) FRNAPH-III, generally associated with humans, has been isolated in high proportions in swine wastewater (12, 19), (ii) FRNAPH-I has been detected in municipal wastewater (20), and (iii) even if FRNAPH-II seems to be highly associated with humans (21), it has also been found in animal feces (22). The second limitation is due to the variable survival rates of FRNAPH in the environment. Indeed, FRNAPH-I and -II are less affected by environmental stresses (23–26), thereby being often found in surface waters, regardless of the source of pollution (27–29). As a consequence, this may cause misinterpretation of the subgroup distribution when estimated by infectious-phage isolation.

The aim of this work was to evaluate the potential of FRNAPH as a tool to differentiate human from animal fecal pollution. We explored in particular the possibility of minimizing both drawbacks described above. The first objective was to determine whether genome sequencing within each subgroup could allow better differentiation between animal and human fecal contamination as recently suggested (20, 30). To achieve this, we isolated by culture FRNAPH strains from samples of known origin (animal feces, urban wastewater, and slaughterhouse wastewater). The strains were subjected to genotyping, and the maturation protein gene was sequenced with the aim to design more-specific RT-PCR methods for human and animal phages. The second objective was to determine whether direct genome detection by RT-PCR could reduce the bias caused by differences in the survival rates of each subgroup in the environment. For this purpose, we compared the persistence of infectious phages with that of the genomes of each subgroup over time and assessed the impact of water treatment on these parameters.

MATERIALS AND METHODS

Animal feces samples. Forty-seven fecal samples were collected from different areas in northwestern France from May to October 2014. The samples were stool from cattle ($n = 10$), swine ($n = 8$), sheep ($n = 9$), horses ($n = 10$), chickens ($n = 5$), and ducks/geese ($n = 5$). All samples were collected in sterile polypropylene containers and kept at −20°C during transport.

After thawing, 4 g of stool was mixed with 28 ml of phosphate-buffered saline (PBS) for 3 min in a DT-50 tube with Ultra-Turrax tube drive (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany). Three milliliters of the mixture (stool concentration of 0.125 g/ml) was removed for RNA extraction and treated as described below. A volume of 14.5 ml of PBS–0.3% peptone was added to obtain a final concentration of 0.1% peptone (final stool concentration of 0.083 g/ml). The suspension was mixed for 1 min and kept in ice for 3 h. Finally, 6 ml of chloroform was added to 20 ml of the stool suspension, and after centrifugation (2,000 × *g* for 5 min) the supernatant was collected for culture.

Slaughterhouse samples. Four wastewater samples were collected from a cattle slaughterhouse (CattleSH-1 to -4) and from a swine slaughterhouse (SwineSH-1 to -4) located in eastern France. The first site generates a wastewater flow of 450 m^3/day when slaughtering 250 animals. The second site processes 30 to 90 swine per day. Wastewater samples were collected in sterile glass bottles and kept at 4°C for less than 3 h prior to analysis.

Urban sewage samples. Five urban sewage samples were collected at the entry of a wastewater treatment plant (WWTP-1 to -5) receiving 80,000 m^3/day from an urban area in eastern France, with a population of approximately 260,000. All samples were collected in sterile glass bottles and kept at 4°C for less than 3 h prior to analysis. Another sample was collected from a smaller WWTP located in northwestern France (WWTP-6), receiving wastewater from 8,500 inhabitants. The sample was kept at −20°C during transport.

Finally, in order to isolate the most resistant phages, 2 samples (WWTP-4 and WWTP-5) were stored at 4°C in the dark, in glass bottles, and analyzed over time. Two effluent samples were also collected from the first WWTP, whose processes include pretreatment, primary treatment by sedimentation, secondary treatment by activated sludge, and tertiary treatment for dephosphorylation.

Infectious FRNAPH enumeration and phage plaque isolation. FRNAPH were detected and enumerated by the double-agar-layer technique according to International Organization for Standardization (ISO) standard 10705-1 (31). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 (NCTC 12484) was used as the host strain (32), and kanamycin and nalidixic acid were added to obtain a final antibiotic concentration of 100 μg/ml. Culture was performed directly from 1 ml of several dilutions of wastewater and stool suspensions in 90-mm-diameter petri dishes. For each dilution, 2 assays were performed. Viral concentration was expressed in PFU per milliliter after an 18-h incubation period. For low-concentration samples (WWTP effluents or aged samples), enumeration was performed twice from 5 ml of wastewater in 150-mm-diameter petri dishes to lower the detection limit to 0.1 PFU/ml. Several phage plaques were isolated from the positive samples, collected with tips, and suspended in 1 ml of PBS–5% glycerol. After brief vortexing, the suspension was filtered through sterile Acrodisc syringe filters (pore size, 0.22 μm; Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI). RNA was then extracted as described below.

RNA extraction. To detect genomes in the samples, extraction was performed directly from 1 ml of wastewater (WWTP or SH). For the stool samples, 3 ml of the suspension prepared as previously described (stool concentration of 0.125 g/ml) was mixed with 1 ml of chloroform and centrifuged (2,000 × *g* for 5 min). Extraction was then performed from 1 ml of the supernatant. It was carried out by adding 3 ml of Isol-RNA lysis reagent (5 PRIME GmbH, Hilden, Germany) to the samples, followed by gentle agitation for 10 min on a tube roller at 70 rpm (Starlab International GmbH, Hamburg, Germany). After addition of 1 ml of chloroform, the mixture was stirred vigorously by hand for 15 s and centrifuged (2,000 × *g* for 2 min) in 15 ml of Phase Lock Gel Heavy (5 PRIME GmbH, Hilden, Germany). RNA was extracted from the supernatant using NucliSens magnetic extraction reagents (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) on NucliSens MiniMAG according to the manufacturer's recommendations. RNA was concentrated in 100 μl of elution buffer and stored at −80°C in 1.5-ml DNA LoBind tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany).

RNA from phage plaques was extracted using NucliSens EasyMag (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) from 50 μl of phage suspension, eluted in 100 μl of buffer, and stored at −80°C.

Real-time RT-PCR. For the direct detection of genomes, RNA suspensions were subjected to the RT-PCR method proposed by Wolf et al. (22) with some modifications. Separate reactions were carried out for each subgroup. Reverse transcription was performed using SuperScript III reverse transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations from 7.5 μl of RNA using 20 pmol of reverse primer, 100 U of SuperScript III, and 20 U of RNasin (Promega, Madison, WI) in a 20-μl reaction volume. PCR was then carried out from 5 μl of cDNA with TaqMan universal PCR master mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations in a 25-μl reaction volume, with reverse and forward primers at a concentration of 1 μM and the probe at a concentration of 0.3 μM. PCR amplifica-

TABLE 1 Primer sequences used for sequencing reactions

Target virus	Primer sequence (5′–3′)	Sense	Position	Product length (bp)
FRNAPH-I	GGG GTC CTG CTC AAC TTC CT	+	17–36[b]	1,407
	ACC CCG TTA GCG AAG TTG CT[a]	−	1404–1423[b]	
FRNAPH-II	CAT GCC GTT AGG TTT AGN TGA	+	89–109[c]	1,280
	GTA CCG CCA TTA TCG ACG AG	−	1349–1368[c]	
FRNAPH-III	GTG TCC GAY TGG AAG GAR CT	+	941–960[d]	405
	CAT GAT CDA ATT GAC CCA AWG	−	1325–1345[d]	

[a] Primer selected from a previous study (33).
[b] Genome location of primers based on GenBank accession number NC_001417.2, MS2 phage.
[c] Genome location of primers based on GenBank accession number NC_001426.1, GA phage.
[d] Genome location of primers based on GenBank accession number NC_001890.1, Qbeta phage.

tion 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 on a StepOne Plus real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Infectious phage genotyping was performed using phage plaque RNA extracted by a 1-step multiplex quantitative RT-PCR using the primers and probes designed by Wolf et al. (22). The reaction was performed with the RNA UltraSense one-step quantitative RT-PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations from 2 μl of RNA with 20 U of RNasin (Promega, Madison, WI), each primer at a concentration of 0.3 μM, and the probes at a concentration of 0.15 μM in 20-μl reaction volume. The reaction was carried out on a StepOne Plus real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA) at 55°C for 60 min (reverse transcription) and 95°C for 5 min (hot start), followed by 40 cycles of 15 s at 95°C (denaturation) and 40 s at 58°C (annealing/extension). The primers and probes proposed by Ogorzaly and Gantzer (33) were also tested for the detection of some phage strains under the same conditions.

FRNAPH sequencing. Amplification was performed with a OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) on RNA extracted from phage plaques, according to the manufacturer's recommendations. For each subgroup, primers were designed based on consensus sequences retrieved in the GenBank database, National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html). Alignments and consensus sequence determination were performed using Seaview software v.4 (34), and designs were performed with Primer3Plus software (35). Percent sequence similarity was calculated using the ClustalW2 program of the European Bioinformatics Institute (EBI) of the EMBL (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/).

For FRNAPH-I and -II, the amplified fragment was about 1,300 to 1,400 nucleotides in length, including the entire maturation protein gene (Table 1). For FRNAPH-III, the size of the amplified fragment located on the maturation protein gene was about 400 nucleotides. The amplified RT-PCR products were purified and sequenced by a sequencing service provider (Beckman Coulter Genomics, Takeley, United Kingdom). Nucleotide sequences were aligned using Seaview software v.4 (34), and phylogenetic trees were generated using BioNJ analysis, with distance estimations based on the Kimura two-parameter equation (K2P). Confidence values of branches were calculated by bootstrap analysis using 100 replications. Designs of trees were then performed using Figtree software v.1.4.2 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Corresponding sequences of FRNAPH available in GenBank were added to the trees. Strains and accession numbers for FRNAPH-I are as follows: 253A, HQ332484.1; 862A, HQ332489.1; DL1, EF107159.1; DL16, EF108464.1; DL52, JQ966307.1; DL54, JQ966308.1; JP501, AF227251.1; L1.G10.6, FJ799473.1; L2.G10.13, FJ799546.1; L3.G40.5, FJ799645.1; M12, AF195778.1; MS2, NC_001417.2; and ST4, EF204940.1. Those for FRNAPH-II are as follows: DL10, FJ483837.1; DL20, FJ483839.1; GA, NC_001426.1; KU1, AF227250.1; and T72, FJ483838.1. Those for FRNAPH-III are as follows: 2010JunDWTP11-13, AB627184.1; 1FR, JF719735.1; 2FR, JF719736.1; 3FR, JF719737.1; AncP1, AB971354.1; BR12, FJ483842.1; BZ1, FJ483844.1; HL4-9, FJ483841.1; MX1, S81548.1; M11, S81550.1; Qbeta, NC_001890.1; Qbeta_3, GQ153930.1; TW18, FJ483840.1; and VK, FJ483843.1.

Statistical analysis. Analysis of covariance (ANCOVA) was used to test the difference in linearity of each genome and infectious-phage persistence. Statistical analyses were performed using StatEL (AD Science, Paris, France). Differences were considered significant when P was <0.05.

RESULTS

FRNAPH in stool samples. FRNAPH concentration was evaluated after culture by plaque assay and direct genome detection in animal feces. Samples from 7 different species ($n = 47$) were analyzed (Table 2). Analysis of individual stool specimens revealed variable incidences of infectious phages depending on the species. Plaque formation was detected in a total of 9 (19%) fecal samples: no FRNAPH were isolated from cattle feces, but at least 1 sample for the other species was positive. Except for cattle samples, prevalence in fecal specimens was between 10% and 40%, with the highest prevalence in duck/goose and chicken specimens. Concentrations of infectious FRNAPH in stool samples ranged from 1.2×10^1 to 1.9×10^3 PFU/g for swine, 1.6×10^4 to 1.9×10^4 PFU/g for sheep, and 5.1×10^1 to 3.0×10^2 PFU/g for ducks/

TABLE 2 Incidence and concentration of infectious FRNAPH and genomes in feces and wastewater

Sample source	Infectivity		Total genome	
	No. of positive samples/no. taken	Concn range[a]	No. of positive samples/no. taken	Concn range[a]
Feces				
Cattle	0/10		2/10	3.9–4.1
Swine	2/8	1.1–3.3	5/8	3.8–5.8
Sheep	2/9	4.2–4.3	5/9	3.7–6.5
Horses	1/10	1.2	1/10	4.8
Chickens	2/5	3.3–5.0	3/5	3.7–8.9
Ducks and geese	2/5	1.7–2.5	3/5	4.0–5.4
Wastewater				
Urban WWTP	6/6	2.3–4.2	6/6	4.9–5.8
CattleSH	4/4	4.7–5.2	4/4	6.4–6.8
SwineSH	4/4	2.4–4.5	4/4	4.7–6.1

[a] Concentrations are expressed in $\log_{10}$ PFU/g of stool or $\log_{10}$ PFU/ml of wastewater.

TABLE 3 Distribution of infectious FRNAPH subgroups isolated from feces and wastewater

Sample source	No. of plaques picked	No. of plaques classified as:				
		FRNAPH	FRNAPH-I	FRNAPH-II	FRNAPH-III	FRNAPH-IV
Feces						
Cattle	0					
Swine	14	13	12			1
Sheep	20	20	20			
Horses	3	1	1			
Chickens	24	24	24			
Ducks and geese	25	24	13	11		
Wastewater						
Urban WWTP	115	106		28	77	1
CattleSH	117	103			100	3
SwineSH	58	52	40			12
Total	376	343	110	39	177	17

geese. The highest concentrations were found in chicken manure, with a maximum of 1.1×10^5 PFU/g.

FRNAPH genomes were more often detected in stool samples than infectious phages. Depending on the species, 10% to 62.5% of the samples were positive, with the highest prevalence in swine feces (Table 2). Ten samples contained genomes, while no infectious phages were found (specimens from 2 cattle, 3 swine, 3 sheep, 1 chicken, and 1 duck). The concentration of genomes was higher than that of infectious phages, with a ratio of between 1.1 and 3.9 $\log_{10}$. The average concentration for each species ranged from 1.0×10^4 genome copies (gc)/g (cattle) to 2.7×10^8 gc/g (chickens), with the highest concentrations observed in samples with the largest amounts of infectious FRNAPH.

FRNAPH in wastewater. FRNAPH concentration was also evaluated by plaque assay and direct genome detection in urban wastewater and in cattle slaughterhouse (CattleSH) and swine slaughterhouse (SwineSH) wastewater. All 14 samples were positive for infectious phage (Table 2). The average concentration was 5.7×10^3 PFU/ml in urban wastewater, with the lowest concentration in the sample from the small WWTP located in northwestern France. In CattleSH waters, the average concentration was 1.1×10^5 PFU/ml, and it was about 8.6×10^3 PFU/ml in SwineSH waters.

In all the samples, genomes were found in higher concentrations than infectious phages, with ratios of between 1.5 and 2.6 $\log_{10}$. The average concentration was 3.3×10^5 gc/ml in urban wastewater, 4.3×10^6 gc/ml in CattleSH wastewater, and 5.6×10^5 gc/ml in SwineSH wastewater.

FRNAPH subgroup distribution. Distribution was determined directly in the samples by detection of subgroup genomes and after culture by phage plaque genotyping. Phage plaque distribution in feces and wastewater is shown in Table 3. Among the 376 phage isolates using *S.* Typhimurium WG49 as host (32), 91.2% gave a positive RT-PCR signal for a subgroup ($n = 343$).

The 14 plaques tested from swine feces were typed as 86% ($n = 12$) formed by FRNAPH-I and 7% ($n = 1$) by FRNAPH-IV. As regards sheep and chicken stool specimens, 20 and 24 plaques, respectively, were picked and all were formed by FRNAPH-I. Only 3 phage plaques were isolated from horse feces; 1 was formed by FRNAPH-I, but the other two did not give positive signals for any subgroup. In the 2 duck fecal samples, 25 phage plaques were typed; the first specimen contained only FRNAPH-I ($n = 8$) and 1 uncharacterized plaque, while the second specimen contained 31% ($n = 5$) FRNAPH-I plaques and 69% ($n = 11$) FRNAPH-II plaques.

One hundred fifteen phages were isolated from the urban wastewater samples. Of the 92% of plaques that were characterized ($n = 106$), 26% were formed by FRNAPH-II ($n = 28$) and 72% by FRNAPH-III ($n = 77$). Among the 117 phages isolated from CattleSH waters, 88% gave positive RT-PCR signals ($n = 103$), among which 100 were FRNAPH-III and 3 FRNAPH-IV. Finally, among the phages isolated from SwineSH waters ($n = 58$), 40 were FRNAPH-I and 12 FRNAPH-IV. All FRNAPH-IV phages were isolated from the same specimen, representing 92% of the phages characterized in this sample.

This distribution was confirmed overall by direct detection of genomes in the samples. Most genomes detected in the stool samples were that of FRNAPH-I, though with some exceptions: 100% of the genomes detected in 1 sheep stool sample were that of FRNAPH-III (1.0×10^5 gc/g), but this sample was negative for infectious phages. The FRNAPH-II genome was detected in the duck fecal sample in which were found infectious FRNAPH-II (2.2×10^5 gc/g, representing 93% of the total genome).

The genomes detected in the urban wastewater samples were mostly those of FRNAPH-II (6.0×10^4 to 2.2×10^5 gc/ml, representing 30% to 61% of the total number of genomes) and those of FRNAPH-III (2.9×10^4 to 4.7×10^5 gc/ml, representing 30% to 67% of the total number of genomes). FRNAPH-I and -IV genomes were detected at lower concentrations (respectively, 7.8×10^3 and 4.1×10^3 gc/ml on average), representing less than 6% of all the genomes detected. With regard to SwineSH wastewater, the FRNAPH-I genome was detected in all the samples (5.1×10^4 to 1.3×10^6 gc/ml). The FRNAPH-IV genome was detected in 1 sample, representing 6% of the total genomes detected in this specimen. Finally, in all CattleSH wastewater samples, the FRNAPH-III genome prevailed (>99%), with an average concentration of 4.3×10^6 gc/ml. The FRNAPH-I genome was found in 3 samples (1.1×10^3 to 1.8×10^4 gc/ml), the FRNAPH-II genome was found in 2 samples (1.5×10^3 to 2.0×10^3 gc/ml), and the FRNAPH-IV genome was found in 1 sample (9.2×10^3 gc/ml).

The presence and isolation of FRNAPH-II and -III strains of animal origin (ducks and cattle) seem particularly interesting for

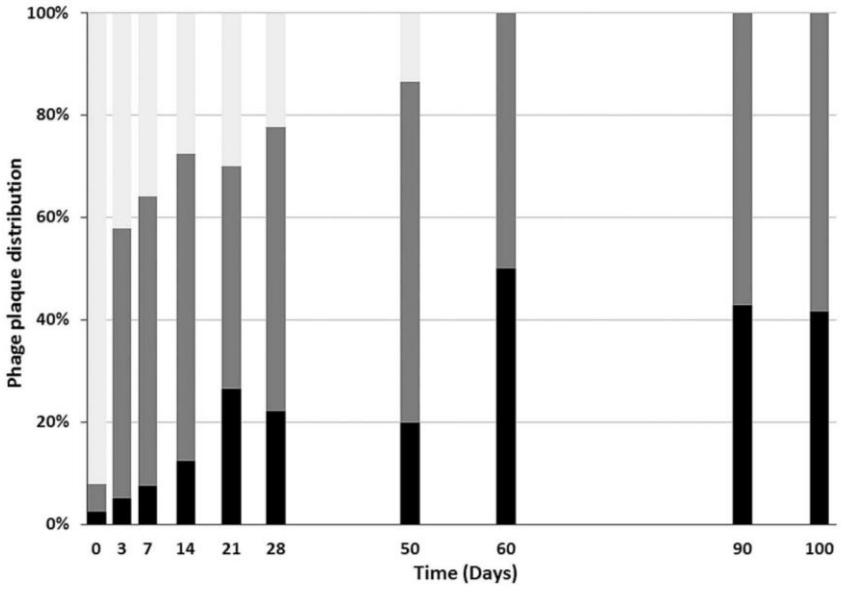

FIG 1 Infectious FRNAPH-I (black), FRNAPH-II (dark gray), and FRNAPH-III (light gray) distribution in urban wastewater. Between 16 and 24 plaques were isolated and typed for each analysis.

evaluating the potential of FRNAPH to track the origin of fecal pollution. These subgroups, generally associated with human pollution, were sequenced and compared with strains isolated from urban wastewater. Conversely, no FRNAPH-I strains were isolated from the raw WWTP samples.

Genome and infectious FRNAPH stability in urban wastewater. The stability of FRNAPH (genomes and infectious phages) was evaluated in wastewater over time and after wastewater treatment. Two raw sewage samples (WWTP-4 and WWTP-5) were analyzed over time. On the first day, infectious FRNAPH concentrations were, respectively, 3.8×10^3 and 8.0×10^3 PFU/ml. Infectious FRNAPH subgroup distribution over time is shown in Fig. 1. Initially, FRNAPH-III prevailed (>90%) in raw wastewater. Its proportion decreased steadily over time and was less than 50% after 3 days. The FRNAPH-II proportion was hidden during the first days by the large number of FRNAPH-III phages, but it was between one- and two-thirds of the total number of infectious FRNAPH after 3 days. Finally, the proportion of FRNAPH-I phages was low during the first days, but it increased steadily to one-half of the infectious phages after 60 days.

While infectivity decreased significantly (time required for 90% loss of infectivity [T_{90}] estimated at day 21.7), genomes were overall more persistent over time (Fig. 2). The FRNAPH-IV genome seemed to be the least resistant, but the rapid achievement of quantification limits due to low concentrations in the original samples prevented a trend from being accurately determined. The genome of FRNAPH-I turned out to be the most resistant under these conditions (decrease of <1 $\log_{10}$ after 100 days), and a significant but low difference between its persistence and that of FRNAPH-II was observed (P value = 0.027, ANCOVA). No marked difference between the persistence of the FNRAPH-II genome and that of FRNAPH-III was observed during the first 60 days (P value = 0.69, ANCOVA). The genomic search approach thus appears more reliable to estimate subgroup distribution, especially in the case of an aged fecal contamination, thereby reducing the survival bias.

Urban WWTP effluents ($n = 2$) were analyzed to estimate the impact of water treatment on infectious FRNAPH and genome concentration. The average concentration of infectious FRNAPH in effluents was found to be 33.2 PFU/ml. Among the plaques typed ($n = 28$), 86% were formed by FRNAPH-I and the rest by FRNAPH-II. The genome of FRNAPH-I was detected at concentrations up to 1.1×10^3 gc/ml. Genomes of other subgroups were not detected, mainly because of the low volume analyzed. During wastewater treatment, the infectivity decreased by 2.3 $\log_{10}$ units and the genome copies decreased by 1.0 $\log_{10}$ unit for FRNAPH-I. As FRNAPH-II and -III genome concentrations in effluents were below the detection limit, losses during water treatment were, respectively, at least 2.0 $\log_{10}$ and 1.9 $\log_{10}$.

The change in the FRNAPH subgroup distribution over time in urban wastewater and the analysis of effluents allowed FRNAPH-I strains of urban origin to be isolated; these were compared with animal strains by sequencing.

FRNAPH sequencing. Sequencing was performed on FRNAPH isolated by culture from samples of different origins. A two-phase strategy was used. First, we sequenced a representative panel of the supposed animal subgroup (FRNAPH-I) isolated from animal samples and the supposed human subgroups (FRNAPH-II and -III) isolated from urban wastewater. Then, we sequenced most FRNAPH-II and -III strains isolated from animal samples on the one hand and most FRNAPH-I strains isolated from urban samples on the other hand. Altogether, we sequenced the entire maturation protein genes of 158 FRNAPH-I and 70 FRNAPH-II strains, as well as part of those of 92 FRNAPH-III strains.

FRNAPH-I strains of animal origin were isolated from feces or slaughterhouse (SH) waters. Group formation during sequence comparison appeared to be sample dependent, and each stool sample formed a robust grouping (Fig. 3). In each stool sample, FRNAPH-I sequences presented a high degree of similarity (>98.6%). However, no relationship between sequences isolated from different animals of the same species was observed. For example, the percentage of identity between the

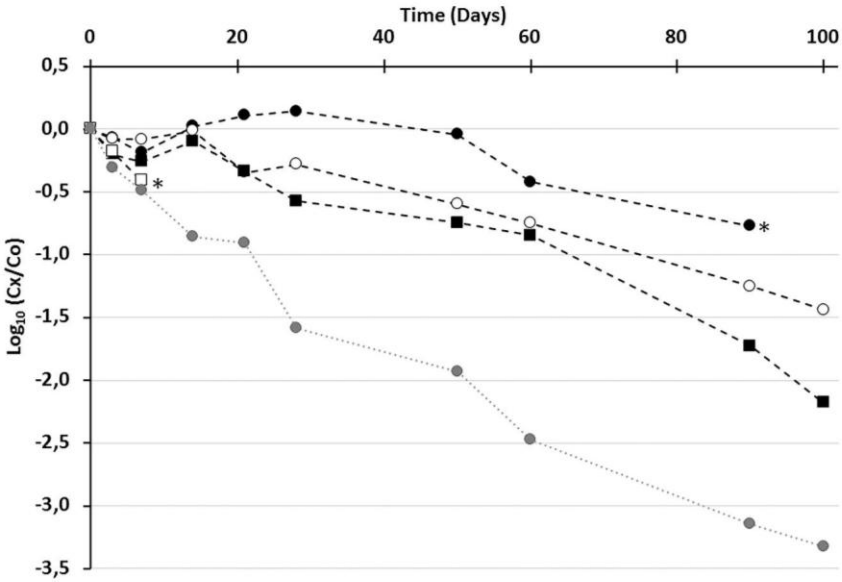

FIG 2 Persistence of FRNAPH-I (black circles), FRNAPH-II (white circles), FRNAPH-III (black squares), and FRNAPH-IV (white squares) genomes, as well as of infectious FRNAPH (gray circles) in urban wastewater kept at 4°C in the dark. *, quantification limit; Cx, concentration at the indicated time; Co, initial concentration.

2 sheep samples was only 90.7% ± 0.3%; it was 92.8% ± 0.4% between the 2 chicken samples, and it was 94.5% ± 0.3% between the 2 duck samples. FRNAPH-I strains isolated from swine feces were not grouped with any strains from SwineSH wastewater samples, but they were close to isolates from the Chicken-2 sample (>98.7% similarity). More variability was observed in SwineSH wastewater samples (93.2% similarity in SwineSH-2 and only 90.9% in SwineSH-4). Groupings were again sample dependent, except for 1 strain isolate from SwineSH-2, which was close to the group formed by strains from SwineSH-1 (98.0% ± 0.2% similarity).

FRNAPH-I strains of urban origin were isolated from WWTP samples. They were present in low density in urban wastewater but showed high resistance; therefore urban strains could be isolated from aged samples or effluents. Sequences were spread out over the entire phylogenetic tree obtained with animal FRNAPH-I strains. No relationship appeared between them, and some isolates were close to strains of animal origin. For example, many strains isolated from urban WWTP effluent 1 were close to strains from SwineSH-4, and all grouped with prototype phage MS2. In this cluster, percent sequence variation was only 0.7%.

FRNAPH-II strains of human origin were isolated from urban wastewater. Percent sequence identity between them ranged from 82.3% to 100%. The isolated strains could be grouped into several clusters (Fig. 4). No sample-dependent grouping was observed, and the FRNAPH isolated from WWTP-6 (urban WWTP located in another geographical area) were present in all clusters.

All FRNAPH-II strains isolated from animals were sequenced. They all originated from a duck fecal sample and were grouped into a cluster with strains coming from urban wastewater. Even if urban strains and duck strains were close, with a maximum similarity of 98.7% in this cluster, FRNAPH-II strains from the duck sample formed a separate grouping because all isolates exhibited identical sequences. All previously mentioned FRNAPH-II strains were detected by using multiplex RT-PCR as proposed by Wolf et al. (22), but the singularity of the duck strains was confirmed by testing the primer and probe design described by Ogorzaly and Gantzer (33). This PCR assay targeted the 3′ end of the replicase gene and allowed most urban FRNAPH-II strains to be detected, leaving out strains isolated from duck feces. More precisely, out of the 6 urban strains belonging to the cluster formed with the duck strains, half gave a typical positive RT-PCR signal, while the others were not detected. Out of the 10 strains tested from the T72 cluster, 70% gave a typical positive signal, 1 gave a late signal, and 2 were uncharacterized. Finally, out of the 10 strains tested from other clusters, 100% were detected.

FRNAPH-III strains of human origin were isolated from urban wastewater. Percent sequence identity between them was 85.3% ± 14.7%. They were grouped into several clusters (Fig. 5), often associated with one or more known strains available in GenBank. One cluster was formed by a group composed of a large number of isolates (n = 34), with most strains already published (TW18, 1FR, AncP1, 2FR, 3FR, Qbeta_3, HL4-9, and 2010JunDWTP11-13). The degree of similarity ranged between 90.0% and 100% for these phages.

Most FRNPAH-III strains originating from animals were also sequenced. They were all isolated from CattleSH wastewater. These strains (n = 42) formed a robust cluster with low sequence variations (0% to 1.3%), corresponding to a maximum variation of 5 nucleotides. Among them, 15 isolates had identical sequences and were present in all samples. Similarly, 2 other clone sequences were identified, one in 12 isolates and the other in 7 isolates. These were present in 3 of the 4 samples.

A group formed by 4 FRNAPH strains from the urban WWTP samples was close to the cattle cluster. Percent sequence identity with cattle strains was 94.2% for the most genetically distant ones and 95.8% for the closest ones, but the bootstrap value (100) confirmed the strength of the cattle cluster. As observed for FRNAPH-

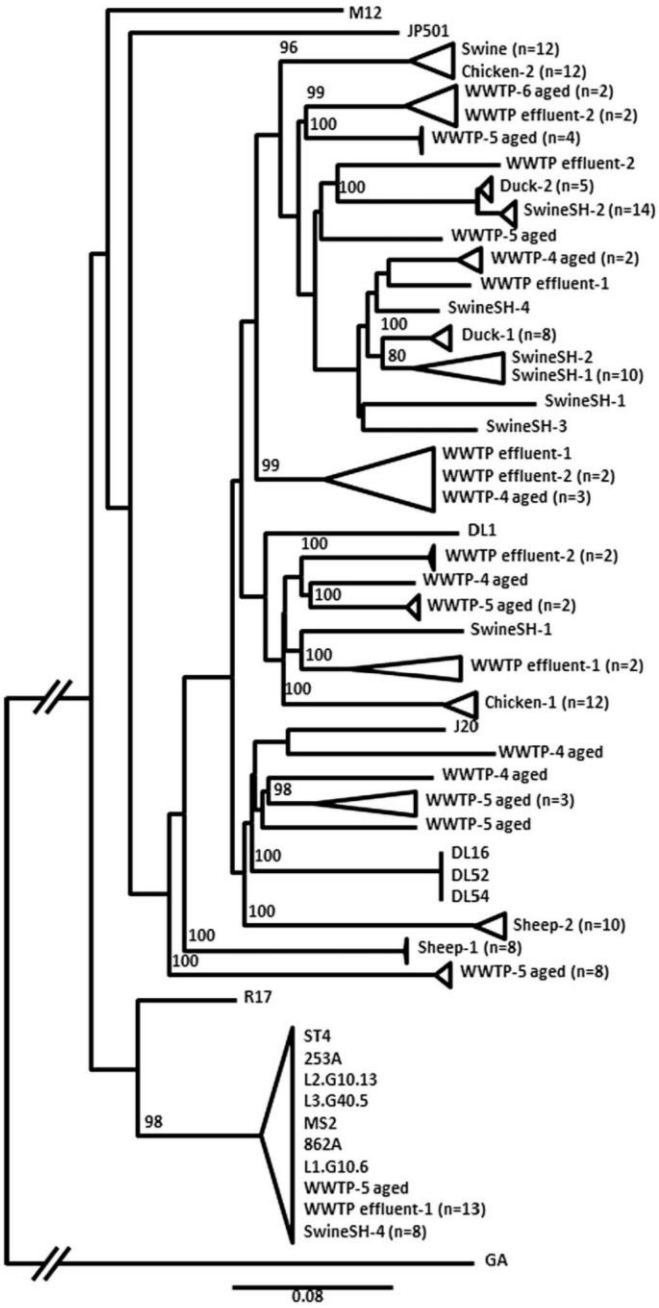

FIG 3 Phylogenetic relationship of FRNAPH-I strains isolated from urban WWTPs and animal slaughterhouse (SH) wastewater or fecal samples based on the maturation protein gene (1,182 nucleotides). Distances were determined by using the K2P model, and the tree was plotted by the BioNJ method. FRNAPH-II GA (NC_001426.1) was used as an outgroup. Only bootstrap values >70% are shown.

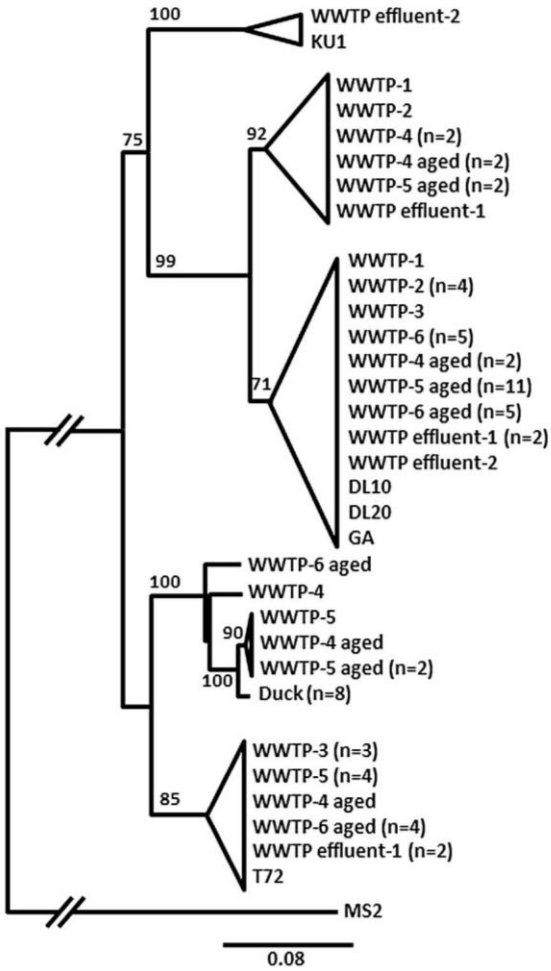

FIG 4 Phylogenetic relationship of FRNAPH-II strains isolated from urban WWTPs and a duck fecal sample based on the maturation protein gene (1,173 nucleotides). Distances were determined by using the K2P model, and the tree was plotted by the BioNJ method. FRNAPH-I MS2 (NC_001417.2) was used as an outgroup. Only bootstrap values >70% are shown.

II, all FRNAPH-III strains were detected by using the multiplex RT-PCR designed by Wolf et al. (22), but the genetic difference between cattle strains was confirmed by the RT-PCR method proposed by Ogorzaly and Gantzer (33) targeting a coat protein gene region. Using the latter, no FRNAPH strains isolated from the CattleSH samples were characterized, whereas all those tested ($n = 24$), isolated from the urban WWTP samples, including the 4 strains forming the cluster close to the CattleSH group, gave a positive signal for subgroup III.

DISCUSSION

The present work aimed to study F-specific RNA phages (FRNAPH) in stool or wastewater and, in particular, their use as tracers to differentiate urban from animal fecal contamination.

FRNAPH have been used for years as fecal pollution indicators in the environment (36, 37) because of their high prevalence and concentration in stool or wastewater. Our results confirmed this application because FRNAPH were found in very high concentrations in all animal or urban wastewater. Concentrations ranged between 2.3 and 5.2 $\log_{10}$ PFU/ml in wastewater when using the double-agar-layer technique. In comparison, other authors detected infectious FRNAPH concentrations of 2.9 to 4.2 $\log_{10}$ PFU/ml in urban wastewater (15, 38–40), while Schaper et al. (13) observed concentrations ranging from 3.4 to 4.6 $\log_{10}$ PFU/ml in slaughterhouse wastewater. Genome concentrations ranged between 4.7 and 6.8 $\log_{10}$ gc/ml. This type of analysis has been less frequently described in the literature; Wolf et al. (22) observed an

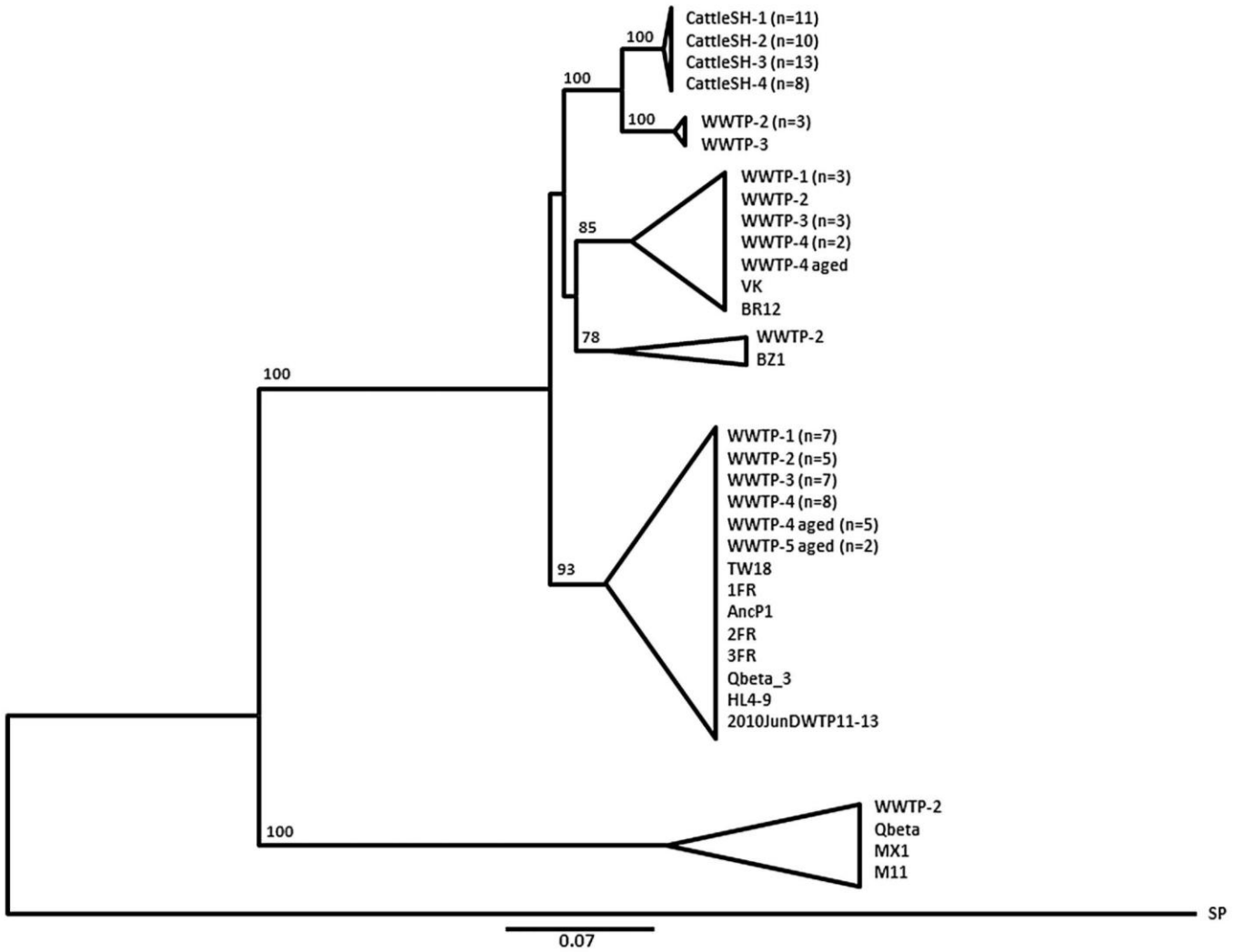

FIG 5 Phylogenetic relationship of FRNAPH-III strains isolated from urban WWTP and cattle slaughterhouse (CattleSH) wastewater based on partial nucleotide sequences of the maturation protein gene (380 nucleotides). Distances were determined by using the K2P model, and the tree was plotted by the BioNJ method. FRNAPH-IV SP (X07489.1) was used as an outgroup. Clusters with bootstrap values >70% are collapsed.

average concentration of 3.5 $\log_{10}$ gc/ml in raw urban wastewater, while Hata et al. (40) and Flannery et al. (41) detected only about 2.0 $\log_{10}$ gc/ml. In these last two studies, genomes were detected in lower concentration than infectious FRNAPH, which suggests an underestimation of genome concentration. In our samples, the ratio of genomes to infectious phages ranged from 1.5 to 2.6 $\log_{10}$.

The prevalence in animal stool samples was found to be low as previously described (12, 42), but, in the case of positivity, concentrations were significant. They ranged between 1.1 and 5.0 $\log_{10}$ PFU/g for infectious FRNAPH and between 3.7 and 8.9 $\log_{10}$ gc/g for genomes. To sum up, the FRNAPH concentrations obtained in this study are very similar to those reported in the literature.

The main goal of the present work was to investigate the potential of FRNAPH to differentiate between urban and animal pollution. Genotyping before or after culture using the RT-PCR method designed by Wolf et al. (22) clearly confirmed the predominance of FRNAPH-I in stool or wastewater of animal origin and the predominance of FRNAPH-II and -III in raw urban wastewater, as described in other studies (12, 13, 15, 43, 44). Unfortunately, our results also underlined that FRNAPH genotyping is not sufficient to determine the origin of fecal contamination, since FRNAPH-II and -III were also detected in animal samples. In the same way, the FRNAPH-I genome was detected in urban wastewater. Further knowledge on the variability of sequences within each subgroup according to their animal or urban origin is therefore clearly needed to use FRNAPH as an indicator of the origin of fecal pollution. This was our first objective. We chose to perform sequencing on the maturation protein gene because it shows a high degree of variability (45).

No common point between FRNAPH-I sequences from urban wastewater and those of animal origin was observed. The urban FRNAPH-I strains may have a real human origin, or they may come from variety of animals present in the urban area, but in smaller numbers than the 260,000 inhabitants. In any event, detection of FRNAPH-I by RT-PCR targeting the maturation protein gene does not allow distinguishing urban from animal fecal contamination in the environment. FRNAPH-II was never de-

tected in slaughterhouse wastewater either by direct genomic search or after culture. Nevertheless, 11 FRNAPH-II sequences were isolated in a single duck stool sample. All sequences were identical. In addition, if the primers and probe proposed by Wolf et al. (22) were able to detect the duck isolates, the approach proposed by Ogorzaly and Gantzer (33) was not. Indeed, it appears that, in our experiment, the latter RT-PCR allowed specific detection of urban wastewater FNRAPH-II isolates, even if some isolates were missed.

FRNAPH-III strains were more frequently detected in animal wastewater. Forty-two strains were isolated from cattleSH wastewater using RT-PCR as described by Wolf et al. (22). Again, all these sequences clearly clustered together and did not show any overlapping with the urban strains. The RT-PCR method developed by Ogorzaly and Gantzer (33) did not allow detection of these isolates, while it allowed that of the urban strains. The narrow cluster formed by FRNAPH-III isolated from the cattle slaughterhouse and the presence of identical sequences in the samples collected over more than 3 months (December 2013 to March 2014) suggested a specific signature of this slaughterhouse over time. Based on the 5′ end of the maturation protein gene, Stewart et al. (30) also observed genetic variations among FRNAPH-III strains isolated from urban WWTPs and from swine lagoons, with specific strains from each swine lagoon.

Practically speaking, the RT-PCR assays designed by Ogorzaly and Gantzer (33) seem more specific for urban FRNAPH-II and -III than those designed by Wolf et al. (22). Such a high degree of specificity is explained by the use of minor groove binder (MGB) probes (46). These results show the bias related to the choice of primers/probes and their spectral detection, but such a choice may be of benefit depending on the strategy pursued. If detection of all FRNAPH is required, the probes designed by Wolf et al. (22) may be more suitable as they provide better sensitivity (18). Their recent design based on all sequences available in GenBank in 2010 may confer the largest spectrum of detection, while Ogorzaly's and Gantzer's FRNAPH-II and -III probes (33) may be preferable for microbial source tracking.

If specificity is an important point, persistence of FRNAPH in the environment is another one. It has been clearly demonstrated in the literature that FRNAPH subgroups have different survival rates in the environment. Their behavior has already been studied using prototypic phages. Yang and Griffiths (24) observed better persistence of infectious MS2 (FRNAPH-I) and GA (FRNAPH-II) than of Qbeta (FRNAPH-III) under various conditions. Muniesa et al. (23) reached the same conclusion by studying naturally occurring infectious FRNAPH in environmental waters (*in situ* conditions). Nevertheless, levels of persistence of the genomes of the subgroups have never been compared in natural waters. Since it is clearly admitted that the viral genome is more resistant than infectious (47–51), our second objective was to study the inactivation rate of infectious FRNAPH and the persistence of each subgroup genome. Two situations were explored: the persistence over time in raw wastewater at 4°C and the impact of a standard wastewater treatment plant. The parameters used during persistence experiments were set to limit the growth of bacteria and yeasts in samples and to be the most favorable for a long survival of FRNAPH.

Even if the genome of FRNAPH-I fell just above the significance threshold as being more resistant than those of FRNAPH-II and -III, on the whole, genomes were more persistent than infectious, with a loss of less than 1.0 $\log_{10}$ after 60 days, versus 2.5 $\log_{10}$ for infectivity. Infectious FRNAPH-I and -II strains had the best survival rates, with a ratio of 1:1 in wastewater after 60 days. Infectious FRNAPH-III strains were the least resistant because, although they were in the majority in raw wastewater (>90%), they were in the minority after 3 days and they were no longer detected after 50 days of incubation.

During water treatment (activated-sludge process), infectious FRNAPH concentration was reduced by 2.4 $\log_{10}$. In WWTPs with similar water treatment systems, De Luca et al. (52) and Hata et al. (40) observed a decrease in the number of infectious FRNAPH of 3 $\log_{10}$, while Lucena et al. (53) noted a reduction of 2 $\log_{10}$ in winter and 3 $\log_{10}$ in summer. In effluents, infectious FNRAPH-I prevailed, with the presence of a few FRNAPH-II strains, but only the FRNAPH-I genome was detectable. Given that the persistence of FRNAPH-I is close to that of FRNAPH-II, it may be supposed that FRNAPH-II strains were physically eliminated during the process. Other studies demonstrated that infectious FRNAPH-I strains showed higher resistance to water treatment using activated sludge, while FRNAPH-II strains were strongly adsorbed on activated sludge but remained infectious (15, 54), which may be explained by different surface properties depending on the subgroup (55).

In our study, the high prevalence of FRNAPH-III before treatment as opposed to that of FRNAPH-I after treatment indicates that the reduction observed was mainly due to FRNAPH-III disappearance. We may hypothesize that the more FRNAPH-III strains there are in raw water, the higher the estimated removal rate will be, and the more FRNAPH-I strains there are, the lower the removal rate will be. For this reason, it may be interesting to perform genotyping before studying removal treatment when FRNAPH strains are used as surrogates.

To conclude, this study has brought forward important considerations when using FRNAPH as a tool to differentiate urban from animal fecal contamination. FRNAPH-I genome sequences did not show any specific clusters of urban or animal origin and thus cannot allow molecular tools to be designed for differentiation. However, as they were the most resistant in wastewater and during water treatment, they may be used as fecal or viral indicators. FRNAPH-II's low prevalence and low sequence variability in animal stool, combined with specific clusters formed by urban strains, allows it to be related to urban pollution by using specific RT-PCR such as the one developed by Ogorzaly and Gantzer (33). Its resistance over time was comparable to that of FRNAPH-I, but its surface properties may have allowed more elimination during activated-sludge treatment, requiring the use of sensitive methods to detect it in the environment. FRNAPH-III's low sequence variability in animal wastewater, combined with specific clusters formed by urban strains, also allows differentiation between urban and animal pollution by using the RT-PCR approach of Ogorzaly and Gantzer (33). However, its very low resistance over time or during water treatment restricts its use to recent fecal contaminations by raw wastewater. FRNAPH-IV was too rare to be used.

ACKNOWLEDGMENTS

The work has been partly funded by Agence de l'Eau Seine Normandie (AESN), Zone Atelier du bassin de la Moselle (ZAbM), and Institut Carnot Energie et Environnement en Lorraine (ICEEL). It has also been supported by Unité Mixte Technologique ViroControl.

We thank Labeo Manche for the supply of samples.

REFERENCES

1. **Ashbolt NJ.** 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicology **198:**229–238. http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.030.
2. **Field KG, Samadpour M.** 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. Water Res **41:**3517–3538. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.056.
3. **Tallon P, Magajna B, Lofranco C, Leung KT.** 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. Water Air Soil Pollut **166:**139–166. http://dx.doi.org/10.1007/s11270-005-7905-4.
4. **Chalmers JWT, McMillan JH.** 1995. An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. Epidemiol Infect **115:**163–167. http://dx.doi.org/10.1017/S0950268800058222.
5. **DePaola A, Jones JL, Woods J, Burkhardt W, III, Calci KR, Krantz JA, Bowers JC, Kasturi K, Byars RH, Jacobs E, Williams-Hill D, Nabe K.** 2010. Bacterial and viral pathogens in live oysters: 2007 United States market survey. Appl Environ Microbiol **76:**2754–2768. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02590-09.
6. **Gordon DM, Cowling A.** 2003. The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiology **149:**3575–3586. http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26486-0.
7. **Soller JA, Schoen ME, Bartrand T, Ravenscroft JE, Ashbolt NJ.** 2010. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. Water Res **44:**4674–4691. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.049.
8. **Bollback JP, Huelsenbeck JP.** 2001. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family Leviviridae). J Mol Evol **52:**117–128. http://dx.doi.org/10.1007/s002390010140.
9. **Grabow WOK.** 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. Water SA **27:**251–268. http://dx.doi.org/10.4314/wsa.v27i2.4999.
10. **Marti E, Monclús H, Jofre J, Rodriguez-Roda I, Comas J, Balcázar JL.** 2011. Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR). Bioresour Technol **102:**5004–5009. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.068.
11. **Jebri S, Hmaied F, Jofre J, Mariem Y, Mendez J, Barkallah I, Hamdi M.** 2013. Effect of gamma irradiation on bacteriophages used as viral indicators. Water Res **47:**3673–3678. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.036.
12. **Cole D, Long SC, Sobsey MD.** 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. Appl Environ Microbiol **69:**6507–6514. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003.
13. **Schaper M, Jofre J, Uys M, Grabow WOK.** 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. J Appl Microbiol **92:**657–667. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01600.x.
14. **Ogorzaly L, Tissier A, Bertrand I, Maul A, Gantzer C.** 2009. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. Water Res **43:**1257–1264. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.011.
15. **Haramoto E, Otagiri M, Morita H, Kitajima M.** 2012. Genogroup distribution of F-specific coliphages in wastewater and river water in the Kofu basin in Japan. Lett Appl Microbiol **54:**367–373. http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03221.x.
16. **Mieszkin S, Caprais MP, Le Mennec C, Le Goff M, Edge TA, Gourmelon M.** 2013. Identification of the origin of faecal contamination in estuarine oysters using Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophage markers. J Appl Microbiol **115:**897–907. http://dx.doi.org/10.1111/jam.12260.
17. **Wolf S, Hewitt J, Rivera-Aban M, Greening GE.** 2008. Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. J Virol Methods **149:**123–128. http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.12.012.
18. **Haramoto E, Kitajima M, Katayama H, Asami M, Akiba M, Kunikane S.** 2009. Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan. Water Res **43:**3759–3764. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.043.
19. **Sundram A, Jumanlal N, Ehlers M.** 2007. Genotyping of F-RNA coliphages isolated from wastewater and river water samples. Water SA **32:**65–70. http://dx.doi.org/10.4314/wsa.v32i1.5241.
20. **Lee JE, Lim MY, Kim SY, Lee S, Lee H, Oh HM, Hur HG, Ko G.** 2009. Molecular characterization of bacteriophages for microbial source tracking in Korea. Appl Environ Microbiol **75:**7107–7114. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00464-09.
21. **Harwood VJ, Boehm AB, Sassoubre LM, Vijayavel K, Stewart JR, Fong TT, Caprais MP, Converse RR, Diston D, Ebdon J, Fuhrman JA, Gourmelon M, Gentry-Shields J, Griffith JF, Kashian DR, Noble RT, Taylor H, Wicki M.** 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. Water Res **47:**6929–6943. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.064.
22. **Wolf S, Hewitt J, Greening GE.** 2010. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. Appl Environ Microbiol **76:**1388–1394. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02249-09.
23. **Muniesa M, Payan A, Moce-Llivina L, Blanch AR, Jofre J.** 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. Water Res **43:**1559–1564. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.038.
24. **Yang Y, Griffiths MW.** 2013. Comparative persistence of subgroups of F-specific RNA phages in river water. Appl Environ Microbiol **79:**4564–4567. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00612-13.
25. **Long SC, Sobsey MD.** 2004. A comparison of the survival of F+RNA and F+DNA coliphages in lake water microcosms. J Water Health **2:**15–22.
26. **Schaper M, Duran AE, Jofre J.** 2002. Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. Appl Environ Microbiol **68:**3702–3707. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.8.3702-3707.2002.
27. **Stewart-Pullaro J, Daugomah JW, Chestnut DE, Graves DA, Sobsey MD, Scott GI.** 2006. F+ RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters. J Appl Microbiol **101:**1015–1026. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03011.x.
28. **Brion GM, Meschke JS, Sobsey MD.** 2002. F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. Water Res **36:**2419–2425. http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00547-4.
29. **Griffin DW, Stokes R, Rose JB, Paul JH, III.** 2000. RNA coliphage assay to identify fecal sources in Homosassa. Microb Ecol **39:**56–64. http://dx.doi.org/10.1007/s002489900193.
30. **Stewart JR, Vinje J, Oudejans SJG, Scott GI, Sobsey MD.** 2006. Sequence variation among group III F-specific RNA coliphages from water samples and swine lagoons. Appl Environ Microbiol **72:**1226–1230. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.2.1226-1230.2006.
31. **International Organization for Standardization.** 2001. ISO 10705-1. Water quality: detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
32. **Havelaar AH, Hogeboom WM.** 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J Appl Bacteriol **56:**439–447. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01372.x.
33. **Ogorzaly L, Gantzer C.** 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. J Virol Methods **138:**131–139. http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004.
34. **Gouy M, Guindon S, Gascuel O.** 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol **27:**221–224. http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp259.
35. **Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM.** 2007. Primer3Plus, an enhanced Web interface to Primer3. Nucleic Acids Res **35:**W71–W74. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm306.
36. **Yahya M, Hmaied F, Jebri S, Jofre J, Hamdi M.** 2015. Bacteriophages as indicators of human and animal fecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. J Appl Microbiol **118:**1217–1225. http://dx.doi.org/10.1111/jam.12774.
37. **Lucena F, Ribas F, Duran AE, Skraber S, Gantzer C, Campos C, Morón A, Calderón E, Jofre J.** 2006. Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. J Appl Microbiol **101:**96–102. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02907.x.
38. **Lucena F, Méndez X, Morón A, Calderón E, Campos C, Guerrero A, Cárdenas M, Gantzer C, Shwartzbrood L, Skraber S, Jofre J.** 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. J Appl Microbiol **94:**808–815. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x.
39. **Contreras-Coll N, Lucena F, Mooijman K, Havelaar A, Pierz V, Boque**

M, Gawler A, Höller C, Lambiri M, Mirolo G, Moreno B, Niemi M, Sommer R, Valentin B, Wiedenmann A, Young V, Jofre J. 2002. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. Water Res **36:**4963–4974. http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00229-4.

40. **Hata A, Kitajima M, Katayama H.** 2013. Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. J Appl Microbiol **114:**545–554. http://dx.doi.org/10.1111/jam.12051.
41. **Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Doré W.** 2013. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. Water Res **47:**5222–5231. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.008.
42. **Mauffret A, Caprais MP, Gourmelon M.** 2012. Relevance of Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophages for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. Appl Environ Microbiol **78:**5143–5152. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00315-12.
43. **Blanch AR, Belanche-Muñoz L, Bonjoch X, Ebdon J, Gantzer C, Lucena F, Ottoson J, Kourtis C, Iversen A, Kühn I, Mocé L, Muniesa M, Schwartzbrod J, Skraber S, Papageorgiou GT, Taylor H, Wallis J, Jofre J.** 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. Appl Environ Microbiol **72:**5915–5926. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02453-05.
44. **Noble RT, Allen SM, Blackwood AD, Chu W, Jiang SC, Lovelace GL, Sobsey MD, Stewart JR, Wait DA.** 2003. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. J Water Health **1:**195–207.
45. **Friedman SD, Genthner FJ, Gentry J, Sobsey MD, Vinjé J.** 2009. Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family Leviviridae). J Virol **83:**11233–11243. http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01308-09.
46. **Yao Y, Nellåker C, Karlsson H.** 2006. Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: influence of mismatches and template complexity on quantification. Mol Cell Probes **20:**311–316. http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2006.03.003.
47. **Gassilloud B, Schwartzbrod L, Gantzer C.** 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? Appl Environ Microbiol **69:**3965–3969. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003.
48. **Skraber S, Gassilloud B, Schwartzbrod L, 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 Res **38:**2927–2933. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2004.03.041.
49. **Fong TT, Lipp EK.** 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. Microbiol Mol Biol Rev **69:**357–371. http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005.
50. **Choi S, Jiang SC.** 2005. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. Appl Environ Microbiol **71:**7426–7433. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.11.7426-7433.2005.
51. **Ogorzaly L, Bertrand I, Paris M, Maul A, Gantzer C.** 2010. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. Appl Environ Microbiol **76:**8019–8025. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00917-10.
52. **De Luca G, Sacchetti R, Leoni E, Zanetti F.** 2013. Removal of indicator bacteriophages from municipal wastewater by a full-scale membrane bioreactor and a conventional activated sludge process: implications to water reuse. Bioresour Technol **129:**526–531. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.113.
53. **Lucena F, Duran AE, Morón A, Calderón E, Campos C, Gantzer C, Skraber S, Jofre J.** 2004. Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. J Appl Microbiol **97:**1069–1076. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02397.x.
54. **Haramoto E, Fujino S, Otagiri M.** 2015. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. Sci Total Environ **520:**32–38. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.034.
55. **Dika C, Ly-Chatain MH, Francius G, Duval JFL, Gantzer C.** 2013. Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp **435:**178–187. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.045.

III. LA CONCENTRATION DES FRNAPH DEMEURE-T-ELLE TOUJOURS SUPERIEURE A CELLE DES VIRUS ENTERIQUES PATHOGENES DANS LES EAUX USEES ?

De nombreuses études se sont déjà penchées sur la prévalence et le devenir des microorganismes dans les stations d'épuration. Afin d'éviter tout risque de sous-estimation de la pollution, il est en effet important de veiller à ce qu'un indicateur soit toujours plus abondant que le pathogène cible. Globalement, l'ensemble des données provenant de ces études montre que les FRNAPH et autres bactériophages fécaux constituent de bons indicateurs pour évaluer l'élimination des virus entériques pathogènes lors du traitement des eaux usées (McMinn *et al.*, 2017; Pouillot *et al.*, 2015).

Il apparaît néanmoins que puisque la prévalence des pathogènes entériques dans la population est dictée par un cycle épidémique, certaines périodes de l'année sont préférentiellement associées à leur excrétion massive dans les eaux usées. A l'inverse, les FRNAPH appartenant à la flore normale du tractus digestif, leur concentration dans les eaux usées demeure *a priori* plutôt stable au cours du temps.

Dans ce contexte, nous avons souhaité vérifier que la concentration des FRNAPH était toujours supérieure à celle des pathogènes dans les principales sources de pollution de l'environnement, y compris pendant la période épidémique associée à la circulation des souches de virus pathogènes dans la population. Les investigations ont porté sur la recherche des NoV qui constituent la principale étiologie des épidémies de gastro-entérites. Etant donné que dans l'état actuel des connaissances, la détection de ces pathogènes est uniquement réalisable en employant des approches moléculaires, ces mêmes techniques ont été utilisées pour rechercher les différents génogroupes de FRNAPH.

Dans cette étude, les eaux usées brutes ainsi que les effluents d'une station d'épuration ont été analysés hebdomadairement pendant une période de 6 mois encadrant le franchissement du seuil d'alerte épidémique pour les gastro-entérites dans la région concernée **(Figure 17)**. Ces analyses ont également permis d'évaluer et de comparer les abattements de ces différents microorganismes lors du traitement des eaux.

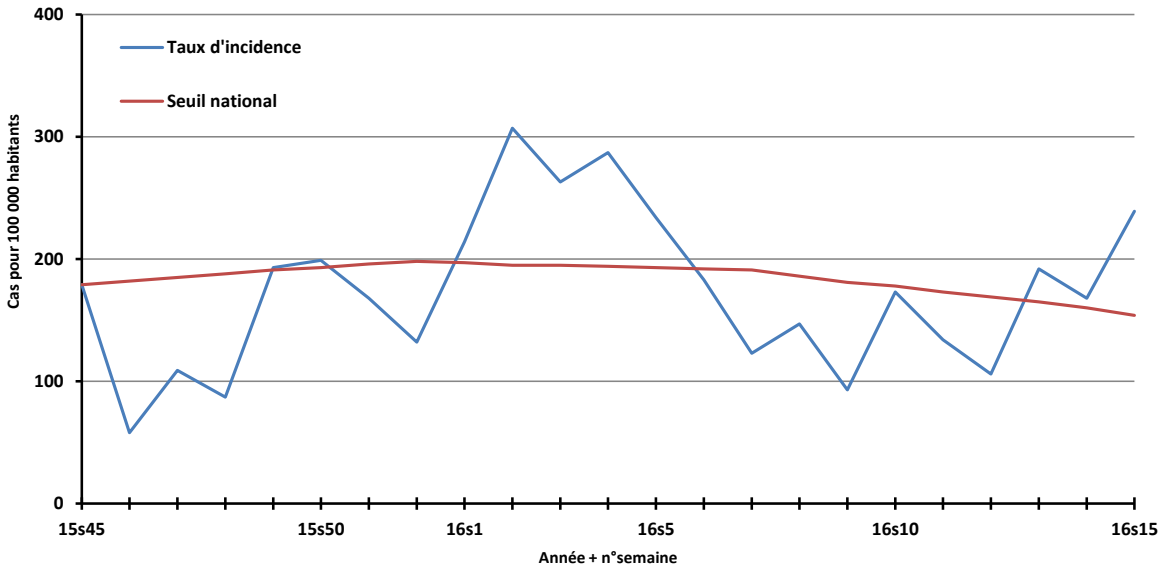

Figure 17 : Taux d'incidence des diarrhées aiguës en Lorraine entre la semaine 2015s45 et 2016s15 (données Réseau Sentinelles, INSERM/UMPC).

Compte tenu des faibles quantités de génomes de FRNAPH détectées dans les effluents des stations d'épuration lors des précédentes études (*i.e.* de l'ordre de 10^2 cg/mL), et puisqu'il en est généralement de même pour les NoV (Eftim *et al.*, 2017; McMinn *et al.*, 2017; Pouillot *et al.*, 2015), une méthode de concentration a été utilisée ici pour l'analyse de ce type d'échantillons. Brièvement, l'utilisation de Centricon® Plus-70 (Merck) a permis de concentrer un volume total de 200 mL d'eaux (3 passages d'environ 60 à 70 mL, centrifugation pendant 3 min puis deux fois 5 min à 3 500 × *g*). Lors du second passage, 10 µL d'une suspension virale de FCV à 10^6 cg/mL ont été ajoutés comme étalon interne pour évaluer le rendement de cette étape. Après le passage de la totalité de l'échantillon, le rétentat a été suspendu dans 1 mL de PBS et 2 mL de tampon de lyse (NucliSENS®, BioMérieux) puis récupéré par centrifugation inverse (1 000 × *g*, 30 sec). Après addition de 3 mL d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1), agitation vigoureuse pendant 30 sec et centrifugation (2 500 × *g*, 3 min), la purification des acides nucléiques a été réalisée à partir de la totalité du surnageant dans 100 µL de tampon d'élution en utilisant le système NucliSENS® easyMAG (BioMérieux). Cette technique de concentration/extraction assure ainsi une LOQ théorique correspondant à 10 cg par puits de PCR (*i.e.* dilution la plus faible de la gamme étalon) de 2,7 cg/mL.

Concernant l'analyse des eaux usées brutes, l'extraction des acides nucléiques a été effectuée à partir d'1 mL d'échantillon, comme décrit dans Hartard *et al.* (2015). Dans ce cas, la LOQ théorique est de 5,3 × 10^2 cg/mL.

La détection des génomes des différents génogroupes de FRNAPH a été réalisée en utilisant les amorces et sondes proposées par Wolf *et al.* (2010) en suivant le protocole détaillé dans Hartard *et al.* (2015) afin d'assurer une meilleure sensibilité. Concernant la recherche des génomes de NoV des génogroupes GI et GII, la technique qui a été utilisée est celle décrite dans la norme ISO 15216 (International Organization for Standardization, 2017).

Dans les eaux usées brutes **(Figure 18)**, les génomes de FRNAPH-I, -II et -III ont été détectés tout au long de l'étude à des concentrations comparables à ce qui avait été observé précédemment (*i.e.* en moyenne 3,5 × 10^3 cg/mL, 3,6 × 10^4 cg/mL et 3,7 × 10^4 cg/mL respectivement). Concernant la recherche des génomes des NoV, 19 des 23 prélèvements réalisés étaient positifs pour le génogroupe GI, tandis que tous les échantillons l'étaient pour le génogroupe GII. Les concentrations moyennes respectives étaient de 6,7 × 10^2 et 4,4 × 10^3 cg/mL. Ces valeurs font partie de la moyenne haute de ce qui est classiquement observé dans la littérature puisque des concentrations de l'ordre de 10^1 à 10^2 cg/mL sont généralement rapportées pour ces deux génogroupes (Hellmer *et al.*, 2014; McMinn *et al.*, 2017; Pouillot *et al.*, 2015). Haramoto *et al.* (2006) observent cependant des concentrations similaires dans les eaux usées de Tokyo pendant la période hivernale.

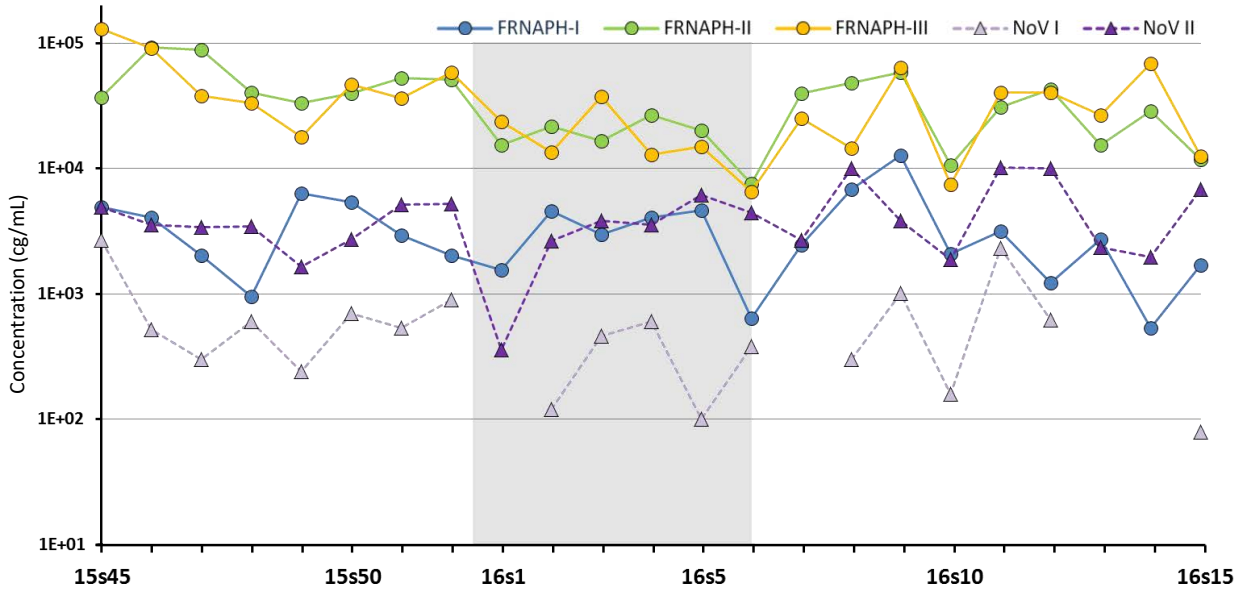

Figure 18 : Concentrations en génomes de FRNAPH-I, -II et -III ainsi que celles des norovirus des génogroupes GI et GII dans les eaux usées brutes en période épidémique de gastro-entérites. La zone grisée correspond au franchissement du seuil d'alerte épidémique concernant l'incidence des gastro-entérites dans la région concernée.

Concernant les effluents de station d'épuration **(Figure 19)**, la recherche du FCV et l'analyse des extraits d'ARN dilués au 1/10ème ont permis respectivement d'évaluer le rendement d'extraction et la présence d'inhibiteurs de (RT-)PCR. Lors de l'extraction de ces échantillons, un rendement moyen de 28,4 % ± 17,3 % a été mesuré, avec un minimum de 6,5 %. Concernant l'inhibition, une valeur moyenne de 56 % ± 8 % a été observée avec un maximum de 73 %.

Les concentrations des trois types de FRNAPH étaient de l'ordre de 10^2 cg/mL et peu de variations ont été observées pendant la période d'échantillonnage. Les génomes des NoV des génogroupes GI et GII ont également été détectés tout au long de l'étude, ce qui peut s'expliquer par la sensibilité de la technique utilisée. Notons en effet, que Pouillot *et al.* (2015) rapportent dans leur méta-analyse l'incapacité de détecter les génomes de NoV dans 50 % des effluents de stations d'épuration. Parmi les échantillons collectés, des concentrations moyennes de 2,6 × 10^0 cg/mL et 2,1 × 10^1 cg/mL ont respectivement été mesurées pour les deux génogroupes, mais des variations importantes sont notées. Il apparaît en effet que ces concentrations étaient significativement supérieures durant la période qui a suivi le franchissement du seuil d'alerte épidémique des gastro-entérites (t-test, $P < 0,05$).

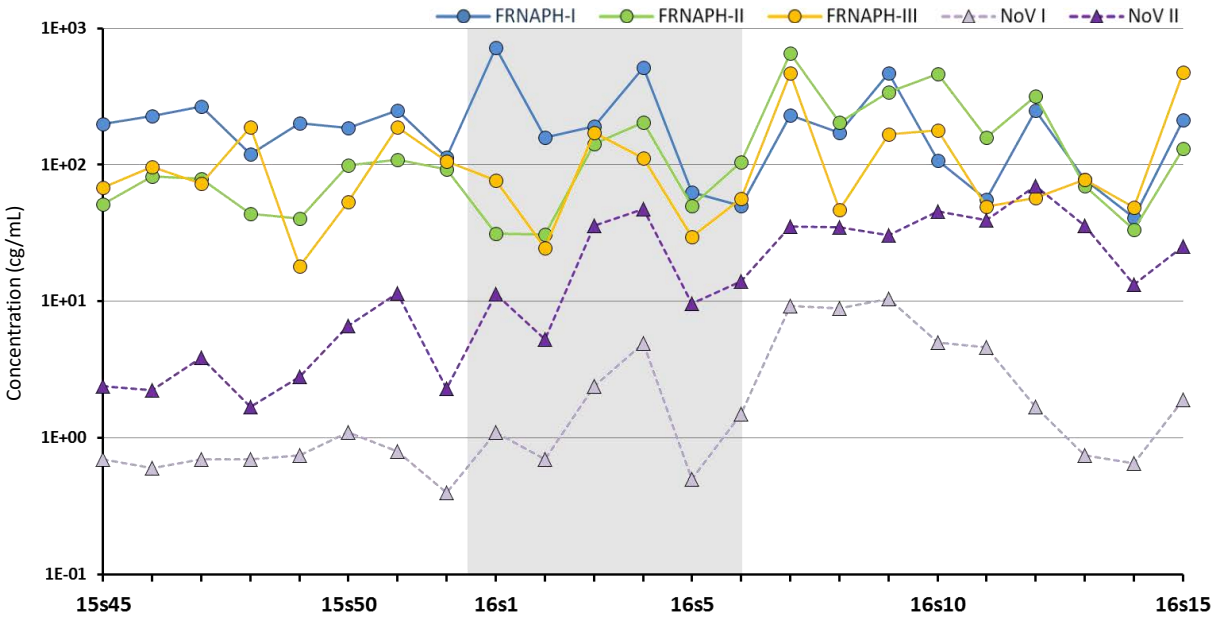

Figure 19 : Concentrations en génomes de FRNAPH-I, -II et -III ainsi que celles des norovirus des génogroupes GI et GII dans les eaux usées traitées en période épidémique de gastro-entérites. La zone grisée correspond au franchissement du seuil d'alerte épidémique concernant l'incidence des gastro-entérites dans la région concernée.

Enfin, si l'on s'intéresse à l'élimination de ces différents microorganismes durant le traitement des eaux usées **(Figure 20)**, des résultats similaires à ceux précédemment observés sont notés pour les FRNAPH, avec une efficacité du traitement des eaux plus marquée concernant l'élimination des FRNAPH-II et -III (*i.e.* abattement de 2,5 ± 0,4 pour les deux génogroupes). Dans le cas des NoV, un abattement moyen de 2,5 ± 0,5 unités logarithmiques est également observé pour chacun des génogroupes, ce qui correspond à des valeurs très proches de celles rapportées dans la méta-analyse réalisée par Pouillot *et al.* (2015) (*i.e.* abattement de 2,4 et 2,9 unités logarithmiques pour les NoV des génogroupes GI et GII dans le cas d'un traitement pas boue activée). L'élimination des FRNAPH-I est quant à elle plus modérée puisqu'un abattement moyen de 1,2 ± 0,4 unité logarithmique a été noté.

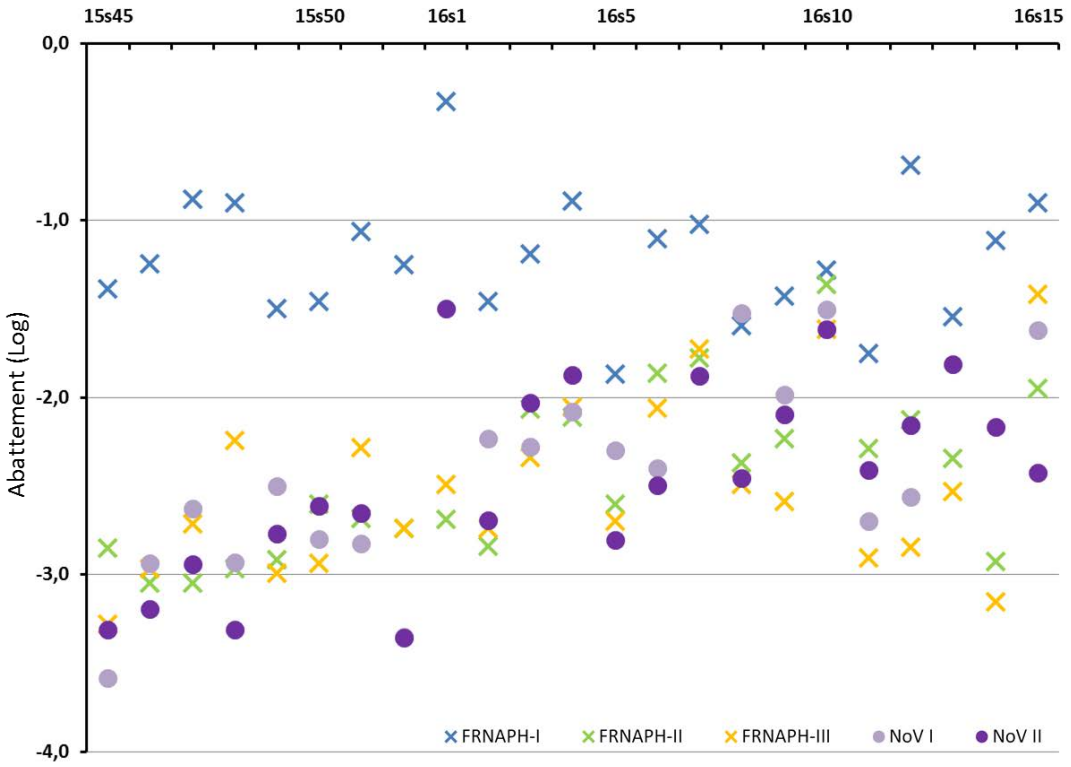

Figure 20 : Elimination des génomes des FRNAPH-I, -II, -III et des norovirus des génogroupes GI et GII lors du traitement des eaux usées.

L'ensemble de ces données confirme donc le potentiel des FRNAPH à évaluer l'élimination des virus entériques pathogènes lors du traitement des eaux usées. En effet, en utilisant la même méthode de détection (*i.e.* RT-PCR), des abattements similaires sont observés entre les NoV et ces indicateurs, en particulier si on s'intéresse aux FRNAPH-II et -III. Par ailleurs, ces résultats renforcent également leur potentiel en tant qu'indicateurs de

contamination virale car, que ce soit dans les eaux usées brutes ou après leur traitement, les concentrations en FRNAPH-II et -III mesurées dans cette étude étaient toujours supérieures à celles des NoV, y compris durant la période la plus critique correspondant au franchissement du seuil d'alerte épidémique. Notons cependant que dans cette étude, bien qu'une augmentation significative de la concentration des NoV ait été notée dans les eaux usées traitées après la période épidémique, cette dernière reste modérée et aucune hausse n'a été observée dans les eaux brutes.

Dans ce sens, la littérature rapporte globalement des concentrations en NoV plus importantes durant la période hivernale par rapport au reste de l'année mais un lien direct avec l'incidence des gastro-entérites dans la population est rarement établi (Haramoto *et al.*, 2006; Katayama *et al.*, 2008; McMinn *et al.*, 2017; Pouillot *et al.*, 2015). Citons toutefois les travaux réalisés en Suède par Hellmer *et al.* (2014) qui rapportent bel et bien une hausse des concentrations des NoV du génogroupe GII dans les eaux usées en lien avec une épidémie de gastro-entérites. Dans cette étude, une augmentation des concentrations d'un facteur 25 est notée dans les eaux usées brutes, bien que ces dernières demeurent globalement faibles (*i.e.* $3{,}2 \times 10^2$ cg/mL au maximum) et que ce phénomène soit observé 2 à 4 semaines avant la déclaration de la majorité des cas de gastro-entérites.

En conclusion de cette partie, nous démontrons que dans les principales sources de contamination fécale de l'environnement (*i.e.* eaux usées brutes et eaux usées traitées), les FRNAPH sont des indicateurs de pollution fécale globale (FRNAPH-I) ou humaine (FRNAPH-II et -III) extrêmement intéressants. Plus précisément, dans le contexte d'une contamination du milieu hydrique ou des coquillages par des NoV provenant d'eaux usées, les FRNAPH et en particulier les FRNAPH-II d'origine humaine, devraient toujours être présents puisque leur concentration est toujours supérieure à celle de ces pathogènes dans les sources de pollution. Ils peuvent donc dans ce cas être proposés comme indicateurs de pollution virale. Les arguments en faveur d'une telle utilisation doivent à présent impérativement être validés dans l'environnement, c'est-à-dire à distance du point de rejet (*e.g.* eaux environnementales, coquillages).

3ème PARTIE

Peut-on utiliser les FRNAPH comme indicateurs de pollution virale dans les matrices hydriques et alimentaires ?

Actuellement, les FRNAPH sont utilisés avec beaucoup de prudence en tant qu'indicateurs de contamination virale, notamment par manque de données ou encore à cause des résultats contradictoires concernant leur corrélation avec les virus entériques pathogènes dans l'environnement. Comme discuté précédemment dans la partie bibliographique de ce document, un biais fréquemment observé dans les études visant à évaluer cette corrélation concerne les méthodes de détection utilisées (*i.e.* culture dans le cas des FRNAPH et techniques de biologie moléculaire dans le cas de la majorité des virus entériques). Dans cette partie, nous avons donc choisi d'étudier cette corrélation en s'affranchissant de cette limite, avec un intérêt poussé pour l'analyse des coquillages et des eaux environnementales.

Afin d'étudier la corrélation entre FRNAPH et NoV, des eaux superficielles et des eaux de mer (n = 32) ont été échantillonnées pendant une période d'un an aux abords d'une zone conchylicole fréquemment impactée par une pollution fécale. Des analyses ont été effectuées simultanément dans des moules (n=8) et des huîtres (n=8) de la zone conchylicole sous influence. Dans les eaux et les coquillages, les différents génogroupes de FRNAPH (particules infectieuses et génomes), les NoV du génogroupe GI et GII, ainsi que *E. coli* et les entérocoques (*i.e.* indicateurs réglementaires de contamination fécale) ont été recherchés. L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication internationale parue dans *Applied and Environmental Microbiology* (Hartard *et al.*, 2016).

Dans les eaux environnementales, *E. coli* a été détecté tout au long de l'année dans 100 % des échantillons confirmant alors le fort niveau de contamination fécale de la zone conchylicole et la proximité de la source de contamination. Les FRNAPH infectieux étaient présents quant à eux dans seulement la moitié des prélèvements et à des concentrations 100 fois inférieures à celles d'*E. coli (i.e.* rarement supérieures à 100 UFP/100 mL). Le génotypage des plages de lyse a quant à lui permis d'identifier une forte prévalence des FRNAPH-I puisqu'ils représentaient 93 % des plages isolées.

Concernant la recherche des génomes de NoV, seulement trois échantillons d'eaux étaient positifs. De manière intéressante, ces trois échantillons ont été collectés au moment où le seuil d'alerte épidémique des gastro-entérites était franchi pour la région en question. Par ailleurs, ces prélèvements étaient également positifs pour la recherche des génomes de FRNAPH-II en utilisant la méthode de détection mise au point par Ogorzaly & Gantzer (2006). Globalement, il semble donc que des volumes d'eau plus importants devraient être concentrés avant l'analyse virologique. Dans la situation explorée, *E. coli* qui est plus abondant que les FRNAPH semble plus efficace pour évaluer la pollution fécale.

L'analyse des coquillages issus de cette zone contaminée a confirmé le fort niveau de pollution fécale tout au long de l'année. En se basant sur la recherche d'*E. coli*, il s'agit d'une zone classée B voire C si on considère uniquement les résultats obtenus lors de l'analyse des lots de moules qui contenaient parfois plus de 4 600 *E. coli*/100 g de FIL (Commission Européenne, 2015; Parlement Européen, 2004). Il apparaît néanmoins que trois lots de coquillages étaient négatifs pour la recherche de cet indicateur. De manière intéressante, tous les lots étaient positifs pour la recherche des FRNAPH infectieux et alors que des concentrations inférieures à celles d'*E. coli* avaient été observées dans les eaux, ce rapport est inversé dans les coquillages et des concentrations pouvant atteindre 566 UFP/g d'hépatopancréas ont été relevées. Tandis qu'aucune tendance saisonnière n'a été observée dans le cas d'*E. coli*, les concentrations les plus importantes en FRNAPH infectieux ont été mesurées en hiver. Enfin, une forte corrélation est démontrée entre les génomes de FRNAPH-II et ceux des NoV dans ces lots de coquillages.

L'intérêt des FRNAPH comme indicateurs de contamination fécale des coquillages a déjà été rapporté dans la littérature en raison de leur meilleure survie et de leur meilleure accumulation dans ce type de matrice par rapport à *E. coli* (Doré *et al.*, 1998; Lees, 2000). Dans cette étude, la recherche des FRNAPH infectieux a en effet permis d'identifier pour certains lots une contamination en l'absence des indicateurs bactériens réglementaires. La corrélation entre les génomes de FRNAPH-II et de NoV est démontrée, même si un nombre limité d'échantillons a été analysé (n = 16). Ces observations nous ont conduit à analyser des lots provenant d'autres zones conchylicoles européennes qui présentaient globalement un niveau de contamination moindre en se basant sur la recherche d'*E. coli*. L'analyse de 28 lots (Hartard *et al.*, 2016) puis de 111 échantillons supplémentaires (Hartard *et al.*, acceptée en octobre 2017) a permis de confirmer la corrélation entre la présence des génomes de FRNAPH-II et la présence des NoV dans les coquillages, quel que soit le niveau de contamination fécale.

En conclusion, nous démontrons ici une corrélation entre les FRNAPH-II et les NoV humains dans les eaux environnementales et les fruits de mer. A noter que cette corrélation est établie en utilisant des méthodes moléculaires pour la recherche des deux virus. L'intérêt des FRNAPH-II par rapport aux indicateurs conventionnels comme *E. coli* semble donc particulièrement intéressant dans les coquillages pour évaluer la pollution virale. En effet, un des principaux avantages des FRNAPH est que leur caractère infectieux est facile à vérifier mais encore faudrait-il disposer d'un outil rapide et sensible capable de détecter les FRNAPH infectieux de chacun des génogroupes.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Applied and Environmental Microbiology

Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters

C. Hartard,[a,b,c] S. Banas,[a,b,c] J. Loutreul,[d] A. Rincé,[e] F. Benoit,[f] N. Boudaud,[d] C. Gantzer[a,b,c]

Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy, France[a]; CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy, France[b]; Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, Vandœuvre-lès-Nancy, France[c]; Actalia, Food Safety Department, Saint-Lô, France[d]; Normandie Université, UNICAEN, U2RM, Caen, France[e]; LABEO Manche, Saint-Lô, France[f]

ABSTRACT

Human noroviruses (HuNoVs) are the main cause of shellfish-borne gastroenteritis outbreaks. In the absence of routine technical approaches allowing infectious particles to be detected, this viral pathogen is currently targeted by genome research, leading to difficult interpretations. In this study, we investigated the potential of F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) as fecal and viral contamination indicators in shellfish and water from a local harvesting area. FRNAPH were also used as microbial source tracking tools. Constraints imposed by detection limits are illustrated here by the detection of infectious FRNAPH in several samples in the absence of FRNAPH genomes. The opposite situation was also observed, likely explained by the persistence of the genomes being greater than infectivity. Similar considerations may be applied to HuNoVs, suggesting that HuNoV genome targeting is of limited relevance in assessing infectious risks. While FRNAPH did not provide any benefits compared to *Escherichia coli* as fecal pollution indicators in water, novel observations were made in shellfish: contrary to *E. coli*, a seasonal trend of infectious FRNAPH concentrations was observed. These concentrations were higher than those found in water, confirming bioaccumulation in shellfish. This study also underlines a relationship between the presence of HuNoV genomes and those of human-specific FRNAPH subgroup II (FRNAPH-II) in shellfish collected throughout Europe. Further research should be undertaken to evaluate FRNAPH potential as an indicator of the presence of infectious HuNoVs. To this end, shellfish involved in HuNoV-caused gastroenteritis outbreaks should be analyzed for the presence of infectious FRNAPH-II.

IMPORTANCE

This work provides new data about the use of F-specific RNA phages (FRNAPH) as a tool for evaluating fecal or viral contamination, especially in shellfish. In our case study, FRNAPH did not provide any benefits compared to *E. coli* as fecal pollution indicators in water but were found to be very useful in shellfish. Their concentrations in shellfish were higher than those found in the surrounding water, confirming bioaccumulation. This study also underlines a relationship between the presence of human norovirus genomes (HuNoVs) and those of FRNAPH subgroup II (FRNAPH-II). Considering that the two virus types have similar behaviors and since FRNAPH infectivity can be investigated, the specific detection of infectious FRNAPH-II could be regarded as an indication of the presence of infectious HuNoVs. The contribution of infectious human FRNAPH targeting for assessing the viral risk associated with HuNoVs in shellfish should thus be investigated.

Human-pathogenic enteric viruses (e.g., human noroviruses [HuNoVs] and hepatitis A virus [HAV]) may affect coastal waters, mainly through human fecal pollution resulting from the disruption of urban wastewater treatment plants or the leaching of agricultural soils amended with urban sewage sludge. A minor part of these viruses may also come from animal fecal pollution (e.g., hepatitis E virus). Oysters, which are able to concentrate such viruses, are implicated in a large number of outbreaks, mainly due to HuNoVs (1–4), despite European regulations on the matter.

In Europe, the microbiological quality of shellfish-harvesting areas is subject to EC regulation 854/2004 (5). Areas are classified according to their levels of fecal contamination estimated by *Escherichia coli* detection in shellfish flesh and intravalvular liquid (FIL). Areas with less than 230 most probable number (MPN) of *E. coli* per 100 g of FIL can be harvested for direct human consumption. For higher concentrations, depuration or relaying is needed, and when the limit of 46,000 MPN of *E. coli* per 100 g of FIL is exceeded, shellfish are considered unfit for human consumption. There is no doubt that for high concentrations of *E. coli*, the risk of viral infection is significant. Nevertheless, the absence of *E. coli*, with or without depuration, is no guarantee of the absence of infectious viruses, and shellfish compliant with European Union (EU) legislation may be involved in outbreaks (3, 6, 7). The reasons are well known today: *E. coli* is (i) less resistant than viruses in the environment (8, 9), (ii) more affected by depuration procedures (10–12), and (iii) also potentially less accumulated than enteric viruses in shellfish because of the presence of specific receptors, especially for HuNoVs (13–15).

Over the past few decades, molecular methods have been greatly improved, and an ISO standard for the detection of

Received 19 May 2016 Accepted 8 July 2016
Accepted manuscript posted online 15 July 2016
Citation Hartard C, Banas S, Loutreul J, Rincé A, Benoit F, Boudaud N, Gantzer C. 2016. Relevance of F-specific RNA bacteriophages in assessing human norovirus risk in shellfish and environmental waters. Appl Environ Microbiol 82:5709–5719. doi:10.1128/AEM.01528-16.
Editor: C. A. Elkins, FDA Center for Food Safety and Applied Nutrition
Address correspondence to C. Gantzer, christophe.gantzer@univ-lorraine.fr.
Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

HuNoVs and HAV in bivalve molluscan shellfish is now available (16). Such an approach appears to be ideal because of its high sensitivity, rapidity, and specificity. However, molecular methods are not without significant drawbacks. These techniques may underestimate the viral load because of the low sample mass used for detection (17), low extraction yields, the presence of reverse transcription-PCR (RT-PCR) inhibitors (4), and the possible presence of other nontargeted viruses. Consequently, laboratories sometimes fail to detect the presence of HuNoV genomes in oysters involved in global HuNoV gastroenteritis outbreaks (17). On the other hand, a very high overestimation of the infectious risk may also occur (17–19) because of the persistence of viral genomes being greater than viral infectivity (20–23), especially after disinfection treatment. It has been suggested that as shellfish are not able to bioaccumulate NoV RNA fragments present in seawater (24), the genomes detected in shellfish mainly result from infectious virus accumulation. However, genomes in a capsid are not systematically synonymous with infectivity, and recent data have shown that some inactivating treatments, especially UV radiation, cause damage leading to inactivated viral particles but do not affect the binding function (25). In addition to natural UV radiation, this type of radiation is commonly used to treat water used during the shellfish depuration process but also for wastewater treatment, which may impact the shellfish-harvesting areas. It significantly reduces viral infectivity by causing genome damage and, to a lesser extent, by altering capsid proteins. Thereby, the resulting inactivated viral particles should still be able to accumulate in shellfish, and short RNA fragments targeted by molecular techniques remain detectable (26–28), which can explain the high prevalence of HuNoV genomes detected in shellfish. In this context, the 5.0% to 76.2% positive results for the detection of HuNoV genomes in shellfish intended for commercial use (17, 29–37) are difficult to interpret in terms of infectious risk. Although the dose-response concept is often observed (3, 18), HuNoV genome levels may be sometimes low in shellfish commodities involved in HuNoV gastroenteritis outbreaks (19) and may be high in nonoutbreak-related samples (18).

In this context, other indicators have been proposed to evaluate the level of viral pollution and the associated risks. F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) have been proposed as suitable viral indicators, especially in shellfish (38–42), due to their common presence in wastewater and their structural similarity to many enteric viruses (nonenveloped single-stranded RNA viruses, 20 to 30 nm in diameter). They are divided into 4 subgroups, present either in animal (FRNAPH subgroup I [FRNAPH-I] and FRNAPH-IV) or human waste (FRNAPH-II and FRNAPH-III), with various degrees of certainty (43–46). They can be detected by specific RT-PCR methods, allowing the genome of each subgroup to be quantified (47, 48), or by rapid culture that provides information about their infectivity. As with HuNoVs, FRNAPH show greater persistence than *E. coli* in the environment (49, 50), and several studies underline a relationship between HuNoVs and FRNAPH in shellfish (34, 35, 39, 41, 51) and seasonal variation in FRNAPH concentration, displaying the trend of shellfish-associated gastroenteritis (39, 40, 52), thus attesting to their potential.

The aim of this study was first to evaluate the value of FRNAPH as fecal or viral pollution indicators in shellfish and environmental waters from a designated harvesting area and as specific human fecal pollution markers. To evaluate their value as fecal markers, the level of infectious FRNAPH was compared to those of *E. coli* and enterococci in waters and mollusks. Their value as viral pollution indicators was evaluated by comparing the level of FRNAPH genomes to those of NoV genogroup I (NoV GI) and NoV GII, taking into account that FRNAPH infectivity can easily be assessed, unlike that of NoV. Because NoV GI and NoV GII are human-specific-pathogenic viruses, the ability of FRNAPH-II and -III to track a human pollution event could also be evaluated. Finally, the investigation of the relationship between the levels of FRNAPH and HuNoV genomes was expanded to include shellfish collected from different harvesting areas throughout Europe.

MATERIALS AND METHODS

Water sample preparation. Thirty-two water samples were collected from a coastal region located in western France between January 2014 and January 2015. Samples came from 4 areas located near a local shellfish-harvesting area (Fig. 1): stream 1 ($n = 8$ samples of fresh water) flowing into estuary 2 ($n = 8$ samples of brackish water), and stream 3 ($n = 8$ samples of fresh water) flowing more slowly into estuary 4 ($n = 8$ samples of brackish water). For each sampling, 450 ml of water was collected in sterile bottles and kept at −20°C until analyzed.

Analyses were performed either directly from water samples or after concentration by ultracentrifugation. Concentration was performed from 2 × 200 ml of water in 2 polyallomer centrifuge bottles (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in an A-621 fixed-angle rotor (Thermo Scientific) at 21,000 rpm (67,000 × *g*), for 18 h at 4°C. The first bottle was used for the enumeration of infectious FRNAPH and the second for the detection of FRNAPH and HuNoV genomes. In the second bottle, 100 μl of a feline calicivirus suspension (FCV) adjusted to 10^6 genome copies (gc)/ml was added before ultracentrifugation as an internal standard. As described below, for each experiment, the same volume of the FCV suspension was extracted in parallel, and a standard curve was generated from a 10-fold dilution series in order to estimate the yields of the concentration and extraction methods for each sample.

Shellfish sample preparation. Eight batches of oysters (*Crassostrea gigas*) and 8 batches of mussels (*Mytilus edulis*) were collected during the study period from a harvesting area essentially impacted by stream 3 and estuary 4 (Fig. 1). The area is classified as B, according to EC regulation 854/2004 (5). Twenty-eight batches of oysters intended for marketing were additionally collected between January and March 2016 from several harvesting areas throughout Europe (France, Ireland, and Portugal).

After collection, shellfish were kept at 4°C and were shucked and dissected within 12 h. Hepatopancreas (HP) fragments were divided from several specimens, according to ISO/TS standard 15216-1 (16). They were then kept at −20°C until analyzed. A weight estimate based on 5 specimens allowed a determination that the HP fraction represented 5.0% ± 0.7% (wt/wt) of the total FIL mass (data not shown). After thawing, 4 g of digestive tissues was mixed with 4 ml of phosphate-buffered saline (PBS) for 3 min in a DT-20 tube with Ultra-Turrax tube drive (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany). One-quarter of the suspension volume (corresponding to 1 g of HP) was removed for RNA extraction, as described below, and supplemented with 100 μl of the FCV suspension as an internal standard.

For the culture step, a 3-ml volume of PBS–0.3% peptone was added to the remaining suspension to obtain a final concentration of 0.1% peptone, as described in ISO standard 6887-3 (53). The suspension was then mixed for 1 min and kept in ice for 4 h. After centrifugation (2,000 × *g* for 5 min), 3 ml of supernatant (corresponding to 1 g of HP) was collected, supplemented with 7 ml of PBS, and used for culture.

Infectious FRNAPH enumeration and phage plaque genotyping. Infectious FRNAPH were detected according to ISO standard 10705-1 (54) using *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 (NCTC 12484) as the host strain (55). Culture was performed in 150-mm-diameter petri dishes, allowing for the analysis of 5-ml samples. Kanamycin and nalidixic acid were added (100 μg/ml) to limit the growth of other bacteria. Viral

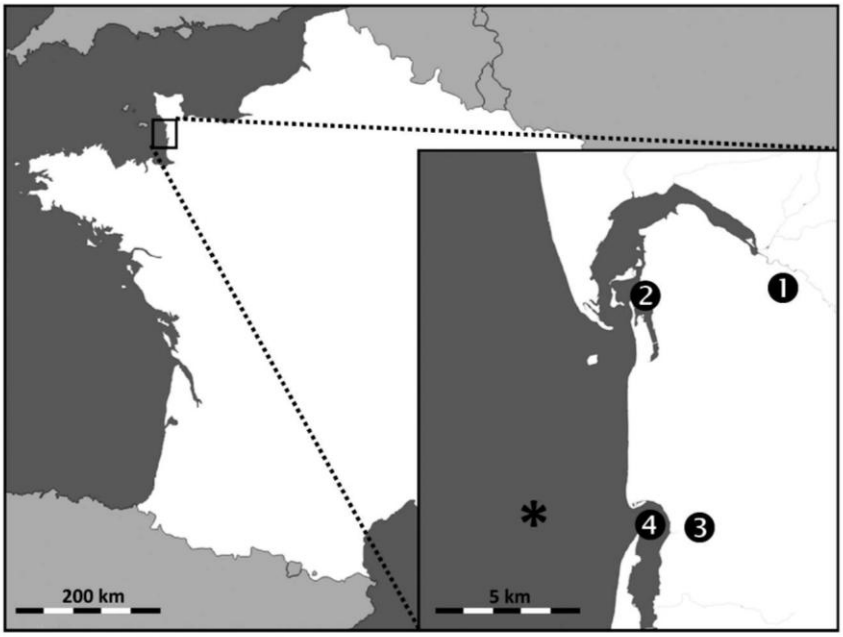

FIG 1 Geographic locations of the 4 water sampling areas and of the shellfish-harvesting area (*). The figure was generated via Snazzy Maps software, using images from Google Maps.

concentration was expressed in PFU per milliliter of water or per gram of HP after an 18-h incubation period.

Concerning water, detection was performed directly from 20 ml of samples (4 × 5 ml) or after concentration by ultracentrifugation, as described above. In the case of ultracentrifugation, the supernatant was gently eliminated, and the pellet was suspended by two washing and scraping steps with 2 ml of PBS and transferred in a sterile 15-ml tube. The final volume was adjusted to 5 ml and used for titration.

Concerning shellfish, culture was performed from 2 × 5 ml of samples (corresponding to 1 g of HP), prepared as described above.

For infectious FRNAPH genotyping, phage plaques were randomly isolated from positive water and shellfish samples (up to a limit of 12 per sample), collected with tips, and suspended in 1 ml of PBS–15% glycerol. After brief vortexing, the suspension was filtered through sterile Acrodisc syringe filters (pore size, 0.22 μm; Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA). RNA was then extracted using NucliSENS easyMAG (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) from 50 μl of phage suspension, eluted in 100 μl of buffer. Genotyping was then performed from RNA by a one-step multiplex quantitative RT-PCR, as used in a previous study (21).

Genome extraction. Extraction was achieved from waters after ultracentrifugation or from mixed shellfish. Regarding waters, lysis was performed beforehand from the concentrated pellet by adding 1 ml of PBS and 3 ml of Isol-RNA lysis reagent (5 Prime GmbH, Hilden, Germany) in the centrifuge bottle. The pellet was suspended by gentle agitation for 10 min on a tube roller at 70 rpm and, after scraping, the suspension was collected for genome extraction.

Regarding shellfish, a 2-ml volume of the mixture, prepared as described above, was incubated with 220 μl of proteinase K (30 U/ml) at 37°C for 1 h, with stirring. After centrifugation (3,000 × *g* for 5 min), 1.11 ml of the supernatant was collected (corresponding to 0.5 g of HP) and supplemented with 3 ml of Isol-RNA lysis reagent (5 Prime GmbH, Hilden, Germany).

The 4-ml lysed samples (suspended pellet or supernatant from digested shellfish) were finally collected in 15-ml Phase Lock Gel heavy tubes (5 Prime GmbH, Hilden, Germany) and, after adding 2 ml of chloroform, the mixture was stirred vigorously for 15 s and centrifuged (2,000 × *g* for 2 min). Extraction was then performed from the whole supernatant using NucliSENS magnetic extraction reagents (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) on a NucliSENS miniMAG in 100 μl of elution buffer, according to the manufacturer's recommendations.

FRNAPH genome quantification. Genomes of each FRNAPH subgroup were targeted for detection in waters after concentration by ultracentrifugation and in shellfish HP. Detection was performed according to the protocol described by Ogorzaly and Gantzer (47). For each subgroup, quantification was carried out in duplicate using a standard curve range of 10^1 to 10^5 gc/reaction. Thereby, quantification limits (LOQ), corresponding to the detection of 10^1 gc in a PCR well, were 267 gc/100 ml of water after ultracentrifugation and 1,067 gc/g of shellfish HP.

HuNoV genome quantification. NoV GI and GII genomes were detected in waters after concentration and in shellfish HP, according to ISO/TS standard 15216-1 (16). Quantification was carried out in duplicate for both subgroups using a standard curve range of 10^1 to 10^5 gc/reaction. From the volume of RNA suspension used in the reaction, the LOQ were 100 gc/100 ml of water after ultracentrifugation and 400 gc/g of shellfish HP.

Other physicochemical, microbial, and epidemiological parameters. Other parameters were examined to characterize samples. In waters, dissolved oxygen, temperature, salinity, pH, and turbidity were measured.

E. coli and enterococcal concentrations in waters were also evaluated using a miniaturized MPN method based on ISO standard 9308-3 (56). In oysters and mussels, *E. coli* was detected by direct impedance measurement in shellfish FIL, according to NF V08-106 (57).

The results were compared to epidemiological data on the incidence rate of gastroenteritis in the region during the study period. In January to February 2014, the gastroenteritis incidence rate was higher than the national epidemic threshold (about 300 cases per 100,000 inhabitants). For the other dates, it was lower (between 50 and 130 cases per 100,000 inhabitants).

Concentration and extraction yields estimated by FCV quantification. To estimate the yields of the ultracentrifugation and extraction methods, FCV was used as an internal standard. Standard curves were obtained from a 10-fold dilution series of the FCV suspension, corresponding to a yield of 100%, 10%, and 1%. For each sample, the yield was evaluated by an absolute quantification of FCV by quantitative reverse

transcription-PCR (RT-qPCR) using the RNA UltraSense one-step quantitative RT-PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), performed from 5 μl of RNA in a 25-μl reaction volume, according to the manufacturer's recommendations, using primers (500 nM) and a probe (900 nM) designed by Gassilloud et al. (22). The reaction was carried out on StepOne Plus real-time PCR system (Life Technologies) at 55°C for 40 min (reverse transcription), 5 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 65°C. Quantification of FCV was also performed from 10-fold-diluted samples to assess the presence of RT-PCR inhibitors.

PCA. Principal-component analysis (PCA) is a geometrical and statistical descriptive approach that allows the reduction of multiple quantitative variables into a limited number of factors. The objective is to project variables in a low-dimension space, distorting the facts as little as possible, and to obtain the most relevant summary of initial data. Graphical interpretation can reveal similarities or oppositions between data placed on a 2-dimension plane, defined by two factors (generally F1 and F2) chosen to summarize the maximum amount of information. Only correctly represented variables can be interpreted (i.e., near the correlation circle). Indeed, two points may appear close together in a 2-dimension plane while they are distant in a multiple-dimension space (on both sides of the projection plane). With respect to interpretation, some positions are worth noticing: a positive correlation exists between variables in close proximity (correlation coefficient close to 1), variables moving in opposite directions are negatively correlated (r close to -1), and no correlation is observed between variables at right angles to each other (r close to 0). PCA was performed using an Excel add-in (Revue Modulad 43, 2011, http://www.modulad.fr/excel_macros.htm).

RESULTS

Methodological considerations for the detection of infectious FRNAPH in water samples. The methods used to detect bacteria and infectious FRNAPH in waters are based on standardized techniques. The theoretical limits of detection (LOD) for *E. coli* and enterococci (corresponding to the detection of 1 bacterium per final volume analyzed) are 38 MPN/100 ml of water. For infectious FRNAPH, the LOD is 5 PFU/100 ml in the case of direct analysis and 0.5 PFU/100 ml after concentration by ultracentrifugation, if a recovery rate of 100% is considered. Nevertheless, estimation based on the concentration of 28 samples of river water gave a mean recovery rate of only 34.0% (range, 4.7% to 80.0%) for infectious FRNAPH detection. In quantitative terms, the mean concentration detected was 13 PFU/100 ml by direct analysis and 4 PFU/100 ml after ultracentrifugation, and only 3 water samples were positive after concentration, while no infectious FRNAPH were detected in the direct analysis. Conversely, 2 samples were positive by direct detection and negative after concentration. In the present study, the concentration method was of little benefit in the detection of infectious FRNAPH, and therefore, only the results obtained in the direct analysis were considered in a comparison of FRNAPH levels with those of *E. coli* or enterococci.

Methodological considerations for the detection of genomes in water samples. Concerning the detection of genomes, the theoretical LOD for FRNAPH (corresponding to 1 gc in a PCR well) is 5.3×10^3 gc/100 ml of water, due to the small sampling volume involved when a direct analysis is performed. Thus, no direct detection can be considered, even if the genome concentration is usually 1- or 2-$\log_{10}$ unit higher than that of infectious particles. Thereby, even if the use of concentration methods is a critical step leading to the loss of viral particles or genomes, they appear to be essential for the analysis of low-concentration samples. After ultracentrifugation, the theoretical LOD values are 26.7 and 10 gc/100 ml of water for FRNAPH and HuNoVs, respectively. Given the structural similarity between FRNAPH and HuNoVs, the same recovery rate may be considered after ultracentrifugation for both virus types, as well as for their various subgroups, with centrifugation parameters being set to pellet FRNAPH that have the lowest sedimentation coefficient. This approach was preferred to the use of adhesion-elution techniques or ultrafiltration through positively charged membranes, which are more dependent on viral and particle surface properties (58). The approach proposed here allows thus a strict comparison between these various parameters in order to evaluate the efficiency of FRNAPH as viral indicators and as a tool to discriminate the source of fecal pollution.

For the detection of viral genomes, nucleic acid extraction yields and the presence of RT-PCR inhibitors are other important parameters to be taken into account. The use of FCV as an internal standard allows the overall efficiency of the method used to be assessed (including ultracentrifugation, RNA extraction, and detection of RT-PCR inhibitors). In water samples, yields were heterogeneous: the average was about 9.5%, but they ranged from 0.01% to 49.6%. Most results were not acceptable according to ISO/TS standard 15216-1 (16), which imposes extraction yields of >1%. For the 10-fold-diluted samples, better yields were observed (ranging from 0.4% to 105%), indicating the presence of RT-PCR inhibitors. No correlation between inhibition and water physicochemical parameters was observed (data not shown). The use of 10-fold-diluted samples is challenging when working with environmental samples, due to genome concentrations close to the LOD, leading to possible overestimation by multiplying the low quantity detected by the dilution factor. For all these reasons, the results for FRNAPH and HuNoV genomes in waters were interpreted from a qualitative standpoint only.

Methodological considerations for the analysis of shellfish samples. With respect to the shellfish analysis, the LOD was 67 MPN of *E. coli*/100 g of FIL and 1 PFU/g of HP for infectious FRNAPH. It was 107 gc/g of HP for FRNAPH genomes and 40 gc/g of HP for HuNoV genomes. The extraction yields observed by using FCV were about 14.0%, ranging from 2.0% to 32.6%. All yields were therefore acceptable according to ISO/TS standard 15216-1 (16). Very little variation was observed in the estimated yields between undiluted and 10-fold-diluted samples (range, 2.0% to 52.5%). Inhibition seems therefore to have a minor effect on the quantitative results. Accordingly, infectious bacteria, infectious FRNAPH, as well as viral genome concentrations of FRNAPH and HuNoVs may all be quantitatively compared in shellfish.

Infectious FRNAPH and fecal indicator bacteria in water samples. The relevance of FRNAPH as fecal and viral indicators, as well as in tracking the source of fecal pollution, was evaluated in waters collected from 4 sampling sites located near the local shellfish-harvesting area.

Fecal indicator bacteria (*E. coli* or enterococci) were detected in all water samples throughout the year (Fig. 2). Infectious FRNAPH were present in only 53% of the samples, with a mean concentration 100-fold lower than that of *E. coli*. Genotyping of phage plaques showed that infectious FRNAPH were mainly FRNAPH-I (93%). In other samples, infectious FRNAPH did not allow the fecal contamination highlighted by the presence of *E. coli* to be detected. Overall, all areas were affected by fecal pollution, and the concentrations of indicators (bacteria or FRNAPH) were higher in January, November, and December 2014 than in March,

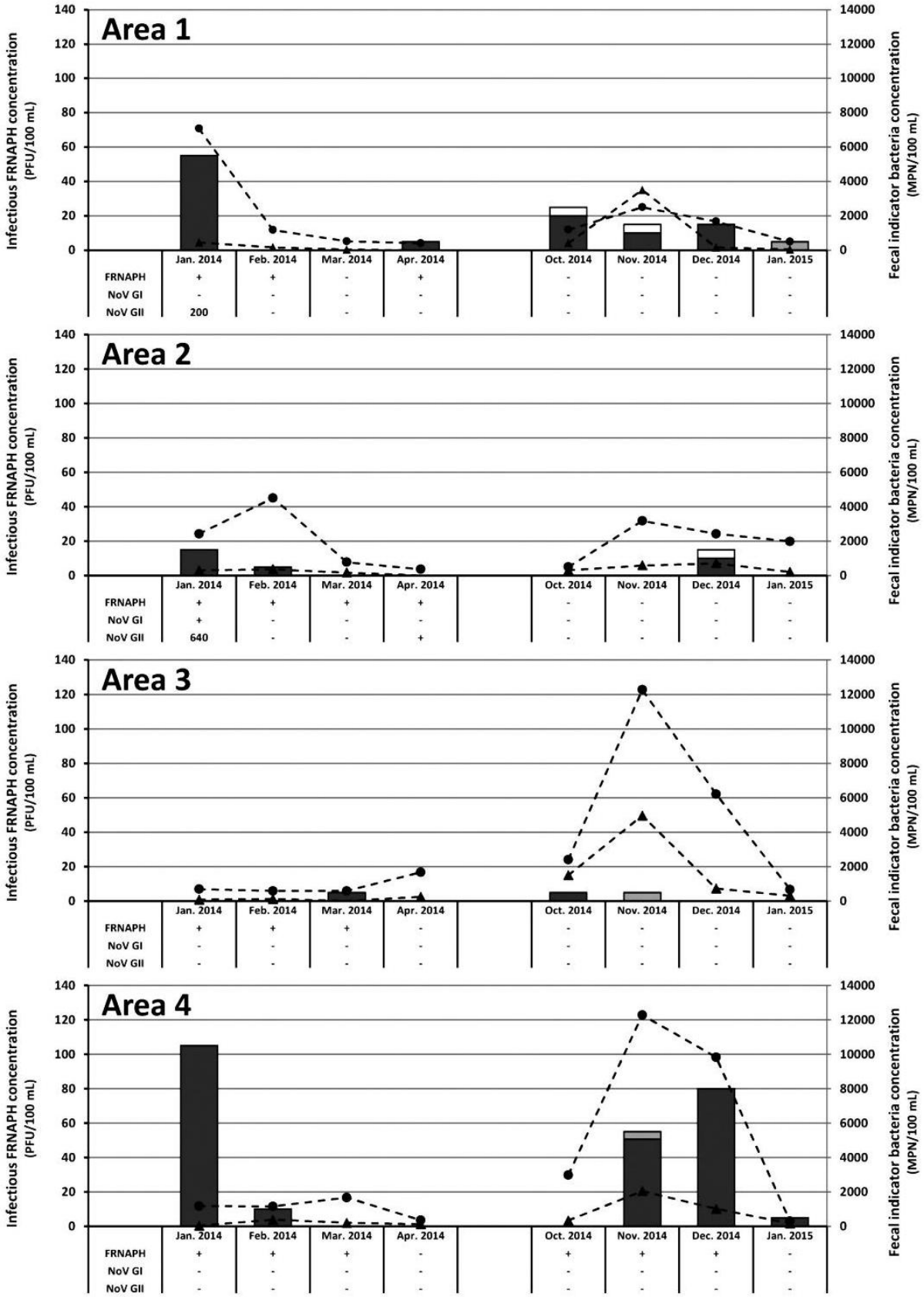

FIG 2 Infectious FRNAPH-I (dark gray bar), FRNAPH-II (light gray bar), and undetermined phage (white) concentrations estimated by relating phage plaque genotyping results to the total FRNAPH, as well as *E. coli* (black circles) and enterococcal (black triangles) concentrations detected in water samples collected from the 4 study areas. For each sample, FRNAPH, NoV GI, and NoV GII genome detection results are also given. Only qualitative information is given for FRNAPH genomes (presence [+] or absence [−]). HuNoV genome concentrations are expressed in genome copies per 100 ml of water; −, HuNoV genomes undetected; +, HuNoV genome concentrations above the detection limit but unquantifiable (<100 gc/100 ml).

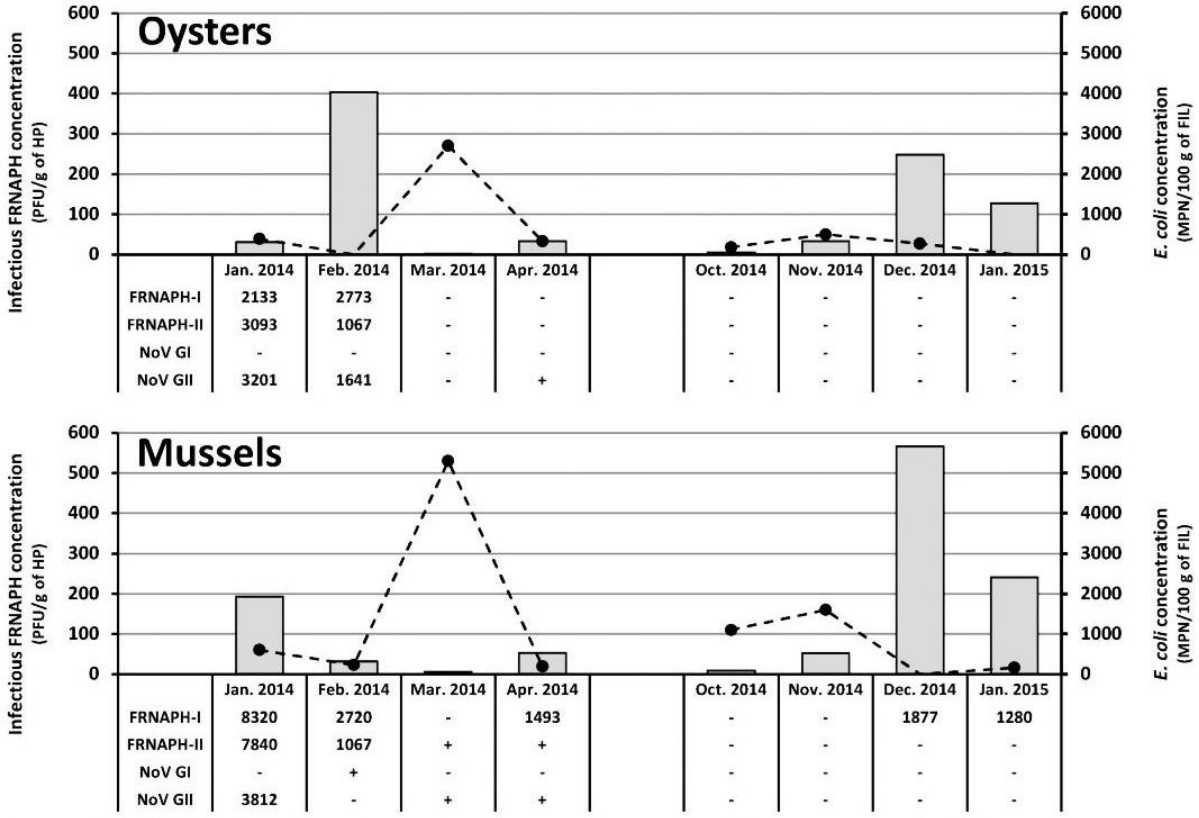

FIG 3 Infectious FRNAPH (gray bars) and *E. coli* (black circles) concentrations detected in shellfish collected from the local harvesting area. For each sample, FRNAPH-I, FRNAPH-II, NoV GI, and NoV GII genome detection results are also given, expressed in genome copies per gram of hepatopancreas (HP). −, genomes undetected; +, concentration above the detection limit but unquantifiable (<1,067 and <400 gc/g of HP for FRNAPH and HuNoVs, respectively).

April, and October 2014 and January 2015. Except in rare cases, infectious FRNAPH and *E. coli* concentrations demonstrated similar trends. By associating the two parameters, 3 peaks of fecal pollution were distinguishable: (i) in area 1, concentrations detected in January 2014 were 7,060 MPN/100 ml and 55 PFU/100 ml for *E. coli* and FRNAPH, respectively; (ii) in area 4, concentrations of 1,170 MPN/100 ml and 105 PFU/100 ml were detected during the same period; and (iii) in area 4, concentrations were higher than 9,830 MPN/100 ml and 55 to 80 PFU/100 ml in November to December 2014.

FRNAPH and HuNoV genomes in water samples. FRNAPH genomes were detected in 50% of the samples (Fig. 2), which confirmed on the whole the results obtained with infectious FRNAPH. The higher concentrations of infectious FRNAPH (i.e., >40 PFU/100 ml) were always associated with the presence of genomes ($n = 4$), as opposed to the lower ones ($n = 13$), for which genomes were sometimes not detected, presumably due to the low concentration or extraction recovery rates and the presence of RT-PCR inhibitors. Conversely, in 22% of the samples ($n = 7$), genomes were detected in the absence of infectious FRNAPH. In 25% of the samples, neither genomes nor infectious FRNAPH were detected.

NoV GI and GII were targeted here as specific human viral pollution markers. Three water samples from area 1 (January 2014) and area 2 (January and April 2014) were positive for the detection of both HuNoV and FRNAPH genomes. NoV GII genome concentrations were above the LOQ in samples collected in January 2014 (200 and 640 gc/100 ml in areas 1 and 2, respectively). In these 2 samples, infectious FRNAPH were also detected. Interestingly, during the sampling period of January 2014, the incidence of gastroenteritis in the population was above the epidemic threshold for the region.

Infectious FRNAPH and *E. coli* in shellfish samples. *E. coli* was targeted in FIL of oysters (8 batches) and mussels (8 batches) collected from the growing area affected by contaminated waters coming from areas 1 to 4 (Fig. 1). As in waters, *E. coli* was detected throughout the year (Fig. 3) in 81% of the samples ($n = 13$). For the 2 sample types, the batches collected in March 2014 presented the highest concentrations (2,700 and 5,300 MPN of *E. coli*/100 g of FIL for oysters and mussels, respectively). According to EC regulation 854/2004 (5), the harvesting area is classified as B. Our results confirm such classification when taking into account *E. coli* concentration levels detected in oysters but not for mussels, for which classification would be C (>4,600 MPN of *E. coli*/100 g of FIL detected in March 2014).

Concerning infectious FRNAPH, they were detected in all shellfish samples. Concentrations ranged from 2 to 566 PFU/g of HP (average concentration, 144 PFU/g), with FRNAPH-I being in the majority (99% of the 12 phage plaques analyzed per sample). Higher concentrations were observed in samples collected in January to February 2014 and December 2014 to January 2015 (average, 230 PFU/g of HP). Considering that FRNAPH are mainly found in shellfish HP and that the HP fraction corresponds ap-

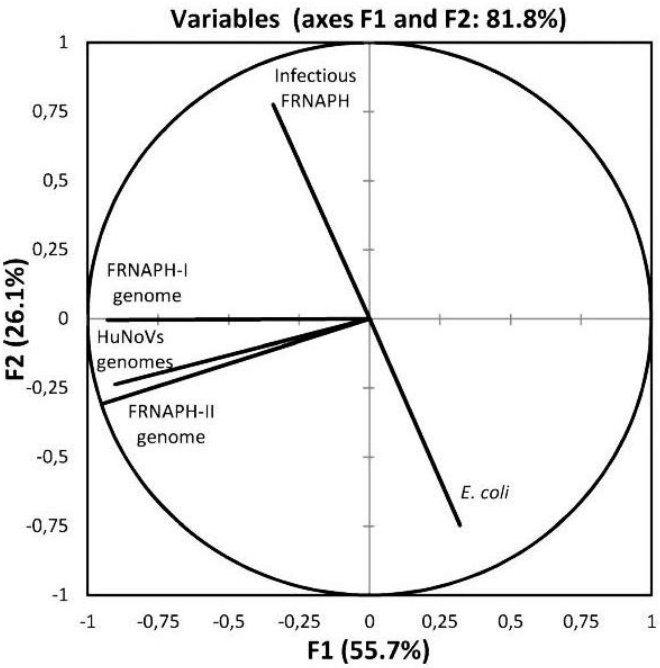

FIG 4 Principal-component analysis of parameters targeted in shellfish collected from the local harvesting area.

proximately to 5% of the total FIL mass, the mean ratio between *E. coli* and infectious FRNAPH in total FIL is 3.6 (geometric mean).

According to these indicators, shellfish were constantly affected by fecal pollution in this area, and the large amounts of FRNAPH in shellfish compared to concentrations detected in nearby environmental waters indicated that shellfish are able to accumulate FRNAPH in digestive tissues.

FRNAPH and HuNoV genomes in shellfish samples. Concerning genomes, only FRNAPH-I and -II were detected in shellfish. An FRNAPH-II genome was detected in 75% of the samples (Fig. 3; $n = 6/8$) during the first study period (January 2014 to April 2014), but it was not detected during the second study period (October 2014 to January 2015).

HuNoV genomes were targeted in shellfish HP, and they were detected in 44% of the samples collected from the studied area (3/8 oysters and 4/8 mussels). Six batches were positive for NoV GII and only 1 for NoV GI (mussels from February 2014). Quantifiable NoV GII genome concentrations (>400 gc/g of HP) were detected in only 3 positive samples (oysters from January and February 2014 and mussels from January 2014).

Principal-component analysis (PCA) was performed to describe associations between the different parameters targeted in shellfish collected from the local harvesting area. A representation along axes F1 and F2 allows a description of 81.8% of the total information (Fig. 4). Several of the parameters considered in this study are close to the correlation circle, allowing the interpretations of no relationship being observed between (i) *E. coli* and HuNoV genome levels, (ii) infectious FRNAPH and HuNoV genome concentrations, and (iii) infectious FRNAPH and their genomes; however, (iv) a relationship is underlined between HuNoV and FRNAPH-II genomes.

These findings have led to the further investigation of the association between FRNAPH and HuNoV genomes in shellfish collected from other European harvesting areas. Among the 28 batches collected, 43% were positive for the presence of NoV GII ($n = 12$), while NoV GI was never detected. Concerning the detection of FRNAPH genomes, 11 batches were positive, and it was FRNAPH-II in each case. In line with ISO/TS standard 15216-1 (16) for extraction and genome detection, HuNoV genome concentrations ranged between the LOD and LOQ values for 92% of the positive samples, and FRNAPH-II genome concentrations were also above the LOQ, while extraction yields were in agreement with the ISO standard. Therefore, the association between the two parameters was investigated in qualitative terms (Table 1). Considering the 44 specimens monitored in this study, a highly significant association is observed between HuNoV and FRNAPH-II genomes (Pearson's χ^2 test with Yates' continuity correction, $P < 0.01$).

DISCUSSION

Fecal indicator bacteria are commonly investigated in waters or shellfish, and their detection has been standardized and managed for a long time (51, 56, 57). Techniques used for the detection of HuNoV and FRNAPH genomes and for those of infectious FRNAPH have also been standardized or published for several years (16, 47, 48, 54). However, concentration methods, which are usually essential for the detection of viruses in environmental samples, are far from easy, and the use of an internal standard is required to estimate the extraction yield of the methods and the inhibition rates. In waters collected from the studied area, infectious FRNAPH levels were sufficient to be detected by direct analysis. As for genomes (FRNAPH or HuNoV), a concentration step was needed, and they were detected after ultracentrifugation. The average concentration yield is low (9.5%), especially in freshwater (2%), and several rates are below the 1% threshold set by ISO/TS standard 15216-1 (16), thereby allowing a qualitative interpretation only. For shellfish, extraction yields are >10%, allowing a quantitative analysis.

The first step to ranking viral hazards is to evaluate the extent of fecal pollution using appropriate indicators. Indeed, high levels of fecal pollution are often associated with the presence of pathogenic viruses, in the case of circulating strains in the population (epidemic period). It is also suggested that high levels of fecal pollution may be considered in the absence of pathogenic viruses, without compromising the potential of the indicators used. Conversely, these indicators must always be present when pathogens are detected. Because indicator bacteria (*E. coli* and enterococci) are commonly used (59, 60), the potential of FRNAPH (genomes and infectious phages) to evaluate the level of fecal pollution must be compared to them.

In this study, fecal pollution was observed in waters no matter the indicator used, and *E. coli* levels led to classify the studied site as being of poor quality, according to EC directive 2006/7/EC (61).

TABLE 1 Two-by-two contingency table for the detection of FRNAPH-II and HuNoV genomes in shellfish batches

	HuNoV genome detection	
FRNAPH-II genome detection	No. of positive samples	No. of negative samples
No. of positive samples	14	3
No. of negative samples	5	22

E. coli was detected in all samples, while FRNAPH were absent from almost half of them (15/32). Nevertheless, some relationships appeared between the levels of *E. coli*, enterococci, and infectious FRNAPH. Area 4 seemed to be the most affected by fecal pollution, according to the levels of *E. coli* (3,720 MPN/100 ml) and FRNAPH (32 PFU/100 ml). According to the levels of enterococci, high fecal pollution was observed in areas 1 and 3. From these data, infectious FRNAPH did not provide novel information about the fecal pollution of waters of the studied site: as with *E. coli*, concentration peaks were observed in winter (January 2014 for areas 1 and 2, November and December 2014 for area 4), and although correlated on the whole with *E. coli*, their concentrations were about 100 times lower, thus explaining their nondetection in several samples. A ratio of about 10 to 100 is classically observed between these 2 indicators in raw wastewater or in environmental waters (46, 62, 63), restricting their potential as fecal pollution indicators. Given that *E. coli* is less resistant than FRNAPH in the environment, high concentrations of this indicator may be indicative of a recent fecal pollution event. Finally, no benefit was observed either regarding FRNAPH genome detection.

Concerning shellfish collected from the studied area, massive fecal pollution was observed according to *E. coli* and infectious FRNAPH levels (detected in 81% and 100% of the samples, respectively). However, in 3 samples, fecal pollution was revealed by the presence of infectious FRNAPH, but no *E. coli* was detected. More than 99% of infectious FRNAPH isolated were FRNAPH-I. Genotyping was, however, performed on a maximum of 12 phage plaques per specimen, representing sometimes less than 2% of the listed phage plaques. Interestingly, and contrary to the observations made in waters, infectious FRNAPH concentrations were higher than the concentration of *E. coli* in shellfish. The fact that HP was used for the detection of FRNAPH while *E. coli* was targeted in whole shellfish (i.e., FIL) was not sufficient to justify such a change compared to the concentrations detected in water (the levels of *E. coli* were up to 100 times higher than those of infectious FRNAPH in water samples, while a geometric mean of only 3.6 was calculated in shellfish). These results indicated better survival and/or better accumulation of FRNAPH in shellfish than those of bacteria, as previously suggested (11, 12, 52). This observation is an important argument for the benefit of using FRNAPH to estimate fecal contamination in shellfish compared to *E. coli*. Besides that, no relationships were found between the concentrations of these 2 indicators. High concentrations were observed during the winter months for infectious FRNAPH (January to February 2014 and December 2014 to January 2015), while *E. coli* concentration peaks were observed in spring and fall (March and October to November 2014). Other studies also reported better accumulation of FRNAPH in shellfish in winter and no seasonal variation for *E. coli* (40, 64).

To sum up the findings from the present study on the use of FRNAPH as fecal pollution indicators conducted in a specific study area, no benefits were observed in water compared to *E. coli*: infectious FRNAPH provided no relevant input compared to the usual indicator, and low concentrations and poor yields prevented any conclusions with regard to FRNAPH genomes. However, FRNAPH provided novel information in shellfish compared to *E. coli*.

In this study, FRNAPH were also evaluated as indicators of viral pollution and as microbial source tracking tools. In this context, we compared the presence of FRNAPH and HuNoV genomes in water and shellfish samples, taking into account the aforementioned methodological limitations. Surrogates must behave as pathogenic viruses, and FRNAPH genome detection appears interesting due to their persistence being greater than infectivity (20–23, 65), allowing the source of fecal pollution to be tracked for a longer period of time, despite the presence of inactivating factors in the environment. Unfortunately, low genome levels in water require a concentration step, and poor yields and inhibition cause them to be around their detection limits. For this reason, a qualitative analysis appeared more appropriate here. Microbial source tracking was undertaken based on the approach described by Hartard et al. (21). With the RT-PCR method that was used, FRNAPH-II and -III seemed to be specific indicators of human pollution, while FRNAPH-I was associated with both animal and urban pollution. FRNAPH genomes were occasionally detected in water collected from the 4 areas. The genomes detected in almost half of the samples collected during the first winter (7/16) were those of FRNAPH-II, thus suggesting that the pollution could be of urban origin. Such an assumption was strengthened by the detection of HuNoV genome levels above the LOQ in areas 1 and 2 during the first winter, a time that is also characterized by the gastroenteritis epidemic threshold being surpassed for the studied region. During the second winter, neither of these two viruses was detected, and the gastroenteritis epidemic threshold was not crossed.

The association between FRNAPH-II and HuNoV genomes observed in water was even more marked in shellfish, whether in specimens from the studied area ($n = 16$) or in others collected in several European harvesting areas ($n = 28$). In the studied area, HuNoV genomes were qualitatively and quantitatively more present in shellfish than in waters during the first winter, confirming a storage capacity in shellfish, as previously described (29, 66, 67). No HuNoV or FRNAPH-II genomes were detected during the following winter, suggesting, as in water, a limited impact of human pollution, while the seasonal peak of infectious FRNAPH-I was also observed. Concerning shellfish collected from other European harvesting areas, which were probably less impacted by fecal pollution, only a qualitative analysis was conducted for the presence of FRNAPH and HuNoV genomes, due to concentrations close to the LOQ. Finally, concerning *E. coli* detection in shellfish, the absence of a peak during the winter months, especially when HuNoVs were detected, confirmed that this conventional indicator is not suitable to monitor viral pollution in shellfish. The contribution of FRNAPH detection in shellfish and the lack of relevance regarding the monitoring of *E. coli* had already been observed by Flannery et al. (34). By grouping shellfish specimens according to their infectious FRNAPH content, a correlation was observed with the level of NoV GII genome, unrelated to that of *E. coli*. In another study, Flannery et al. (41) reported comparable kinetics of accumulation between infectious FRNAPH-II and the genomes of probably infectious NoV GII in oysters following combined sewer overflow (CSO) discharge events. Finally, FRNAPH-II, generally present in low concentrations in treated water effluents (21, 68), has been found to be the most appropriate indicator of viral persistence during water treatment processes (69) and may thus be proposed as a specific indicator of urban pollution in the environment (21).

To conclude, assessing viral hazard risks using molecular tools raises the question of whether the genomes detected in water and/or food commodities correspond to infectious viruses able to

infect humans. In this study, infectious FRNAPH were detected in shellfish samples in the absence of any FRNAPH genomes, which clearly illustrated technical limitations (i.e., high limit of detection, low extraction yields, and RT-PCR inhibitors), even when using standardized methods. These limitations are well known, and in this respect, infectious HuNoVs may easily be present in a specimen even when no genome is detected. The reverse situation is also possible, in view of genome persistence being greater than infectivity. For these 2 reasons, the detection of HuNoV genomes provides limited relevance for assessing the associated infectious risk. The findings of this study show a relationship between the presence of HuNoV and FRNAPH-II genomes, especially in shellfish. Taking into account this observation, further experiments are now needed to investigate the relationship between the presence of infectious FRNAPH and that of infectious HuNoVs in shellfish, and to conclude whether the specific detection of human infectious FRNAPH-II could be used as an indicator of infectious HuNoV contamination in shellfish. The relative scarcity of FRNAPH-II compared to nonhuman-specific FRNAPH-I requires, however, the development of more-specific detection methods. Finally, with HuNoVs being noncultivable, the analysis of shellfish involved in outbreaks of HuNoV gastroenteritis will be the only guarantee of the presence of infectious particles.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Seine-Normandy Water Agency and conducted within the framework of the Joint Technological Unit VIROcontrol.

We thank RiskManche (funded by the European Regional Development Fund Interreg IVA Programme) for their supply of samples, as well as the Zone Atelier du Bassin de la Moselle (ZAbM) and the Institut Carnot Energie et Environnement en Lorraine (ICEEL) for their financial and technical support.

FUNDING INFORMATION

This work was funded by the Seine Normandy Water Agency and by Institut Carnot Energie et Environnement en Lorraine.

REFERENCES

1. **Bellou M, Kokkinos P, Vantarakis A.** 2013. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. Food Environ Virol **5**:13–23. http://dx.doi.org/10.1007/s12560-012-9097-6.
2. **Rajko-Nenow P, Waters A, Keaveney S, Flannery J, Tuite G, Coughlan S, O'Flaherty V, Doré W.** 2013. Norovirus genotypes present in oysters and in effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland in 2010. Appl Environ Microbiol **79**:2578–2587. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03557-12.
3. **Doré B, Keaveney S, Flannery J, Rajko-Nenow P.** 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February–March 2010. Euro Surveill **15**:pii=19567. http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19567.
4. **Koopmans M, Duizer E.** 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. Int J Food Microbiol **90**:23–41. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00169-7.
5. **European Parliament.** 2004. Regulation (EC) no. 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Off J Eur Union **L226**:83–127.
6. **Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, Doyle A, Zidane M, Suffredini E, Kohli E, Maddalo F, Monini M, Gallay A, Pommepuy M, Pothier P, Ruggeri FM.** 2006. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. J Clin Microbiol **44**:3878–3882. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01327-06.
7. **Chalmers JWT, McMillan JH.** 1995. An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. Epidemiol Infect **115**:163–167. http://dx.doi.org/10.1017/S0950268800058222.
8. **Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, Rose JB.** 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. Appl Environ Microbiol **71**:3163–3170. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005.
9. **Havelaar AH, van Olphen M, Drost YC.** 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. Appl Environ Microbiol **59**:2956–2962.
10. **Doré WJ, Lees DN.** 1995. Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. Appl Environ Microbiol **61**:2830–2834.
11. **Formiga-Cruz M, Tofino-Quesada G, Bofill-Mas S, Lees DN, Henshilwood K, Allard AK, Conden-Hansson AC, Hernroth BE, Vantarakis A, Tsibouxi A, Papapetropoulou M, Furones MD, Girones R.** 2002. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. Appl Environ Microbiol **68**:5990–5998. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.12.5990-5998.2002.
12. **Lees D.** 2000. Viruses and bivalve shellfish. Int J Food Microbiol **59**:81–116. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00248-8.
13. **Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, Ruvoën-Clouet N, Pommepuy M, Le Pendu J.** 2006. Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. Emerg Infect Dis **12**:931–936. http://dx.doi.org/10.3201/eid1206.051519.
14. **Tian P, Bates AH, Jensen HM, Mandrell RE.** 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. Lett Appl Microbiol **43**:645–651. http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02010.x.
15. **Tian P, Engelbrektson AL, Jiang X, Zhong W, Mandrell RE.** 2007. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. J Food Prot **70**:2140–2147.
16. **International Organization for Standardization.** 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. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=55382.
17. **European Food Safety Authority.** 2012. Scientific opinion on norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. EFSA J **10**:2500–2539. http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2500.
18. **Lowther JA, Gustar NE, Hartnell RE, Lees DN.** 2012. Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels. J Food Prot **75**:389–393. http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-360.
19. **Lowther JA, Avant JM, Gizynski K, Rangdale RE, Lees DN.** 2010. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. J Food Prot **73**:305–311.
20. **Ogorzaly L, Bertrand I, Paris M, Maul A, Gantzer C.** 2010. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. Appl Environ Microbiol **76**:8019–8025. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00917-10.
21. **Hartard C, Rivet R, Banas S, Gantzer C.** 2015. Occurrence of and sequence variation among F-specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins. Appl Environ Microbiol **81**:6505–6515. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01905-15.
22. **Gassilloud B, Schwartzbrod L, Gantzer C.** 2003. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? Appl Environ Microbiol **69**:3965–3969. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003.
23. **Choi S, Jiang SC.** 2005. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. Appl Environ Microbiol **71**:7426–7433. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.11.7426-7433.2005.
24. **Dancer D, Rangdale RE, Lowther JA, Lees DN.** 2010. Human norovirus RNA persists in seawater under simulated winter conditions but does not bioaccumulate efficiently in Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). J Food Prot **73**:2123–2127.
25. **Wigginton KR, Pecson BM, Sigstam T, Bosshard F, Kohn T.** 2012. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and

structural integrity. Environ Sci Technol **46**:12069–12078. http://dx.doi.org/10.1021/es3029473.

26. **Simonet J, Gantzer C.** 2006. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. Appl Environ Microbiol **72**:7671–7677. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01106-06.
27. **Campos CJA, Lees DN.** 2014. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. Appl Environ Microbiol **80**:3552–3561. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.04188-13.
28. **Pecson BM, Ackermann M, Kohn T.** 2011. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity. Environ Sci Technol **45**:2257–2263. http://dx.doi.org/10.1021/es103488e.
29. **Lowther JA, Gustar NE, Powell AL, Hartnell RE, Lees DN.** 2012. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. Appl Environ Microbiol **78**:5812–5817. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01046-12.
30. **Polo D, Varela MF, Romalde JL.** 2015. Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. Int J Food Microbiol **193**:43–50. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.007.
31. **Suffredini E, Lanni L, Arcangeli G, Pepe T, Mazzette R, Ciccaglioni G, Croci L.** 2014. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy. Int J Food Microbiol **184**:21–26. http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.026.
32. **Cheng PKC, Wong DKK, Chung TWH, Lim WWL.** 2005. Norovirus contamination found in oysters worldwide. J Med Virol **76**:593–597. http://dx.doi.org/10.1002/jmv.20402.
33. **Boxman ILA, Tilburg JJHC, Te Loeke NAJM, Vennema H, Jonker K, de Boer E, Koopmans M.** 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. Int J Food Microbiol **108**:391–396.
34. **Flannery J, Keaveney S, Doré W.** 2009. Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oyster. J Food Prot **72**:2358–2362.
35. **Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN.** 2008. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. J Food Prot **71**:1427–1433.
36. **Nishida T, Nishio O, Kato M, Chuma T, Kato H, Iwata H, Kimura H.** 2007. Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan. Microbiol Immunol **51**:177–184. http://dx.doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03899.x.
37. **Costantini V, Loisy F, Joens L, Le Guyader FS, Saif LJ.** 2006. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. Appl Environ Microbiol **72**:1800–1809. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.3.1800-1809.2006.
38. **Mieszkin S, Caprais MP, Le Mennec C, Le Goff M, Edge TA, Gourmelon M.** 2013. Identification of the origin of faecal contamination in estuarine oysters using *Bacteroidales* and F-specific RNA bacteriophage markers. J Appl Microbiol **115**:897–907. http://dx.doi.org/10.1111/jam.12260.
39. **Doré WJ, Henshilwood K, Lees DN.** 2000. Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. Appl Environ Microbiol **66**:1280–1285. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1280-1285.2000.
40. **Doré WJ, Mackie M, Lees DN.** 2003. Levels of male-specific RNA bacteriophage and *Escherichia coli* in molluscan bivalve shellfish from commercial harvesting areas. Lett Appl Microbiol **36**:92–96. http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01268.x.
41. **Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Doré W.** 2013. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. Water Res **47**:5222–5231. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.008.
42. **Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Doré W.** 2012. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. Appl Environ Microbiol **78**:3400–3406. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07569-11.
43. **Cole D, Long SC, Sobsey MD.** 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. Appl Environ Microbiol **69**:6507–6514. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003.
44. **Schaper M, Jofre J, Uys M, Grabow WOK.** 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. J Appl Microbiol **92**:657–667. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01600.x.
45. **Harwood VJ, Boehm AB, Sassoubre LM, Vijayavel K, Stewart JR, Fong TT, Caprais MP, Converse RR, Diston D, Ebdon J, Fuhrman JA, Gourmelon M, Gentry-Shields J, Griffith JF, Kashian DR, Noble RT, Taylor H, Wicki M.** 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. Water Res **47**:6929–6943. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.064.
46. **Sundram A, Donnelly L, Ehlers MM, Vrey A, Grabow WOK, Bailey IW.** 2002. Evaluation of F-RNA coliphages as indicators of viruses and the source of faecal pollution, p 86–91. *In* WISA 2002 Biennial Conf Exhib Proc, Durban, South Africa, 19 to 23 May 2002.
47. **Ogorzaly L, Gantzer C.** 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. J Virol Methods **138**:131–139. http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004.
48. **Wolf S, Hewitt J, Greening GE.** 2010. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. Appl Environ Microbiol **76**:1388–1394. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02249-09.
49. **Sinton LW, Hall CH, Lynch PA.** 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline water. Appl Environ Microbiol **68**:1122–1131. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.3.1122-1131.2002.
50. **Noble RT, Lee IM, Schiff KC.** 2004. Inactivation of indicator microorganisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. J Appl Microbiol **96**:464–472. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02155.x.
51. **Formiga-Cruz M, Allard AK, Conden-Hansson AC, Henshilwood K, Hernroth BE, Jofre J, Lees DN, Lucena F, Papapetropoulou M, Rangdale RE, Tsibouxi A, Vantarakis A, Girones R.** 2003. Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. Appl Environ Microbiol **69**:1556–1563. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.3.1556-1563.2003.
52. **Doré WJ, Henshilwood K, Lees DN.** 1998. The development of management strategies for control of virological quality in oysters. Water Sci Technol **38**:29–35. http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00796-3.
53. **International Organization for Standardization.** 2003. ISO 6887-3. Microbiology of food and animal feeding stuffs—preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination—part 3: specific rules for the preparation of fish and fishery products. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=31589.
54. **International Organization for Standardization.** 2001. ISO 10705-1. Water quality—detection and enumeration of bacteriophages—part 1: enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=18794.
55. **Havelaar AH, Hogeboom WM.** 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J Appl Bacteriol **56**:439–447. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01372.x.
56. **International Organization for Standardization.** 1998. ISO 9308-3. Water quality—detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water—part 3: miniaturized method (most probable number) by inoculation in liquid medium. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9308:-3:ed-1:v1:en.
57. **AFNOR.** 2010. NF V08-106. Enumeration *Escherichia coli* in live shellfish—indirect technique using direct impedance measurement. Association Française de Normalisation, La Plaine Saint-Denis, France. http://standards.globalspec.com/std/1282477/afnor-nf-v08-106.
58. **Dika C, Ly-Chatain MH, Francius G, Duval JFL, Gantzer C.** 2013. Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. Colloids Surf A **435**:178–187. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.045.
59. **World Health Organization, Organisation for Economic Cooperation and Development.** 2003. Assessing microbial safety of drinking water: improving approaches and methods. OECD Publishing, London, United Kingdom. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/9241546301full.pdf.
60. **Tallon P, Magajna B, Lofranco C, Leung KT.** 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. Water Air Soil Pollut **166**:139–166. http://dx.doi.org/10.1007/s11270-005-7905-4.

61. **European Parliament.** 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Off J Eur Union L **64:**37–51.
62. **Lucena F, Méndez X, Morón A, Calderón E, Campos C, Guerrero A, Cárdenas M, Gantzer C, Shwartzbrood L, Skraber S, Jofre J.** 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. J Appl Microbiol **94:**808–815. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01812.x.
63. **Contreras-Coll N, Lucena F, Mooijman K, Havelaar A, Pierzo V, Boque M, Gawler A, Höller C, Lambiri M, Mirolo G, Moreno B, Niemi M, Sommer R, Valentin B, Wiedenmann A, Young V, Jofre J.** 2002. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. Water Res **36:**4963–4974. http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00229-4.
64. **Myrmel M, Berg EMM, Rimstad E, Grinde B.** 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. Appl Environ Microbiol **70:**2678–2684. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.5.2678-2684.2004.
65. **Fong TT, Lipp EK.** 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. Microbiol Mol Biol Rev **69:**357–371. http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005.
66. **Maalouf H, Zakhour M, Le Pendu J, Le Saux JC, Atmar RL, Le Guyader FS.** 2010. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. Appl Environ Microbiol **76:**5621–5630. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00148-10.
67. **Richards GP, McLeod C, Le Guyader FS.** 2010. Processing strategies to inactivate enteric viruses in shellfish. Food Environ Virol **2:**183–193. http://dx.doi.org/10.1007/s12560-010-9045-2.
68. **Haramoto E, Fujino S, Otagiri M.** 2015. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. Sci Total Environ **520:**32–38. http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.034.
69. **Boudaud N, Machinal C, David F, Fréval-Le Bourdonnec A, Jossent J, Bakanga F, Arnal C, Jaffrezic MP, Oberti S, Gantzer C.** 2012. Removal of MS2, Qβ and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. Water Res **46:**2651–2664. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.020.

4ème PARTIE

Mise au point d'une technique permettant d'évaluer le caractère infectieux des FRNAPH de chacun des génogroupes

Compte tenu de la spécificité humaine des FRNAPH-II et de la corrélation observée entre la présence de leurs génomes et ceux des NoV dans les coquillages, la recherche des FRNAPH-II infectieux dans ce type de matrice pourrait constituer un critère intéressant pour évaluer le danger viral. Bien que facilement cultivable, leur recherche est cependant rendue difficile par leur plus faible prévalence dans l'environnement et les aliments, en particulier si on la compare à l'abondance des FRNAPH-I. Dans ce contexte, une méthode de détection a été mise au point avec comme objectif de pouvoir détecter de manière rapide et sensible l'ensemble des génogroupes de FRNAPH infectieux présents dans un échantillon. La mise au point de cette méthode a fait l'objet d'une publication scientifique parue dans *Food Microbiology* (Hartard *et al.*, 2017).

L'approche proposée ici couple la culture à la détection par RT-PCR puisqu'elle repose sur l'amplification biologique des FRNAPH infectieux en milieu liquide suivie de la recherche des génomes des nouveaux virions produits (*i.e.* ICC-RTqPCR, *Integrated cell culture real-time RT-PCR*) **(Figure 21)**.

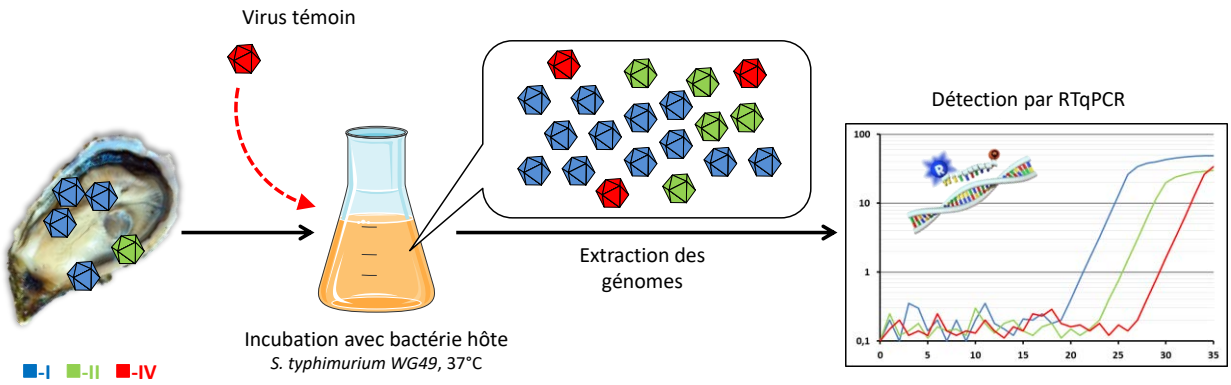

Figure 21 : Principe de l'ICC-RTqPCR appliqué à la détection des FRNAPH infectieux dans les coquillages.

Brièvement lors de l'analyse des coquillages, environ 20 g de tissus sont mixés puis placés dans un milieu nutritif contenant la bactérie hôte *S. typhimurium* WG49. La multiplication des FRNAPH infectieux est alors réalisée au cours d'une incubation de 4 heures à 37°C. La recherche des FRNAPH-IV infectieux présentant peu d'intérêt dans ce type de matrice, l'ajout d'une quantité faible de particules infectieuses de ce génogroupe permet de vérifier la multiplication des FRNAPH dans ces conditions. Après l'incubation, l'amplification des particules infectieuses est vérifiée par l'extraction des génomes à partir du milieu d'incubation suivie de leur recherche en utilisant les systèmes de RT-PCR adéquats.

En termes de sensibilité, la technique mise au point permet de détecter des quantités de l'ordre de 1 à 5 UFP par prise d'essai (*i.e.* 20 g de tissu). Il apparaît par ailleurs que cette sensibilité peut être améliorée par l'analyse d'un volume d'échantillon plus important, à condition de respecter les proportions de chacun des composants du milieu d'incubation. La sensibilité de cette technique a également été étudiée dans la situation ou différents génogroupes de FRNAPH seraient présents dans l'échantillon. Dans ce cas, les essais ont montré que la méthode permettait la détection d'un génogroupe minoritaire (*i.e.* 5 UFP de FRNAPH-II) lorsqu'un autre était présent à des concentrations 1 000 fois plus importantes (*i.e.* FRNAPH-I). Enfin, la détection de quantités croissantes de FRNAPH infectieux a montré que la technique fournissait un résultat semi-quantitatif. Il apparaît en effet que globalement, plus la quantité de FRNAPH infectieux initialement présente dans l'échantillon est importante, plus le signal obtenu en RTqPCR sera précoce. Une forte variabilité a cependant été observée concernant les concentrations inférieures à 100 UFP, ce qui restreint l'emploi de cette technique pour quantifier les échantillons environnementaux.

Dans un dernier temps, afin de valider l'utilisation de cette méthode, l'analyse de lots commerciaux de coquillages a été entreprise. La collecte de 135 lots d'huîtres pendant une période d'un an a ainsi permis la détection des FRNAPH infectieux dans 34 % d'entre eux. La tendance saisonnière concernant l'accumulation des FRNAPH a été confirmée puisque 98 % des lots positifs ont été collectés entre septembre et avril. Les FRNAPH-I étaient largement majoritaires (*i.e.* présents dans 98 % des lots positifs) tandis que les FRNAPH-II ont été détectés dans 9 lots en utilisant les amorces et sondes proposées par Wolf *et al.* (2010). La RT-PCR développée par Ogorzaly & Gantzer (2006) a quant à elle permis la détection des FRNAPH-II infectieux dans seulement trois lots.

En conclusion, la méthode de détection présentée ici permet la recherche sensible de FRNAPH infectieux de chacun des génogroupes dans les coquillages et assure en quelques heures l'analyse d'une prise d'essai conséquente. La limite de détection de cette technique permet l'analyse de coquillages entiers en s'affranchissant de la dissection souvent indispensable lors de l'emploi des autres techniques d'analyse. Son application à des lots commerciaux a notamment permis de souligner pour certains d'entre eux une contamination fécale en l'absence d'*E. coli* dont une minorité (*i.e.* ≤ 7%) semble d'origine humaine. Cette méthode permettrait donc d'investiguer le danger pour l'Homme en tenant compte à la fois d'un paramètre viral et infectieux dans les coquillages.

Food Microbiology 63 (2017) 248–254

Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

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

Rapid and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: Application to marketed products

Cédric Hartard [a, b, c], Sandrine Banas [a, b, c], Romain Rivet [a, b, c], Nicolas Boudaud [d], Christophe Gantzer [a, b, c, *]

[a] Université de Lorraine, LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy F-54000, France
[b] CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy F-54000, France
[c] Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France
[d] Actalia, Food Safety Department, Saint-Lô F-50000, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 August 2016
Received in revised form
29 November 2016
Accepted 7 December 2016
Available online 9 December 2016

Keywords:
F-specific RNA phages
Oysters
ICC-PCR
Prevalence
Fecal pollution

ABSTRACT

F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) have been used as indicators of environmental fecal pollution for many years. While FRNAPH subgroup I (FRNAPH-I) are not host specific, some FRNAPH-II and -III strains appear specific to human pollution. Because a close relationship has been observed between FRNAPH-II genome and human norovirus (NoV) in shellfish, and because FRNAPH infectivity can easily be investigated unlike that of NoV, the detection of human infectious FRNAPH could therefore provide a valuable tool for assessing viral risk. In this study, an integrated cell culture real-time RT-PCR method has been developed to investigate infectious FRNAPH subgroup prevalence in oysters. This rapid screening method appears more sensitive than *E. coli* or NoV genome detection, and allows an FRNAPH subgroup present in low concentrations (0.05 PFU/g of oyster) to be detected in the presence of another 1000 times more concentrated, without any dissection step. Its application to marketed oysters (n = 135) over a 1-year period has allowed to identify the winter peak classically described for NoV or FRNAPH accumulation. Infectious FRNAPH were detected in 34% of batches, and 7% were suspected of having a human origin. This approach may be helpful to evaluate oyster's depuration processes, based on an infectious viral parameter.

Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Bivalve mollusks have long been recognized to be involved in viral outbreaks, due to their ability to accumulate and concentrate microorganisms while filtering large volumes of water. Virus transmission through the consumption of shellfish is generally responsible for gastroenteritis (e.g. norovirus [NoV], Adenovirus) or hepatitis (e.g. hepatitis A virus) (Bellou et al., 2013; Koopmans and Duizer, 2004; Olalemi et al., 2016). Shellfish in contact with waters impacted by fecal contamination (e.g. urban wastewater treatment plant effluents), even during a short period of time (Humphrey and Martin, 1993), are thus mainly at risk (Le Guyader et al., 2000). Among them, oysters are most frequently involved because they are usually consumed raw. Actually, two major problems are repeatedly faced when evaluating the microbiological quality of shellfish.

First of all, the microbiological quality of shellfish harvesting areas in Europe currently depend on their levels of fecal pollution, estimated by *Escherichia coli* (*E. coli*) monitoring (European Parliament, 2004). However, this indicator have long been described as having limitations (de Mesquita et al., 1991; Richards, 1988), and now, it is widely accepted that its rapid depuration does not reflect the behavior of pathogenic viruses (Formiga-Cruz et al., 2002; Lees, 2000). Thereby, despite these controls, outbreaks associated with the consumption of oysters free from *E. coli* have been reported to occur, even after depuration process during an appropriate residence time (Le Guyader et al., 2008).

* Corresponding author. Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, 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 (C. Gantzer).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.002
0740-0020/Published by Elsevier Ltd.

Secondly, many waterborne viruses, especially NoV, are non-cultivable routinely. They are thereby generally targeted by genome detection using RT-PCR (Fuentes et al., 2014; International Organization for Standardization, 2013). It is now commonly admitted that negative or positive results are difficult to interpret regarding virus risk. On the one hand, the main part of the genome detected may correspond to non-infectious viruses because of its higher persistence (Gassilloud et al., 2003; Hartard et al., 2015; Ogorzaly et al., 2010). This may partly explain why NoV genome is often detected in oysters (Costantini et al., 2006; European Food Safety Authority, 2012; Lowther et al., 2012a, 2012b; Mesquita et al., 2011; Terio et al., 2010), whereas the number of reported cases of shellfish–associated NoV outbreaks is conflictingly low. On the other hand, taking into account the sample volume analyzed, the recovery rate, and the presence of RT-PCR inhibitors, the NoV detection threshold using the ISO/TS standard 15216-1 is around 1000 genome copies (gc)/2 g of shellfish hepatopancreas (International Organization for Standardization, 2013), while the estimated 50% infectious dose is approximately 18 infectious particles for NoV (Teunis et al., 2008). This may explain why RT-PCR sometimes failed to detect any genomes in specimens involved in NoV gastroenteritis outbreaks (European Food Safety Authority, 2012). In this context, other indicators must be investigated to assess the risk of infection in case of NoV genome positive results and may also be highly sensitive to overcome the false negative results.

Unlike *E. coli*, F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) are proposed as relevant indicators of viral contamination because of their structural similarity with the main waterborne pathogenic viruses. They are found in high levels in sewage, and may be easily detected by culture, giving information about infectivity. Several arguments justify particularly their detection in shellfish to evaluate virus fate (Doré et al., 2003; Doré et al., 2000; Flannery et al., 2009; Mieszkin et al., 2013). Indeed, these indicators are removed from shellfish more slowly than *E. coli* (Doré et al., 1998; Doré and Lees, 1995). Furthermore, while the presence of ligands promoting NoV accumulation in oysters has been described (Le Guyader et al., 2006; Tian et al., 2007), with a higher rate during the winter season (Maalouf et al., 2010), high accumulation of infectious FRNAPH has also been observed during this period (Burkhardt and Calci, 2000; Doré et al., 2003; Myrmel et al., 2004).

Detection of all infectious FRNAPH is however not recommended because only a few are of human origin (i.e. FRNAPH from subgroup II [FRNAPH-II] and FRNAPH-III) (Cole et al., 2003; Hartard et al., 2015; Schaper et al., 2002). Recent studies have particularly highlighted a close relationship between FRNAPH-II and NoV genome in shellfish (Flannery et al., 2013; Hartard et al., 2016) or in water (Vergara et al., 2015). If considering that FRNAPH-II and NoV have similar behavior, infectious FRNAPH-II can be seen as having strong potential for evaluating viral infection risk. Nevertheless, no rapid method allows the specific detection of infectious FRNAPH-II in shellfish, which are often hidden because of the high prevalence of non-human specific FRNAPH-I (Hartard et al., 2016; Hata et al., 2016). An easy-to-use method able to detect such phages would be very useful if applied to oysters free from *E. coli*, to indirectly assess the viral hazard. Their detection may also be helpful as viral surrogate during shellfish depuration processes.

The objective of this work was to develop a rapid screening method allowing the sensitive detection of infectious FRNAPH-II in oysters. One of the requirements of the method was the possibility to analyze a large sample volume with sufficient sensitivity, in order to lower the detection limit as much as possible. Another requirement was the capacity to detect a minority FRNAPH subgroup (e.g. FRNAPH-II), potentially hidden by the presence of a large number of phages from another subgroup (e.g. FRNAPH-I). Finally, the results had to be done within a working day. An Integrated cell culture real-time RT-PCR method (ICC-RTqPCR) was thus developed and has been used to evaluate the prevalence of infectious FRNAPH in fresh marketed oysters during a 1-year study period.

2. Materials and methods

2.1. Oyster samples

Oysters (*Crassostrea gigas*) were collected from several markets over a 1-year period (n = 135). Between 6 and 14 shellfish batches were collected monthly, depending on the season and market availability. Samples were kept at 4 °C for less than 3 h before shucking. Depending on their sizes, 3 to 5 specimens of the same batch were used for analysis. After shucking, the flesh and intravalvular liquid (FIL) of oysters was mixed for 3 min in a DT-50 tube with Ultra-Turrax® Tube Drive (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany). The oyster homogenate was then stored at −20 °C before analysis.

2.2. Infectious FRNAPH

Mixtures of environmental FRNAPH-I and/or FRNAPH-II strains isolated from a previous study (Hartard et al., 2015) were used to artificially contaminate the oyster samples used for the method development. Quantities used for the contamination were systematically checked by a double agar layer plaque assay method according to ISO standard 10705-1 (International Organization for Standardization, 2001).

2.3. Method development

Development of the method was performed using oyster batches collected in summer (considered '*a priori*' free from infectious FRNAPH). The results obtained for the detection limit allowed samples to be confirmed '*a posteriori*' as being effectively free from infectious FRNAPH.

Culture was performed in 100 mL Erlenmeyer flasks, in a 20 mL final reaction volume. The growing medium used was composed of 2 mL of a 10X tryptone-yeast extract-glucose broth (TYGB), with addition of 200 μL of a calcium-glucose solution prepared as described in ISO standard 10705-1 (International Organization for Standardization, 2001) and 80 μL of a 25 mg/mL kanamycin and nalidixic acid solution. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium WG49 (NCTC12484) was used as the host strain (Havelaar and Hogeboom, 1984). A 2 mL aliquot of the bacteria suspension was added to the growing medium after a preliminary preculture performed as follows: inoculation was performed as described in ISO standard 10705-1 (International Organization for Standardization, 2001) but the 37 °C incubation was extended to 16–18 h to obtain stationary-phase bacteria, with a concentration of approximately 10^9 CFU/mL. Finally, 10 mL of the oyster homogenate was added to the flask and the volume was adjusted to 20 mL with PBS. After artificial contamination with different quantities of infectious FRNAPH, samples were incubated at 37 °C, under agitation (110 rpm), for 2, 4, 8, or 24 h in order to determine the optimal duration for biological amplification and the sensitivity of the technique.

2.4. Genome extraction and real-time RT-PCR

FRNAPH genome extraction was performed after biological amplification from 1 mL of the suspension. After centrifugation (18,000 × *g*, 3 min), 500 μL of the supernatant was collected and

extraction was performed using NucliSens EasyMag (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), in 50 μL of elution buffer. RNA suspensions were then subjected to RTqPCR.

The genomes of each FRNAPH subgroup were detected using primers and probes developed by Wolf et al. (2010), as well as those described by Ogorzaly and Gantzer (2006), under the conditions described in a previous study (Hartard et al., 2015).

2.5. ICC-RTqPCR method used for analysis of fresh marketed oysters

The method was adapted to allow a larger volume of oyster suspension to be analyzed, while keeping original proportions. Culture was performed in 250 mL Erlenmeyer flasks, in a 50 mL final reaction volume. The growing medium was composed of 25 mL of a 2X tryptone-yeast extract-glucose broth (TYGB), 500 μL of a calcium-glucose solution, and 200 μL of a 25 mg/mL kanamycin and nalidixic acid solution. Five mL of the host bacterial suspension was added. The growing medium was innoculate with a FRNAPH-IV suspension (approximately 50 plaque forming units [PFU]/flask). This subgroup, too rare to be detected and exploited in environmental samples, was here used as a culture positive control. Then, 20 mL of the oyster homogenate (equals to 20 g) was added to the flask. Biological amplification was performed at 37 °C for 4 h, under agitation (110 rpm). Genome extraction and detection were performed as described above. Samples were considered positive for an infectious FRNAPH subgroup if RTqPCR corresponding quantification cycle (Cq) values were below 37.

Finally, RNA extracted from positive samples were sequenced as described in a previous study (Hartard et al., 2015), in order to rule out contamination with the FRNAPH strains handled in the laboratory (data not shown).

3. Results

3.1. Determination of the optimal duration of biological amplification

Using an ICC-RTqPCR approach requires adequate incubation time to be allowed for infectious particles to multiply, so that their genomes can be subsequently detected by a molecular method. To determine the optimal duration, several incubation time periods were tested with various initial concentrations of infectious FRNAPH-I, ranging from 10^1 to 10^3 PFU/flask (Table 1).

In view of the results, a 2 h incubation time period did not allow a detectable genome concentration to be obtained in the event of low initial concentration of FRNAPH (i.e. 10^1 PFU/flask). The ensuing result was the generation of Cq values above 38, which could be mistaken for a background signal. On the other hand, an 8 h incubation time period led to the production of a high number of genome, shown by Cq values of around 5.5 for an initial concentration of FRNAPH of 10^3 PFU/flask. Similarly, Cq values were found to be below 4 after a 24 h incubation time period (corresponding to concentrations in the order of 10^{11} genome copies [gc]/mL), even in the event of low initial FRNAPH concentration (i.e. 10^1 PFU/flask). Handling samples with such high virus concentrations may be sources of contamination and should be avoided.

As a result, a 4 h amplification process appears to be the best compromise, leading to the production of viruses in moderate but sufficient amounts to detect their genome. Indeed, whether it is with low (i.e. 10^1 PFU/flask) or high (i.e. 10^3 PFU/flask) initial FRNAPH concentrations, corresponding RTqPCR Cq values were around 18.7 and 13.6, respectively. Obtaining a good quality RTqPCR signal after a 4 h incubation time period in the event of a relatively low initial concentration of infectious particles makes it worthwhile to take a closer look at the sensitivity of the method.

3.2. Method sensitivity

In order to investigate the sensitivity of the method, oyster samples were spiked with various amounts of infectious FRNAPH-I or -II, to obtain final virus concentrations ranging from 5×10^1 to 0.05 PFU/flask (Table 2). When using initial FRNAPH amounts greater than or equal to 5 PFU, positive ICC-RTqPCR signals were obtained in 100% of cases, for both FRNAPH-I ($n = 12$) and FRNAPH-II ($n = 10$) detection. When samples were contaminated with 0.5 PFU/flask, corresponding statistically to 0–4.7 PFU, (95% confidence interval, according to Maul, 1991), a positive ICC-RTqPCR signal was obtained in 57% and 14% of cases, respectively. No genome detection was observed in the event of lower inocula.

The sensitivity of the method was also explored in the presence of multiple FRNAPH subgroups (i.e. FRNAPH-I and -II). Several conditions were tested, especially that of higher concentrations of FRNAPH-I compared to those of FRNAPH-II, as often observed in the environment. The ratios between both subgroups ranged between 1:1 and 1000:1. As described in Table 3, both subgroups were detected by ICC-RTqPCR when mixed together. Specifically, the presence of the minority FRNAPH-II subgroup was detected in 100% of cases, even when infectious particles were inoculated in very low amount (i.e. 5 PFU/flask, corresponding to 1.6–11.7 PFU), while the concentration of infectious FRNAPH-I was 1000-fold greater ($n = 6$).

3.3. Linearity assay

In order to determine if the developed method may provide quantitative information about initial concentrations of FRNAPH in oysters, samples spiked with known concentrations of infectious FRNAPH-I ranging from 0.5 to 5×10^3 PFU/flask were subjected to ICC-RTqPCR, with a 4 h biological amplification time period. It appeared that the higher the initial concentration of FRNAPH was, the lower the corresponding Cq values were (Fig. 1), allowing an overall linear relationship to be observed between Cq values and the $\log_{10}$ of the initial concentrations of FRNAPH ($r^2 = 0.8647$). Nevertheless, a quantitative approach seemed difficult to

Table 1
Quantification cycle (Cq) mean values resulting from FRNAPH-I detection by ICC-RTqPCR, as a function of the initial concentration of infectious FRNAPH and of the duration of the amplification reaction.

Biological amplification time period (h)	Initial infectious FRNAPH-I concentration		
	10^1 PFU/flask	10^2 PFU/flask	10^3 PFU/flask
	Cq mean value ± SD		
2	38.7 ± 1.2	29.5 ± 0.1	27.6 ± 0.2
4	18.7 ± 0.6	16.5 ± 0.1	13.6 ± 0.2
8	15.5 ± 0.1	13.3 ± 0.1	5.5 ± 1.1
24	<4	<4	<4

Table 2
Positive ICC-RTqPCR rates and resulting Cq mean values, as a function of the initial concentration of infectious FRNAPH after a 4 h biological amplification time period.
*, 95% confidence intervals were calculated taking into account the relationship between the Poisson and chi-square distributions (Maul, 1991).

Initial theoretical infectious FRNAPH concentration (PFU/flask)		Detection by ICC-RTqPCR		Cq mean value ± SD
FRNAPH-I				
50	[37.1–65.9]*	100%	(4/4)	18.8 ± 1.1
5	[1.6–11.7]*	100%	(8/8)	24.5 ± 0.8
0.5	[0–4.7]*	57%	(4/7)	27.8 ± 5.1
0.05	[0]*	0%	(0/4)	–
FRNAPH-II				
50	[37.1–65.9]*	100%	(3/3)	24.8 ± 0.8
5	[1.6–11.7]*	100%	(7/7)	28.0 ± 2.3
0.5	[0–4.7]*	14%	(1/7)	37
0.05	[0]*	0%	(0/4)	–

Table 3
Positive ICC-RTqPCR rates and resulting Cq values for the detection of FRNAPH-II after a 4 h biological amplification time period, in the presence of massive FRNAPH-I concentrations.

Initial theoretical infectious FRNAPH concentration (PFU/flask)			FRNAPH-II detection by ICC-RTqPCR		Cq mean value ± SD
FRNAPH-I	FRNAPH-II	Ratio			
5	5	1:1	100%	(n = 3)	26.5 ± 2.9
500	50	10:1	100%	(n = 4)	22.2 ± 2.5
500	5	100:1	100%	(n = 3)	29.2 ± 1.1
5000	50	100:1	100%	(n = 3)	21.1 ± 1.1
5000	5	1000:1	100%	(n = 6)	27.9 ± 2.2

implement, due to the lack of reproducibility shown by variation in Cq values for the same initial virus concentration. As an example, Cq values resulting from a 5×10^1 PFU/flask inoculation ranged between 23.5 and 25.6. More generally, for each initial concentration of FRNAPH of 5 to 5×10^3 PFU/flask, the mean delta Cq value was 2.8, but with lower initial concentrations (i.e. 0.5 PFU/flask), a delta Cq value of 10.6 was observed, which largely prevents Cq values from being linked to the initial concentrations of FRNAPH.

3.4. Application to fresh marketed oysters

The developed ICC-RTqPCR approach was applied to investigate the prevalence of infectious FRNAPH in marketed oysters over a 1-year period, leading to the analyses of 135 batches (Fig. 2). Among them, 34% (n = 46) were positive for the presence of at least 1 infectious FRNAPH subgroup. Infectious FRNAPH-I was in the majority, detected in 98% of positive samples. As for FRNAPH-II, 9 batches (7%) were positive using primers and probe described by Wolf et al. (2010), but only 3 (2%, 1 batch from January, February, and April) were positive using those developed by Ogorzaly and Gantzer (2006). Finally, infectious FRNAPH-III was never detected.

Regarding seasonal distribution, a trend was observed with higher prevalence observed during fall and winter months. The September to April period counted 98% of the positive samples, and the monthly prevalence ranged between 17% and 57%.

4. Discussion

The use of detection methods that combine cell culture and PCR is often described as a solution to investigate the infectivity of non-cytopathic enteric viruses. Indeed, while the infectivity of such viruses cannot be assessed by the gold standard, i.e. when cultivated within host cells, conducting direct PCR assays does not allow the genomes of infectious and inactivated viruses to be distinguished. Craftily, the ICC-PCR approach overcomes most of these limitations (Rodriguez et al., 2009).

In this study, an ICC-RTqPCR approach was developed in order

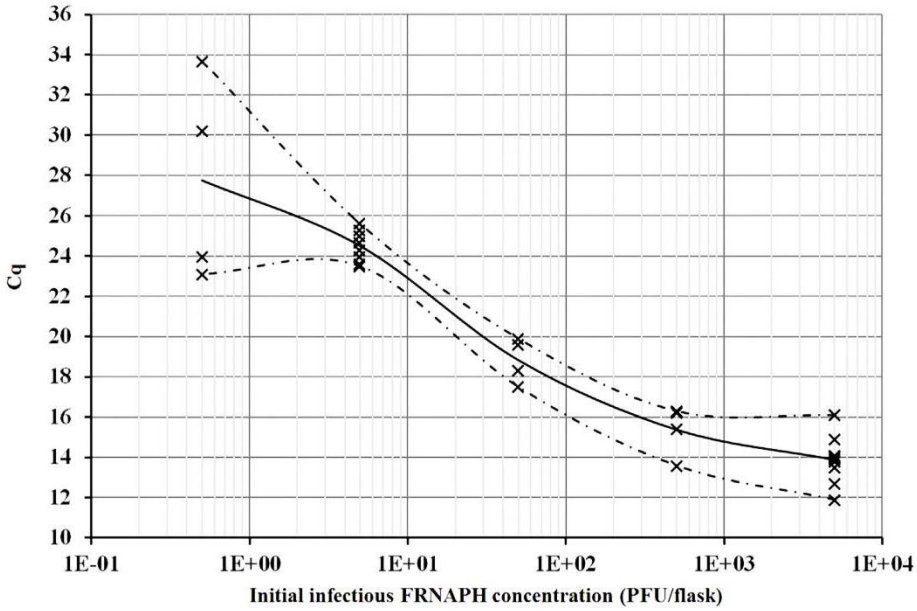

Fig. 1. Relationship between Cq values resulting from RTqPCR after a 4 h biological amplification time period and initial concentrations of infectious FRNAPH-I.

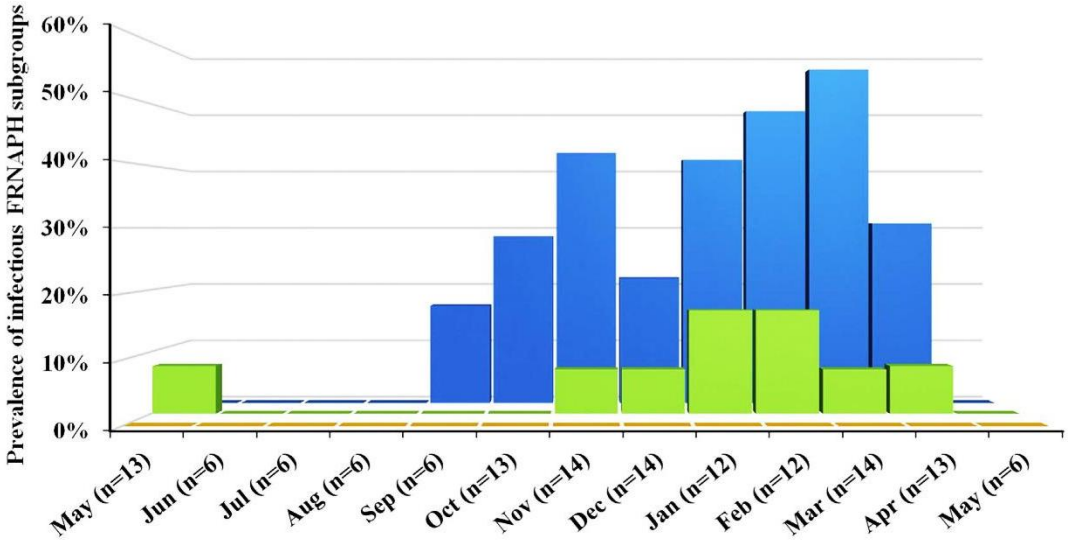

Fig. 2. Prevalence of infectious FRNAPH-I (blue), -II (green), and –III (yellow) estimated in fresh marketed oysters, between May 2015 and May 2016, using an ICC-RTqPCR approach. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

to detect infectious FRNAPH in oysters. FRNAPH being easily detected in shellfish by classical culture (Doré et al., 2003; Doré et al., 2000; Flannery et al., 2013, 2009; Mieszkin et al., 2013), other motivations have led to develop an ICC-RTqPCR approach to detect them. The will was to (i) improve the sensitivity of detection by analyzing large sample volumes, (ii) minimize the preliminary sample preparation that shellfish analyses often require (e.g. hepatopancreas dissection, virus elution), and (iii) provide rapid information on the distribution of infectious FRNAPH subgroups within samples, which was made possible here by the use of specific RTqPCR primers and probes. Indeed, while infectious FRNAPH-II targeting appears particularly interesting in oysters due to their potential as indicators of human viral pollution, especially when considering NoV, their low prevalence compared to FRNAPH-I sometimes makes their detection difficult (Hartard et al., 2016). This type of approach has been used recently to evaluate the distribution of infectious FRNAPH in environmental waters (Hata et al., 2016), but it had never been applied before to complex matrices, such as shellfish.

The approach developed here appears to be particularly sensitive, with a detection limit in the order of 1 infectious particle per volume of sample analyzed (i.e. 20 g of FIL). Moreover, it allows detection of minority infectious FRNAPH-II in the presence of 1000-fold higher concentrations of infectious FRNAPH-I. The FRNAPH concentrations that were used in developing the method were set to mimic those found in environment (Doré et al., 2003; Doré et al., 2000; Flannery et al., 2009), i.e. up to 10^3 PFU/100 g of FIL in the event of massive fecal pollution or combined sewer overflow discharge (Flannery et al., 2013).

In this study, analysis of a 20 mL sample volume (corresponding to 40% of the initial sample volume) allows the detection limit to be significantly reduced (i.e. 5 PFU/100 g of FIL). So low a detection limit enables whole shellfish to be processed, thus avoiding the critical digestive tissue dissection step. Finally, it is still possible to increase the volume of the analyzed samples while keeping the same sensitivity, provided that the proportions of each broth component and the flask volume are respected (data not shown).

In contrast, the detection limits resulting from application of standardized methods (International Organization for Standardization, 2013; 1998) when monitoring other microbiological parameters usually targeted in oysters (i.e. *E. coli* and NoV genome) are reported to be 67–133 most probable number of *E. coli*/100 g of FIL and about 100 gc/2 g of shellfish hepatopancreas for NoV, in the most favorable situation (e.g. no RT-PCR inhibitiors and an extraction rate of 100% using the recommended control process), while in practice, the extraction rates are classically closer to 10% (Hartard et al., 2016). It follow that in the best case, considering that viruses are predominantly present in the hepatopancreas (representing 5% of the total oyster mass), and taking into account the dilution factor implies by the analysis of the whole oyster, the detection of infectious FRNAPH-II in shellfish remains at least 10 and 100 times more sensitive than that of *E. coli* and NoV, respectively. At this stage, it is also important to point out the benefit of targeting infectious FRNAPH as fecal and viral pollution indicators in shellfish compared to *E. coli*, since although 100 times less concentrated than *E. coli* in wastewater, FRNAPH are preferably accumulated in oysters (Burkhardt and Calci, 2000; Hartard et al., 2016).

The last issue investigated in the present study was the potential of the technique to provide quantitative data. In this respect, a trend was observed between initial concentration of infectious FRNAPH and Cq values. Nevertheless, sample-to-sample variability was observed, especially with low infectious concentrations, which prevents this approach from being used in quantitative assessments. The lack of linearity may be mainly explained here by a matrix effect, highlighted by a variation in Cq values also observed when using FRNAPH-IV detection as a positive culture control. Biological amplifications simultaneously performed in watery matrices confirmed that shellfish inhibit FRNAPH multiplication (data not shown). Finally, in addition to the matrix effect, other uncontrollable parameters may interfere with quantitative results when applying the method to environmental samples, as well as variable strain virulence (i.e. infection and multiplication rate), whether inter- or intra-subgroup. This phenomenon may probably explain the RTqPCR signal lags observed with mixed subgroups when assessing the sensitivity of the method, which broadly mimics conditions encountered in the environment. Given the current state of knowledge, this method may thus only be used qualitatively or semi quantitatively.

The ICC-RTqPCR method developed here was subsequently applied to fresh marketed oysters, which involved the absence of detectable *E. coli* in all batches. Samples were considered as positive

for the presence of infectious FRNAPH if the corresponding Cq value after ICC-RTqPCR was below 37. Taking into account the dilution steps carried out during sample processing and the volume used in the RTqPCR reaction, the potential initial presence of FRNAPH genomes in samples cannot interfere when interpreting RTqPCR signals. Indeed, even in the event of a massive fecal pollution as observed in category C harvesting areas (Mieszkin et al., 2013), in prohibited areas (Doré et al., 2003; Mieszkin et al., 2013), or after combined sewer overflow discharges (Flannery et al., 2013), with almost 10^3 to 10^4 PFU detected in 100 mL of water, leading to FRNAPH genome concentrations close to 10^4 gc/100 g of shellfish FIL, such initial genome presence should not be detected after the ICC-RTqPCR. Moreover, if the presence of higher genome amounts resulted in their detection during the RTqPCR reaction, it would be more than likely that they would be accompanied by the presence of infectious FRNAPH.

The findings regarding the prevalence of infectious FRNAPH in marketed oysters showed a seasonal trend, which confirmed the ability of the method to highlight greater accumulation of FRNAPH during winter months, as already described in previous studies (Doré et al., 2003; Doré et al., 2000). Infectious FRNAPH were detected at a significant level (34%), clearly showing that such an analysis is of particular interest when used in conjunction with the regulatory reference *E. coli* detection. The highest prevalence was obtained for FRNAPH-I, which may have an urban or animal origin (Hartard et al., 2015). FRNAPH-II prevalence, more specific to human, was lower (7%). Nevertheless, it has been previously demonstrated that with the primers and probe described by Wolf et al. (2010), some animal FRNAPH-II strains may also be detected. In such a case and given the current state of knowledge, Ogorzaly and Gantzer's primers (2006) have shown higher specificity for detecting FRNAPH-II of a human origin, and only 2% of samples were positive using the latter. Finally, the absence of infectious FRNAPH-III was explained by the fact that this subgroup is rapidly inactivated under natural conditions, thus confirming that no massive recent pollution had occurred in the analyzed samples (Hartard et al., 2015).

5. Conclusion

The developed ICC-RTqPCR approach is highly sensitive, easy to perform, but also cost and time efficient since it does not require any dissection step. Another add-value of this method is the ability to identify residual viral pollution in oysters (i.e. 34%) in the absence of *E. coli*, in which 7% were suspected of being of human origin and which was confirmed for 2% of them. The detection of infectious FRNAPH-II could be very helpful during oyster depuration as an 'infectious viral parameter', providing a more relevant decision-making criteria regarding the viral hazard, in addition to the routinely control of *E. coli* and to that of NoV genome, which is increasingly performed. Further improvement is now needed to develop the quantitative aspect of this approach, and to investigate the relationship between the concentration levels of infectious FRNAPH and the viral health hazard, especially by the analysis of shellfish involved in gastroenteritis outbreaks.

Acknowledgment

This work was supported by the Joint Technological Unit VIROcontrol and the Institut Carnot Energie et Environnement en Lorraine (ICEEL).

References

Bellou, M., Kokkinos, P., Vantarakis, A., 2013. Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. Food Environ. Virol. 5, 13–23. http://dx.doi.org/10.1007/s12560-012-9097-6.

Burkhardt, W., Calci, K.R., 2000. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1375–1378. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1375-1378.2000.

Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6507–6514. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.11.6507-6514.2003.

Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F.S., Saif, L.J., 2006. Human and animal enteric caliciviruses in oysters from different coastal regions of the United States. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1800–1809. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.3.1800-1809.2006.

de Mesquita, M.M.F., Evison, L.M., West, P.A., 1991. Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (Mytilus edulis) under artificial depuration conditions. J. Appl. Bacteriol. 70, 495–501. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02746.x.

Doré, W.J., Henshilwood, K., Lees, D.N., 2000. Evaluation of F-Specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve Molluscan shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1280–1285. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.4.1280-1285.2000.

Doré, W.J., Henshilwood, K., Lees, D.N., 1998. The development of management strategies for control of virological quality in oysters. Water Sci. Technol. 38, 29–35. http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00796-3.

Doré, W.J., Lees, D.N., 1995. Behavior of Escherichia coli and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2830–2834.

Doré, W.J., Mackie, M., Lees, D.N., 2003. Levels of male-specific RNA bacteriophage and Escherichia coli in molluscan bivalve shellfish from commercial harvesting areas. Lett. Appl. Microbiol. 36, 92–96. http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01268.x.

European Food Safety Authority, 2012. Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. EFSA J. 10, 2500. http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2500.

European Parliament, 2004. Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Off. J. Eur. Union L226, 83–127.

Flannery, J., Keaveney, S., Doré, W., 2009. Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oysters. J. Food Prot. 72, 2358–2362.

Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O'Flaherty, V., Doré, W., 2013. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. Water Res. 47, 5222–5231. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.008.

Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D.N., Henshilwood, K., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.-C., Hernroth, B.E., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M.D., Girones, R., 2002. Distribution of human virus contamination in shellfish from different growing areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5990–5998. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.12.5990-5998.2002.

Fuentes, C., Guix, S., Pérez-Rodriguez, F.J., Fuster, N., Carol, M., Pintó, R.M., Bosch, A., 2014. Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water. Food Microbiol. 40, 55–63. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.003.

Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of viral genomes in mineral Water : a sufficient condition to assume infectious Risk . Appl. Environ. Microbiol. 69, 3965–3969. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.7.3965-3965.2003.

Hartard, C., Banas, S., Loutreul, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. Relevance of F-Specific RNA bacteriophages in assessing human norovirus risk in shellfish and environmental waters. Appl. Environ. Microbiol. 82, 5709–5719. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01528-16.

Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., Gantzer, C., 2015. Occurrence of and sequence variation among F-Specific RNA bacteriophage subgroups in feces and wastewater of urban and animal origins. Appl. Environ. Microbiol. 81, 6505–6515. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01905-15.

Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., 2016. Quantitative distribution of infectious F-Specific RNA phage genotypes in surface waters. Appl. Environ. Microbiol. 82, 4244–4252. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00621-16.

Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M., 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J. Appl. Bacteriol. 56, 439–447. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01372.x.

Humphrey, T.J., Martin, K., 1993. Bacteriophage as models for virus removal from Pacific oysters (Crassostrea gigas) during re-laying. Epidemiol. Infect. 111, 325–335.

International Organization for Standardization, 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. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 2001. ISO 10705–1. Water Quality: Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA Bacteriophages. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 1998. ISO 9308–3. Water Quality - Detection and Enumeration of Escherichia coli and Coliform Bacteria in Surface and Waste Water - Part 3: Miniaturized Method (Most Probable Number) by

Inoculation in Liquid Medium. Geneva, Switzerland.
Koopmans, M., Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. Int. J. Food Microbiol. 90, 23–41. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00169-7.
Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E., Pommepuy, M., 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3241–3248. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.8.3241-3248.2000.
Le Guyader, F.S., Le Saux, J.-C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., Atmar, R.L., 2008. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a french oyster-related gastroenteritis outbreak. J. Clin. Microbiol. 46, 4011–4017. http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01044-08.
Le Guyader, F.S., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoën-Clouet, N., Pommepuy, M., Le Pendu, J., 2006. Norwalk virus–specific binding to oyster digestive tissues. Emerg. Infect. Dis. 12, 931–936. http://dx.doi.org/10.3201/eid1206.051519.
Lees, D., 2000. Viruses and bivalve shellfish. Int. J. Food Microbiol. 59, 81–116. http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00248-8.
Lowther, J.A., Gustar, N.E., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012a. Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels. J. Food Prot. 75, 389–393. http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-360.
Lowther, J.A., Gustar, N.E., Powell, A.L., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012b. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5812–5817. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01046-12.
Maalouf, H., Zakhour, M., Le Pendu, J., Le Saux, J.-C., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2010. Distribution in tissue and seasonal variation of norovirus genogroup I and II ligands in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5621–5630. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00148-10.
Maul, A., 1991. Aspects statistiques des méthodes de quantification en virologie, in: L. Schwartzbrod, Virologie Des Milieux Hydriques. Lavoisier, Paris, France, pp. 143–171.
Mesquita, J.R., Vaz, L., Cerqueira, S., Castilho, F., Santos, R., Monteiro, S., Manso, C.F., Romalde, J.L., Nascimento, M.S.J., 2011. Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. Food Microbiol. 28, 936–941. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.005.
Mieszkin, S., Caprais, M.P., Le Mennec, C., Le Goff, M., Edge, T.A., Gourmelon, M., 2013. Identification of the origin of faecal contamination in estuarine oysters using Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophage markers. J. Appl. Microbiol. 115, 897–907. http://dx.doi.org/10.1111/jam.12260.
Myrmel, M., Berg, E.M.M., Rimstad, E., Grinde, B., 2004. Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2678–2684. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.5.2678.
Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C., 2010. Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-Specific RNA phages in raw groundwater. Appl. Environ. Microbiol. 76, 8019–8025. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00917-10.
Ogorzaly, L., Gantzer, C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. J. Virol. Methods 138, 131–139. http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.004.
Olalemi, A., Purnell, S., Caplin, J., Ebdon, J., Taylor, H., 2016. The application of phage-based faecal pollution markers to predict the concentration of adenoviruses in mussels (*Mytilus edulis*) and their overlying waters. J. Appl. Microbiol. 1–11. http://dx.doi.org/10.1111/jam.13222.
Richards, G.P., 1988. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. J. Food Prot. 51, 218–251.
Rodriguez, R.A., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2009. Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples. Appl. Environ. Microbiol. 75, 297–307. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01150-08.
Schaper, M., Jofre, J., Uys, M., Grabow, W.O.K., 2002. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. J. Appl. Microbiol. 92, 657–667. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01600.x.
Terio, V., Martella, V., Moschidou, P., Di Pinto, P., Tantillo, G., Buonavoglia, C., 2010. Norovirus in retail shellfish. Food Microbiol. 27, 29–32. http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.005.
Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: how infectious is it? J. Med. Virol. 80, 1468–1476. http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21237.
Tian, P., Engelbrektson, A.L., Jiang, X., Zhong, W., Mandrell, R.E., 2007. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. J. Food Prot. 70, 2140–2147.
Vergara, G.G.R.V., Goh, S.G., Rezaeinejad, S., Chang, S.Y., Sobsey, M.D., Gin, K.Y.H., 2015. Evaluation of FRNA coliphages as indicators of human enteric viruses in a tropical urban freshwater catchment. Water Res. 79, 39–47. http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.022.
Wolf, S., Hewitt, J., Greening, G.E., 2010. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1388–1394. http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02249-09.

5ème PARTIE

Quelle est la pertinence de la détection des génomes des norovirus dans les coquillages pour évaluer le danger viral ?

Le dernier point que nous avons souhaité vérifier concerne la manière d'interpréter la présence de génomes viraux dans les coquillages en termes de danger pour le consommateur. En d'autres termes, est-il plus pertinent de privilégier la recherche des génomes des NoV ou celle des FRNAPH-II pour lesquels le caractère infectieux est facile à vérifier ? Compte tenu des différences de stabilité entre génomes et caractère infectieux, il est en effet largement démontré que le recours aux techniques moléculaires surestime le danger viral dans l'eau (Choi & Jiang, 2005; Gassilloud *et al.*, 2003; Girones *et al.*, 2010; Ogorzaly *et al.*, 2010). Ce phénomène n'a cependant *a priori* jamais été vérifié dans les coquillages. Afin de confirmer ou de réfuter cette hypothèse, les investigations ont porté sur la recherche des FRNAPH dans les coquillages, puisque ces derniers présentent l'avantage de pouvoir être détectés à la fois par les techniques moléculaires et par culture. L'attention s'est par ailleurs particulièrement portée sur la recherche des FRNAPH-II.

Le lien entre le caractère infectieux des FRNAPH-II et la présence de leurs génomes a été exploré d'une part de manière ponctuelle dans des huîtres provenant de différentes zones de conchyliculture européennes (n = 111) et d'autre part en fonction du temps, par l'analyse d'huîtres naturellement contaminées par ces virus (n = 6) et stockées dans de l'eau de mer non polluée (*i.e.* procédé régulièrement appliqué aux lots de coquillages les plus contaminés). Afin de garantir une sensibilité maximale lors de la détection des FRNAPH, la RT-PCR proposée par Wolf *et al.* (2010) a été utilisée pour rechercher les génomes après leur extraction selon le protocole décrit dans la norme ISO 15216 (International Organization for Standardization, 2017) tandis que la technique d'ICC-RTqPCR décrite précédemment a été employée pour la détection des particules infectieuses (Hartard *et al.*, 2017). Les différents résultats obtenus constituent des points clés présentés dans une quatrième publication acceptée dans *Applied and Environmental Microbiology* (Hartard *et al.*, acceptée en octobre 2017).

L'analyse des coquillages issus des zones conchylicoles a montré un lien significatif entre la présence des FRNAPH-II infectieux et leurs génomes (test de Fisher exact ; $P < 10^{-3}$). Il apparaît néanmoins que parmi les 111 lots analysés, la présence de génomes de FRNAPH-II était prédictive de la présence des particules infectieuses correspondantes dans seulement 62 % des cas. Par ailleurs, parmi l'ensemble des lots négatifs pour la recherche de FRNAPH infectieux, des génomes ont été détectés dans 28 % d'entre eux (*i.e.* faux positifs si on considère la détection des particules infectieuses comme référence). A l'inverse, parmi les échantillons positifs pour la recherche des FRNAPH-II infectieux, l'absence des génomes correspondants a été observée dans 43 % des cas (*i.e.* faux négatifs). Ainsi, il est très important de souligner que la fréquence des faux positifs confirme

la meilleure stabilité des génomes viraux dans les coquillages tandis que la proportion de faux négatifs renforce l'idée que les techniques moléculaires actuellement disponibles ne sont pas capables de détecter les quantités de virus infectieux les plus faibles.

Le lien entre la présence de génomes et des particules infectieuses a également été investigué lors du stockage de coquillages contaminés (n = 6) et dans ce cas, les génomes des NoV ont également été recherchés (International Organization for Standardization, 2017). Les données actuelles de la littérature suggèrent en effet que l'utilisation d'indicateurs pour évaluer la présence des NoV serait peu fiable dans ce type de situation compte tenu de la longue persistance de ces pathogènes (Choi & Kingsley, 2016; Doré *et al.*, 2010; Drouaz *et al.*, 2015; Ueki *et al.*, 2007) et qui plus est, serait liée à la présence de ligands spécifiques présents dans les coquillages (Le Guyader *et al.*, 2006b; Tian *et al.*, 2006). Ces études rapportent en effet que la persistance des FRNAPH dans les coquillages est inférieure à celle des NoV, du moins lorsque ces indicateurs sont recherchés par culture (Loisy *et al.*, 2005b; Neish, 2013; Pommepuy *et al.*, 2003). De manière rationnelle, nous avons donc choisi de comparer leur persistance respective en se basant sur l'utilisation de techniques de biologie moléculaire.

Dans cette étude, la persistance importante des NoV a été confirmée puisque leurs génomes étaient toujours détectés dans les coquillages après 30 jours de stockage (T_{90} estimé à 36,4 jours). De manière intéressante, une persistance supérieure des génomes de FRNAPH-II a été observée (t-test; $P < 10^{-4}$) et un T_{90} de 104,7 jours a pu être estimé. Si on s'intéresse cette fois au comportement relatif des génomes de FRNAPH-II et des particules infectieuses du même génogroupe, les cinétiques d'élimination observées dans cette étude sont très différentes pour ces deux paramètres (t-test; $P < 10^{-4}$). En effet, alors que les génomes des FRNAPH-II sont encore détectés dans les coquillages après 30 jours de stockage, l'absence des particules virales infectieuses correspondantes a été notée durant les derniers jours de stockages (*i.e.* à partir du 14ème, 17ème ou 21ème jour de stockage selon les lots).

En conclusion, cette étude a permis de confirmer que lorsque le génome d'un virus est recherché dans les coquillages, sa meilleure stabilité empêche globalement de conclure concernant la présence concomitante de particules virales infectieuses. Ce phénomène doit être pris en compte aussi bien durant l'analyse des coquillages issus de zones conchylicoles polluées que dans les cas où les lots subissent une étape de stockage dans des bassins d'eau propre dans le but de réduire leur niveau de contamination. Le manque de sensibilité des techniques moléculaires est également apparu problématique lorsqu'il s'agit d'évaluer la présence de particules infectieuses. Si ces observations sont transposées aux NoV, nous pouvons conclure que la recherche de leurs génomes dans les coquillages ne permet pas

d'évaluer le risque pour les consommateurs. Notons d'ailleurs qu'en dépit des concentrations initiales relativement modérées (*i.e.* $5,9 \times 10^2$ à $1,2 \times 10^3$ cg/g d'hépatopancréas), les génomes de NoV du génogroupe GII ont également été détectés tout au long de l'étude concernant la purification des coquillages.

Article accepté dans Applied and Environmental Microbiology

F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of oysters

Running title: F-specific RNA phages as viral indicators in oysters

C. Hartard[1,2,3], M. Leclerc[4], R. Rivet[1,2,3], A. Maul[5], J. Loutreul[4], S. Banas[1,2,3], N. Boudaud[4], C. Gantzer[1,2,3#]

[1]Université de Lorraine, LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy F-54000, France
[2]CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy F-54000, France
[3]Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France
[4]Actalia, Food Safety Department, Saint-Lô F-50000, France
[5]Université de Lorraine, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR 7360, Metz F-57070, France
[#]Corresponding author: Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Albert Lebrun, Nancy F-54000, France.
Phone : (33) 3 72 74 72 92
E-mail : christophe.gantzer@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

Norovirus (NoV) is the leading cause of gastroenteritis outbreaks linked to oyster consumption. In this study, we investigated the potential of F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) as indicators of viral contamination in oysters, by focusing especially on the subgroup FRNAPH-II. These viral indicators have been neglected because of their sometimes different behavior from that of NoV in shellfish, especially during their storage in unpolluted seawater usually performed before marketing. However, a significant bias needs to be taken into account which is that, in the absence of routine culture methods, NoV is targeted by genome detection while FRNAPH presence is usually investigated by isolation of infectious particles. In this study, by targeting both viruses using genome detection, a significant correlation ($P < 10^{-4}$) was observed between FRNAPH-II and NoV in shellfish collected from various European harvesting areas impacted by fecal pollution. Moreover, during their storage, while high persistence of NoV was confirmed, similar or even greater persistence was observed for FRNAPH-II genome over 30 days. Such striking genome persistence calls into question the relevance of molecular methods in assessing viral hazard. Targeting the same virus (*i.e.* FRNAPH-II) by culture and genome detection in specimens coming from harvesting areas as well as during storage, we concluded that the presence of genomes in shellfish does not provide any information on the presence of the corresponding infectious particles. In view of these results, infectious FRNAPH detection should be reconsidered as a valuable indicator in shellfish and its potential for assessing viral hazard needs to be investigated.

KEYWORDS: Norovirus, F-specific RNA bacteriophages, Shellfish, Viral pollution

IMPORTANCE

This work brings new data about the behavior of viruses in shellfish, as well as concerning the relevance of molecular methods to detect them and evaluate the viral hazard. Firstly, a high correlation has been observed between F-specific RNA bacteriophages of subgroup II (FRNAPH-II) and norovirus (NoV) in shellfish impacted by fecal contamination, when both are detected using molecular approaches. Secondly, when using RT-PCR and culture to detect FRNAPH-II in shellfish, it appears that genome of viruses presents higher persistence compared to infectivity, and thus their detection fails to give information about the concomitant presence of infectious viruses. At last, this study shows that persistence of FRNAPH is at least as long as that of NoV. These data are major arguments to reconsider the potential of FRNAPH as indicators of shellfish viral quality.

INTRODUCTION

The link between seafood and foodborne illness has been recognized for over a century (1), and shellfish in particular are well known as vectors of human enteric viruses such as norovirus (NoV) or hepatitis A virus (2–4). Among them, oysters are particularly involved in virus transmission to humans because they are generally consumed raw.

The contamination of shellfish with enteric viruses occurs mostly when harvesting areas are affected by fecally contaminated waters, due for example to inefficient wastewater treatments or plant overflow following rainfall events (3). Microorganisms accumulate in shellfish digestive tissues through filtration of large volumes of seawater (5–7), and probably because of the presence of particular ligands which may favor NoV retention (8–10). The winter season is typically associated with shellfish-borne NoV outbreaks because, during this period, (i) pathogenic viruses circulate in populations and are massively excreted, (ii) better virus stability is observed in the natural environment due to lower water temperatures and low UV radiation, and (iii) NoV is known to accumulate in high concentration in shellfish (11).

Currently, shellfish contamination by pathogenic viruses is difficult to evaluate. Indeed, European regulations (12), based on a bacterial criterion which is *Escherichia coli* detection in shellfish, have shown to have many limitations in identifying viral contamination, and thus shellfish compliant with the legislation may be the source of NoV outbreaks (13–16). This phenomenon, mainly due to different persistence rates in water as well as different accumulation and elimination kinetics between pathogenic viruses and bacterial indicators in shellfish, has led the scientific community to conclude that *E. coli* is not suitable to track viral pollution in shellfish (16, 17). In such a situation, a new virological indicator is needed for shellfish risk management and two completely different strategies may be considered.

The first strategy which seems to be increasingly favored is the specific detection of pathogenic viral genomes by molecular tools. To this end, a new ISO standard method has recently been proposed (18). This approach is a relevant tool for retrospective studies to demonstrate the link between foodstuff and outbreaks. This should not hide the major disadvantages of its application to prospective investigations concerning the evaluation of viral hazard in vulnerable foodstuff like oysters. Indeed, even though it has never been demonstrated in oysters, it is very well recognized that viral genomes have better persistence compared to infectious viruses in the environment, and thus only a negligible part of the detected genomes corresponds in fact to infectious particles (19–22) especially after inactivation by UV (23). More alarmingly, while the absence of genomes is necessarily the sign of the absence of the corresponding infectious viruses, the strict application of the ISO 15216-1 standard expresses a theoretical limit of detection (LOD) higher than the 18 particles usually defined

as being the minimal NoV infective dose (24, 25). It can be 10 to 100 times higher because of the small volume analyzed by RT-PCR, the low recovery rate during genome extraction, and the presence of (RT-)PCR inhibitors. Thus, except in some specific cases (*i.e.* very high levels of pollution or artificial contamination) (26, 27), the number of genome copies of norovirus in oysters is usually close to the limit of detection (16, 28–31), and all these considerations highlight the difficulties in interpreting a positive or negative result when using such an approach.

The second strategy which has been proposed for years is the use of other indicators with the goal of tracking overall viral pollution. Fecal bacteriophages have been shown to be of great interest as fecal indicators in the natural environment (32, 33) and, among them, F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) have numerous advantages. They have been extensively studied because of their structural similarity to many waterborne pathogens. The genome of FRNAPH can be detected by RT-PCR (34, 35) but infectious particles can also be easily quantified (36) or rapidly detected (37). The specific detection of FRNAPH subgroups II and III may also be used to track more specifically human fecal contamination (19, 38, 39), which provides essential information in view of the high host specificity of pathogenic viruses. In shellfish, these indicators persist longer than *E. coli* (40) and as for NoV, better accumulation is observed during the winter period (6, 41). Despite their many advantages, FRNAPH are not, however, commonly used to evaluate the virological quality of oysters. A recent review of the literature shows the advantages and limitations of FRNAPH as viral indicators in shellfish management (42). FRNAPH have been discredited because, even though a number of studies have pointed out a positive correlation between them and enteric viruses in shellfish (24, 26, 43–47), others have expressed opposite views (48–50). A closer look reveals that most studies compare the detection of infectious FRNAPH with that of the human NoV genome. It is due to the fact that human NoV cannot be routinely cultivated even though recent progress has been made (51). Inconsistent correlation with infectious FRNAPH is therefore not so surprising taking into account the well-established greater persistence of viral genomes compared to infectious viruses as underlined above. It may also be assumed that good correlation cases may be linked to a recent fecal pollution, while poor correlation cases may rather be linked to past pollution or the analyses of shellfish subjected to a storage in unpolluted water (*i.e.* in which infectious particles were inactivated but genomes may have been detected). The two cases should not be associated with the same virological health hazard, and such differences are very difficult to discuss because no studies have compared infectious particles and genomes for a single virus in oysters. In the light of this, a strict comparison should only be made by investigating the genomes for both NoV and FRNAPH. In doing so, good correlation has been observed between NoV and FRNAPH, especially when considering human FRNAPH-II subgroup (24, 26). Nevertheless, this observation was made on a limited number of data.

Because oysters are usually consumed raw, the only treatment which may be used for their decontamination is their storage in unpolluted seawater. In such a context, elimination of FRNAPH

and NoV by shellfish has also been investigated. Again, while NoV elimination kinetics is currently assessed using molecular methods (13, 52–55), results concerning FRNAPH are usually obtained by infectious virus detection (40, 56–58) and comparison of the results of most studies may show a significant bias according to differences in stability between the genome and infectivity. Thus, while infectious FRNAPH persistence seems therefore to be lower than that of the NoV genome in shellfish, no information in our knowledge is currently available about the concomitant elimination of FRNAPH and NoV when these two viruses are targeted using molecular approaches. In addition, a large number of studies have been conducted using shellfish artificially contaminated with viruses, leading to very different concentrations from those observed in the environment.

In this context, the aim of this study was to explore if FRNAPH-II (infectious and/or genome) may be good indicators of the virological quality of oysters, especially during their storage. We first verified the correlation between the presence of the FRNAPH-II genome and NoV genome in a significant number of samples (n=111) collected over a one-year period from different class B harvesting areas, and for which *E. coli* and infectious FRNAPH were also monitored to evaluate the overall fecal pollution based on viable microbiological criteria. We secondly compared for the first time the elimination of infectious FRNAPH to that of the corresponding genome, as well as the elimination of the genomes of both FRNAPH and NoV in oysters. To be as close as possible to environmental conditions, the study was performed from three different oyster batches naturally impacted by fecal contamination and subjected to two different storage conditions.

MATERIALS AND METHODS

Oyster samples

In order to study NoV and FRNAPH-II relationship in shellfish, 111 batches of oysters (Crassostrea gigas) were collected from different harvesting areas in France (n=1) and Ireland (n=8) between Jan. 2016 and Jan. 2017. All sampled harvesting areas were classified as B (*i.e. E. coli* concentrations of between 230 and 4,600 MPN/100 g of flesh and intravalvular liquid [FIL]), according to European regulations (12).

Concerning the behavior of microorganisms during storage, three oyster batches collected from class B harvesting areas and positive for NoV genome detection were investigated. After collection, specimens were split into two different sub-batches and subjected to different storage conditions over a 31 to 35 day periods. After sampling, all specimens were kept at 4°C and analyses were performed within 7 days.

Storage conditions

The first half of batches were stored in a pilot tank containing seawater disinfected by continued UV treatment (80-90 mJ/cm²). Water temperature was 12.1°C ± 0.7°C. The second half was placed in a natural class A sea area. Water temperature of the area was 8.7°C ± 2.7°C during the study period.

NoV and FRNAPH genome detection

Human NoV genogroup I (NoV GI) and NoV GII genomes detection was performed from oysters by strictly following the NF EN ISO 15216-1 standard (18). Briefly, after dissection of 10 live specimens, 2 g of hepatopancreas (HP) was finely chopped, supplemented with 10 µL of a 10^4 infectious particles/mL bovine enterovirus type 1 suspension as process extraction control, and then incubated with 2 mL of proteinase K (3 U/mL) at 37°C for 1 h with stirring, followed by a second incubation at 60°C for 15 min. After centrifugation (3,000 × g for 5 min), the supernatant was collected and RNA extraction was performed from 500 µL, using NucliSENS magnetic extraction reagents (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in 100 µL of elution buffer, according to the manufacturer's recommendations. NoV GI and GII genomes were detected using the RNA UltraSense one-step quantitative RT-PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to ISO 15216-1 standard recommendations and quantification was carried out using a standard curve range of 10^1 to 10^5 genome copies (gc)/reaction.

For each subgroup, FRNAPH genome detection was performed from the same RNA extracts produced for NoV detection. Quantification was performed using the RNA UltraSense one-step quantitative RT-PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), from 5 µL of RNA in a 20 µL reaction volume using primers (1,000 nM) and probes (300 nM) designed by Wolf *et al.* (35). The choice of these RT-PCR systems was motivated here by their high sensitivity, even if other systems seem more appropriate for detecting specifically human FRNAPH (19). Quantification was carried out using a standard curve range of 2.5 to 2.5 × 10^4 gc/reaction and the reaction was carried out at 50°C for 30 min (reverse transcription), 5 min at 95°C, followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 40 s at 58°C.

According to the sample preparation procedure and the instructions given in the ISO 15216-1 standard, the theoretical LOD for NoV and FRNAPH, corresponding to the presence of 1 gc in a PCR well, was close to 40 gc/g of HP.

Infectious FRNAPH detection and genotyping

Infectious FRNAPH were detected by two different methods using Salmonella enterica serovar Typhimurium WG49 (NCTC 12484) as the host strain (59). The first method was derived from the ISO 10705-1 standard (36). For each oyster sample, HP tissues from 5 specimens were dissected and mixed with 2 volumes of PBS-0.3% peptone for 3 min in a DT-20 tube with Ultra-Turrax Tube Drive (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany). After centrifugation (2,000 × g for 5 min), the supernatant was collected. Culture was performed from 1.5 mL of supernatant, four times, in 150 mm diameter petri dishes, allowing the analysis of 6 mL of supernatant (corresponding to 2 g of HP). Infectious FRNAPH concentration was expressed in plaque forming units (PFU) per g of HP after an 18 h incubation period.

The second method used for infectious FRNAPH detection was a qualitative ICC-RTqPCR approach performed on the whole shellfish without any dissection step, as described by Hartard *et al.* (37), with slight modifications. Briefly, 10 oyster specimens were mixed for 3 min with a neck blender. Culture of infectious FRNAPH was then performed in 250 mL Erlenmeyer flasks, by adding 20 mL of the oyster mixture, 25 mL of 2X tryptone yeast-extract glucose broth (TYGB), 500 µL of a calcium-glucose solution, 200 µL of a 25 mg/mL kanamycin and nalidixic acid solution, and 30 PFU of FRNAPH-IV used as a culture positive control. Finally, 5 mL of a Salmonella enterica serovar Typhimurium WG49 suspension prepared as described in the ISO 10705-01 standard (36) was added. Biological amplification was performed at 37°C for 4 h, under agitation (110 rpm). Infectious FRNAPH genome extraction was then performed from 1 mL of the total suspension. After centrifugation (18,000 × g, 3 min), 500 µL of the supernatant was collected and extraction was performed using NucliSens EasyMag (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), in 50 µL of elution buffer. The genomes of each FRNAPH subgroup were detected using primers and probes developed by Wolf *et al.* (35), under the conditions described in a previous study (19).

The detection limits of the ISO 10705-01 standard and the ICC-RTqPCR method were 1 PFU/2 g of HP and 1 PFU/20 g of whole shellfish flesh, respectively. Considering that FRNAPH are mainly found in shellfish HP, and that HP corresponds to 5%-10% of the total shellfish mass, the detection limits of these two methods are similar.

***E. coli* detection**

E. coli was detected by direct impedance measurement in shellfish FIL, according to NF V08-106 (60). Results were expressed as most probable number (MPN) and the LOD was 66 MPN of *E. coli*/100 g of FIL.

Statistical analyses

In order to rank the abundance of each microorganism in shellfish, a three level classification was applied. Thus, concerning FRNAPH and NoV genomes, specimens were considered negative (-) if no genomes were detected (< 40 gc/g of HP), positive (+) if concentrations were between 40 and 400 gc/g of HP (*i.e.* 10 times the LOD), and quantifiable (++) over 400 gc/g of HP. Concerning infectious FRNAPH, samples were considered negative (-) when the ICC-RTqPCR approach gave a Cq value greater than 37. Because FRNAPH-I have a better growth rate, the threshold used to differentiate positive (+) from strongly positive (++) samples was 20 for this subgroup while it was 32 for FRNAPH-II and -III. Finally, concerning *E. coli* presence, samples were considered negative (-) when concentrations were below 66 MPN/100 g of FIL, and the threshold used to differentiate positive (+) from strongly positive (++) specimens was 4,600 MPN/100 g of FIL (*i.e.* the threshold used in European regulations). The relationships between these parameters have been investigated using Fisher's exact test.

Concerning microorganism behavior during the storage of oysters, the raw data were subjected to logarithmic transformation before carrying out the statistical analysis. The non-parametric Wilcoxon signed test was used to compare the medians of concentrations of the two conditions. Cochran's test for homogeneity of variances was used to compare the variances associated with the measurements made at a given time for each of the microorganisms considered. Regression analysis was performed to describe the variation in concentrations, which was observed for each microorganism under given experimental conditions, as a linear function of time. The linearity of the depletion models thus obtained was tested by using the F-test. In practice, the F-test compares the variance of the departures from the fitted linear regression line with the experimental variance. Note that if the linear model is adequate, the previous two variances are equal. All statistical analyses were generated using R Statistical Software v.3.4.0.

At last, the decay coefficients corresponding to given experimental conditions were estimated in two different ways, that is (i) from the slope of the fitted regression decay line and (ii) as the weighted mean of the log empirical decay rate calculated from each observation weighed by the associated duration.

RESULTS

Relation between FRNAPH and NoV genomes in shellfish collected from harvesting areas

The collected oysters (n=111) were found to be significantly impacted by fecal pollution, given *E. coli* and infectious FRNAPH prevalence (*i.e.* 31.5% and 93.7%, respectively). Hence, the detection of infectious FRNAPH is proof of fecal contamination, even in the absence of *E. coli*. Among the analyzed batches, infectious FRNAPH-I and -II were respectively detected in 84.7% and 64.9% of cases (Table 1), while only two samples (*i.e.* 1.8%) contained infectious FRNAPH-III.

The monitoring of NoV and FRNAPH genomes was conducted according to ISO 1526-1 standard (International Organization for Standardization, 2017). High heterogeneity was observed both in the recovery rates for genome extraction (average of 29.6% ± 27.0%) and in the RT-PCR inhibition rates (23.3% ± 17.9%), but all samples feel within the performance criteria defined by the standard (>1% for the extraction rate and < 75% for the RT-PCR inhibition, respectively). For the mean recovery and inhibition rates, the LOD was estimated to be around 600 gc/g of HP, nearly 15 times higher than the theoretical value. In the worst case, the recovery (1.2%) and inhibition rates (25%) for a single sample led to a LOD above 10^4 gc/g of HP. However, as suggested in the ISO procedure, these two rates were not used to correct the measured genome concentrations.

Among the analyzed batches, 13.5% where positive for NoV GI genomes (Table 1) and concentrations were estimated to be between 42 and 437 gc/g of HP. Thus, genome concentrations appeared to be relatively low, not exceeding 10 times the LOD. Similarly, NoV GII genomes were detected in 41.4% of the samples, with concentrations ranging from 40 to 1,229 gc/g of HP. Higher prevalence of the NoV GII genome was observed in shellfish during the winter period (Oct. to Apr.) compared to summer (May to Sep.) (Fisher's exact test; P = 0.0006), while NoV GI prevalence was not significantly different between the two seasons (P = 0.2089). Concerning FRNAPH genomes, 52.3% of the analyzed batches were positive and, more precisely, FRNAPH-I, FRNAPH-II, and FRNAPH-III genomes were respectively detected in 9.0%, 46.8% and 2.7% of samples (Table 1). As with NoV GII, a significant seasonal difference was observed for FRNAPH-II, with higher prevalence during the winter period for both genome (Fisher's exact test; P = 0.0025) and infectious particles ($P < 10^{-4}$), and an association was observed between these two parameters (Table 2) (P = 0.0004). Concerning FRNAPH-I, while a slight seasonal difference was detected in infectivity (P = 0.0277), none was observed in the prevalence of its genome between these two periods (P = 1).

Finally, considering the three level classification used to rank microorganism concentrations in shellfish, a significant association was observed between the presence of NoV GII genome and that of FRNAPH-II in shellfish ($P < 10^{-4}$) (Table 3). Conversely, no association was observed between FRNAPH-I and NoV genomes (P = 0.2797).

Elimination of FRNAPH and NoV GII during the storage of oysters

In view of the association between NoV GII and FRNAPH-II genomes in the samples, further investigations were performed to study the behavior of these microorganisms during shellfish storage. Shellfish batches (n=3) were subjected to two different conditions, namely in UV-treated seawater tank and in natural seawater. During their storage, FRNAPH-II and NoV GII were both monitored by genome targeting, while infectious FRNAPH were also quantified by plaque assay and subgroup presence was investigated by a sensitive qualitative approach.

Despite the absence of *E. coli* in the 3 batches, the analyzed samples were found to be significantly impacted by fecal pollution, with an initial concentration of total infectious FRNAPH of 84, 136, and 67 PFU/g of HP in batches 1, 2, and 3, respectively. Initial NoV GII genome concentrations were 593, 992, and 1,230 gc/g of HP, respectively. FRNAPH-II genome concentrations were of the same order of magnitude in batches 1 and 2 (*i.e.* 644 and 860 gc/g of HP), but for the third batch, the concentration reached 1.9×10^4 gc/g of HP. From a qualitative point of view, infectious FRNAPH-I was detected throughout the study period (*i.e.* over 30 days), whereas infectious FRNAPH-II was last detected in batches 1, 2, and 3 at days 17, 14, and 21, respectively (Fig. 1A). Concerning genomes, both NoV GII and FRNAPH-II were detected throughout the study period except for batch 3 for which NoV genome was last detected at day 28.

A statistically significant difference between the two storage conditions was observed for NoV GII genome (Wilcoxon signed test; P = 0.0027), with a geometric mean value measured during the storage in natural seawater that was 21.31% higher than that measured during storage in tank. On the other hand, no significant differences were shown between the two conditions for FRNAPH-II genome (P = 0.0543) and FRNAPH infectious particles (P = 0.7156). This result led us to consider the paired values, obtained by the two conditions at a given time, as replicates for use in subsequent statistical analyses. However, it must be emphasized that the variability corresponding to each of such formed pairs includes both the lab variability and the variability induced by the possible differences between the storage conditions.

The comparison of the variability of the experimental results within the pairs obtained for each of the three parameters during the storage showed that the variances observed within and/or among batches could be considered homogeneous (Cochran's test; P > 0.05). This outcome prompted the calculation of a unique coefficient (*i.e.* coefficient of variation [CV]), which may characterize the variability associated with each parameters. Thus, the CV was estimated to be 54.01% ($CI_{0.95}$ = [38.79%; 67.27%]) for NoV GII, 75.62% ($CI_{0.95}$ = [52.25%; 97.00%]) for FRNAPH-II genomes, and 70.84% ($CI_{0.95}$ = [37.89%; 98.61%]) for infectious FRNAPH particles, respectively. These values point out the high level of variability in the experimental results which were obtained for each of the considered microorganisms.

For each of the parameters, decay coefficients were calculated and reported in Table 4. Interestingly, a two-phase decrease may be described for each of them, with a breaking point observed after the first day of storage. This phenomenon seems to be particularly marked for FRNAPH-II genome, for which a sharp slowdown in the depletion is observed after the first day (*i.e.* decay coefficient < 0.28 for the first day and > 0.98 after day 1).

Taking into account the two-phase decrease, regression analyses were performed after the first day of storage and their outcome is summarized in Table 5. From these results, it can be pointed out that the slopes of all the fitted lines represented on Fig. 1A and B corresponding to both NoV GII genome and infectious FRNAPH-II are significantly different from zero (t-test; $P < 10^{-3}$), on the contrary to FRNAPH-II genome ($P > 0.25$). With regard to the *F*-tests (data not shown) which were performed to compare the variances of both the departures from the linear regression and the replications, 8 of the 9 tests carried out yielded a non-statistically significant result ($P > 0.20$). Despite the high level of variability in the experimental results obtained in this study, all these results are thus in favor of the suitability of the log-linear model. In other words, this means an exponential decay for each of the three parameters as a function of time after day 1. Note that the decay coefficients estimated from the slopes of the regression lines (Table 5) are very similar to those reported in Table 4, which were calculated from the geometric weighted means of the empirical decay rates.

Furthermore, the estimated decay coefficient for FRNAPH-II genome is significantly higher than the corresponding coefficient of both infectious FRNAPH and NoV GII genome (t-test; $P < 10^{-4}$). Seen another way, this means that the decay of FRNAPH-II genome is significantly slower than that of the other two. More precisely, the T_{90} values, which are estimated before (and after) the day 1 breaking point, are: 3.7 d^{-1} (36.4 d^{-1}) for NoV GII, 1.8 d^{-1} (140.7 d^{-1}) for FRNAPH-II genomes, and 4.3 d^{-1} (21.3 d^{-1}) for infectious FRNAPH, respectively.

DISCUSSION

The first objective of this study was to evaluate the interest of FRNAPH as indicators of NoV pollution in oysters by using comparable molecular approaches for both viruses (*i.e.* RT-PCR). The second objective was then to elucidate the difference between infectious viral particles and viral genome in terms of prevalence and of behavior in oysters naturally affected by fecal contamination, as well as during storage, focusing on a single virus (*i.e.* FRNAPH).

Shellfish were collected over a one-year period from several class B harvesting areas (n=111) which explain the significant number of samples positive for *E. coli* (*i.e.* 31.5%). The use of a

qualitative approach (37) underlined that more than 90% of specimens were positive for infectious FRNAPH detection (*i.e.* 84.7% positive for infectious FRNAPH-I and 64.9% positive for infectious FRNAPH-II). We confirmed, in accordance with other works, the lack of relation between the regulatory indicator *E. coli* and infectious viral indicators such as FRNAPH (24, 41, 44). Compared to results obtained during a one-year surveillance period of marketed oysters for which only 34% and 7% of the samples were respectively positive for infectious FRNAPH-I and -II using the same qualitative method (37), oysters sampled in the present study seemed more impacted by fecal pollution.

In such conditions, a significant relationship was observed between the presence of NoV GII genome and that of FRNAPH-II in oysters ($P < 10^{-4}$), with higher prevalence in winter. Based on the analysis of a large number of batches coming from several European areas, this means that FRNAPH-II and NoV GII particles both followed by genome detection have similar behaviors, including occurrence in water, adhesion to oyster tissues, as well as persistence and release from shellfish.

When focusing only on storage conditions applied to oysters coming from polluted areas, many studies have shown not only the incidence of physico-chemical conditions (*i.e.* water temperature, salinity, dissolved oxygen) and shellfish physiology, but also the impact of the initial microorganism load (*i.e.* natural or artificial contamination) (61–64). For these reasons, we decided to work with naturally NoV contaminated oysters which were also positive for FRNAPH because of the high correlation discussed above. The initial viral loads were therefore moderate but conditions were very closer to those found in the environment. Interestingly we demonstrated no differences in FRNAPH decay between storage in natural seawater and in UV-treated seawater tanks, and minor differences in NoV decay in favor of the storage in tank.

We confirm, as also reported in numerous studies (13, 52, 53, 55) the very high persistence of NoV genome during shellfish storage. Such high persistence (*i.e.* > 30 days in our study) has, however, compromised the use of any other proxy indicators including FRNAPH. Moreover, the suspected involvement of specific ligands explaining the persistence of NoV in shellfish has been an additional argument for rejecting FRNAPH as an indicator (8, 65). However, it is important to note that, in all aforementioned studies, comparison with FRNAPH persistence was rarely made and, if so, only infectious FRNAPH was followed.

We completely confirmed the results described above in terms of persistence of NoV genome compared to infectious FRNAPH during the storage of oysters. However, when investigating the persistence of FRNAPH by genome targeting, we clearly demonstrated similar behavior of NoV and FRNAPH-II genomes or even higher persistence of the latter. These observations may reopen the debate on the use of FRNAPH as an indicator of NoV behavior in shellfish.

Under these circumstances, the second point which needs to be discussed here is the relevance of the detection of viral genomes to assess the presence of infectious particles in shellfish. To that end, conclusions should be drawn from data collected during the monitoring of the same virus, both by following infectious particles and associated genome by culture and molecular detection, respectively. Thus, while FRNAPH-II genome was present in shellfish throughout their storage, no corresponding infectious particles were detected in the last days when using the sensitive qualitative approach proposed by Hartard *et al.* (37). The high persistence of FRNAPH-II genome and the inability to eliminate it even after extended storage illustrate the fact that linking the presence of genomes with that of corresponding infectious microorganisms appears to be an unconvincing strategy, especially concerning NoV risk management. In that sense, it should also be underlined that, despite moderate initial concentrations, NoV GII genomes were detected in shellfish during the entire study period too (*i.e.* over 30 days).

As previously observed using murine NoV (66), a two-phase elimination could thus be considered during genome decay, with a pronounced decrease in the first days of storage, followed by subsequent stabilization with a slower elimination rate, leading to a residual basal concentration of viruses in shellfish. Hence, the first phase could be associated with the viral particles elimination, while the second phase could be just the result of the degradation of residual genomes present in shellfish, leading to concentrations close to the LOD using the ISO 15216-1 standard (18) (*i.e.* 40 gc/g of HP in the best case), and thus hardly quantifiable in such samples. Taking into account the striking persistence of genomes compared to that of viral particles, the 28-days minimum closure period for shellfish production areas, established following a significant pollution incident or a known NoV outbreak, may be discussed (30, 67).

Finally, similar conclusions concerning the presence of infectious particles and viral genomes may be drawn from the analyses of the 111 oyster samples impacted by fecal contamination in several class B harvesting areas studied. Although an association was observed between FRNAPH-II genomes and infectious FRNAPH-II particles ($P < 10^{-3}$), the genome presence was predictive of infectivity in only 62% of cases. Furthermore, among the negative samples for infectious FRNAPH-II detection, 28% were positive for corresponding genomes (*i.e.* false-positive results), mainly linked to the better persistence of genomes compared to infectivity (19–22). On the opposite, among positive samples for infectious particles detection, 43% were negative for genome (*i.e.* false-negative results), probably explained by the difference between the LOD of the methods used (*i.e.* 1 PFU/ 20 g of whole shellfish by culture and up to 10^4 gc/g of HP in the worst case scenario using the ISO 15216-1 by taking into account the recovery and inhibition rates).

To conclude, this study reveals that genome detection provides limited information about the presence of associated infectious viral particles in oysters, either in harvesting areas or when

monitoring their storage. Indeed, a significant difference was observed between infectious particle and genome decays, and viral genomes may still be present in shellfish, and more broadly in food commodities, in the absence of infectious particles. Conversely, the presence of infectious viral particles is undoubtedly associated with the presence of the corresponding genomes, but the latter is commonly unquantifiable or even undetectable using currently available standardized methods.

Concerning the use of a proxy indicator which may thus be useful to assess viral pollution more effectively, similar trends and a relationship have been observed between NoV behavior and that of FRNAPH-II, with the same limitations in the detection of their genomes. However, contrary to NoV, FRNAPH-II infectivity is easily assessable and they should therefore be reconsidered as potential indicators of a viral hazard in shellfish. Further investigations are now needed to gain a better understanding of the behavior of infectious FRNAPH and that of infectious NoV in shellfish and in the associated environment. This will be made possible when the cell culture approach is more routinely handled for NoV.

ACKNOLEDGEMENTS

The results of this study were obtained within the scope of OxyVir, a project funded by the “Fonds Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche” (FEAMP). This study was supported by the Joint Technological Unit ACTIA VIROcontrol, the “Institut Carnot Energie et Environnement en Lorraine” (ICEEL) and the “Conseil Régional de Normandie”.

REFERENCES

1. Richards GP. 1988. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. J Food Prot 51:218–251.

2. Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinjé J, de Medici D, Monroe S. 2002. Foodborne viruses. FEMS Microbiol Rev 26:187–205.

3. Campos CJA, Lees DN. 2014. Environmental Transmission of Human Noroviruses in Shellfish Waters. Appl Environ Microbiol 80:3552–3561.

4. Bellou M, Kokkinos P, Vantarakis A. 2013. Shellfish-Borne Viral Outbreaks: A Systematic Review. Food Environ Virol 5:13–23.

5. Schwab KJ, Neill FH, Estes MK, Metcalf TG, Atmar RL. 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. J Food Prot 61:1674–1680.

6. Burkhardt W, Calci KR. 2000. Selective Accumulation May Account for Shellfish-Associated Viral Illness. Appl Environ Microbiol 66:1375–1378.

7. Atmar RL, Neill FH, Woodley CM, Manger R, Shay Fout G, Burkhardt W, Leja L, McGovern ER, Le Guyader F, Metcalf TG, Estes MK. 1996. Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. Appl Environ Microbiol 62:254–258.

8. Tian P, Bates AH, Jensen HM, Mandrell RE. 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. Lett Appl Microbiol 43:645–651.

9. Le Guyader FS, Loisy F, Atmar RL, Hutson AM, Estes MK, Ruvoën-Clouet N, Pommepuy M, Le Pendu J. 2006. Norwalk Virus–specific Binding to Oyster Digestive Tissues. Emerg Infect Dis 12:931–936.

10. Tian P, Engelbrektson AL, Jiang X, Zhong W, Mandrell RE. 2007. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. J Food Prot 70:2140–2147.

11. Maalouf H, Zakhour M, Le Pendu J, Le Saux J-C, Atmar RL, Le Guyader FS. 2010. Distribution in Tissue and Seasonal Variation of Norovirus Genogroup I and II Ligands in Oysters. Appl Environ Microbiol 76:5621–5630.

12. European Parliament. 2004. Regulation (EC) no. 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. Off J Eur Union L226:83–127.

13. Doré B, Keaveney S, Flannery J, Rajko-Nenow P. 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. Euro Surveill. 15:pii=19567.

14. Le Guyader FS, Bon F, DeMedici D, Parnaudeau S, Bertone A, Crudeli S, Doyle A, Zidane M, Suffredini E, Kohli E, Maddalo F, Monini M, Gallay A, Pommepuy M, Pothier P, Ruggeri FM. 2006. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. J Clin Microbiol 44:3878–3882.

15. Chalmers JWT, McMillan JH. 1995. An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. Epidemiol Infect 115:163–167.

16. Lowther JA, Avant JM, Gizynski K, Rangdale RE, Lees DN. 2010. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. J Food Prot 73:305–311.

17. Lees D. 2010. International standardisation of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish. Food Environ Virol 2:146–155.

18. International Organization for Standardization. 2017. NF EN ISO 15216-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification. Geneva, Switzerland.

19. Hartard C, Rivet R, Banas S, Gantzer C. 2015. Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins. Appl Environ Microbiol 81:6505–6515.

20. Ogorzaly L, Bertrand I, Paris M, Maul A, Gantzer C. 2010. Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater. Appl Environ Microbiol 76:8019–8025.

21. Gassilloud B, Schwartzbrod L, Gantzer C. 2003. Presence of Viral Genomes in Mineral Water : a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk ? Appl Environ Microbiol 69:3965–3969.

22. Choi S, Jiang SC. 2005. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. Appl Environ Microbiol 71:7426–7433.

23. Simonet J, Gantzer C. 2006. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. Appl Environ Microbiol 72:7671–7677.

24. Hartard C, Banas S, Loutreul J, Rincé A, Benoit F, Boudaud N, Gantzer C. 2016. Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters. Appl Environ Microbiol 82:5709–5719.

25. Teunis PFM, Moe CL, Liu P, Miller SE, Lindesmith L, Baric RS, Le Pendu J, Calderon RL. 2008. Norwalk virus: How infectious is it? J Med Virol 80:1468–1476.

26. Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Doré W. 2013. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. Water Res 47:5222–5231.

27. Flannery J, Keaveney S, Rajko-Nenow P, O'Flaherty V, Doré W. 2012. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. Appl Environ Microbiol 78:3400–3406.

28. Lowther JA, Gustar NE, Hartnell RE, Lees DN. 2012. Comparison of Norovirus RNA Levels in Outbreak-Related Oysters with Background Environmental Levels. J Food Prot 75:389–393.

29. Lowther JA, Gustar NE, Powell AL, Hartnell RE, Lees DN. 2012. Two-Year Systematic Study To Assess Norovirus Contamination in Oysters from Commercial Harvesting Areas in the United Kingdom. Appl Environ Microbiol 78:5812–5817.

30. Hassard F, Sharp JH, Taft H, LeVay L, Harris JP, McDonald JE, Tuson K, Wilson J, Jones DL, Malham SK. 2017. Critical Review on the Public Health Impact of Norovirus Contamination in Shellfish and the Environment: A UK Perspective. Food Environ Virol 9:123–141.

31. Le Mennec C, Parnaudeau S, Rumebe M, Le Saux J-C, Piquet J-C, Le Guyader SF. 2017. Follow-Up of Norovirus Contamination in an Oyster Production Area Linked to Repeated Outbreaks. Food Environ Virol 9:54–61.

32. Jofre J, Lucena F, Blanch A, Muniesa M. 2016. Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. Water 8:199.

33. Skraber S, Gassilloud B, Gantzer C. 2004. Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water. Appl Environ Microbiol 70:3644–3649.

34. Ogorzaly L, Gantzer C. 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. J Virol Methods 138:131–139.

35. Wolf S, Hewitt J, Greening GE. 2010. Viral Multiplex Quantitative PCR Assays for Tracking Sources of Fecal Contamination. Appl Environ Microbiol 76:1388–1394.

36. International Organization for Standardization. 2001. ISO 10705-1. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland.

37. Hartard C, Banas S, Rivet R, Boudaud N, Gantzer C. 2017. Rapid and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: Application to marketed products. Food Microbiol 63:248–254.

38. Vergara GGRV, Goh SG, Rezaeinejad S, Chang SY, Sobsey MD, Gin KYH. 2015. Evaluation of FRNA coliphages as indicators of human enteric viruses in a tropical urban freshwater catchment. Water Res 79:39–47.

39. Arredondo-Hernandez LJR, Diaz-Avalos C, Lopez-Vidal Y, Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M. 2017. FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems. PLoS One 12:e0170399.

40. Doré WJ, Lees DN. 1995. Behavior of Escherichia coli and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. Appl Environ Microbiol 61:2830–2834.

41. Doré WJ, Mackie M, Lees DN. 2003. Levels of male-specific RNA bacteriophage and Escherichia coli in molluscan bivalve shellfish from commercial harvesting areas. Lett Appl Microbiol 36:92–96.

42. Hodgson KR, Torok VA, Turnbull AR. 2017. Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusc management. Food Microbiol 65:284–293.

43. Doré WJ, Henshilwood K, Lees DN. 2000. Evaluation of F-Specific RNA Bacteriophage as a Candidate Human Enteric Virus Indicator for Bivalve Molluscan Shellfish. Appl Environ Microbiol 66:1280–1285.

44. Flannery J, Keaveney S, Doré W. 2009. Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oyster. J Food Prot 72:2358–2362.

45. Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN. 2008. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. J Food Prot 71:1427–1433.

46. FDA. 2015. National Shellfish Sanitation Program (NSSP) - Guide for the control of molluscan shellfish 2015.

47. Goblick GN, Anbarchian JM, Woods J, Burkhardt W, Calci K. 2011. Evaluating the Dilution of Wastewater Treatment Plant Effluent and Viral Impacts on Shellfish Growing Areas in Mobile Bay, Alabama. J Shellfish Res 30:979–987.

48. Formiga-Cruz M, Allard AK, Conden-Hansson A-C, Henshilwood K, Hernroth BE, Jofre J, Lees DN, Lucena F, Papapetropoulou M, Rangdale RE, Tsibouxi A, Vantarakis A, Girones R. 2003. Evaluation of Potential Indicators of Viral Contamination in Shellfish and Their Applicability to Diverse Geographical Areas. Appl Environ Microbiol 69:1556–1563.

49. Muniain-Mujika I, Calvo M, Lucena F, Girones R. 2003. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. Int J Food Microbiol 83:75–85.

50. Croci DL, De Medici D, Scalfaro C, Fiore A, Divizia M, Donia D, Cosentino AM, Moretti P, Costantini G. 2000. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and Escherichia coli in Adriatic Sea mussels. J Appl Microbiol 88:293–298.

51. Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, Broughman JR, Karandikar U, Tenge VR, Neill FH, Blutt SE, Zeng X-L, Qu L, Kou B, Opekun AR, Burrin D, Graham DY, Ramani S, Atmar RL, Estes MK. 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. Science 353:1387–1393.

52. Choi C, Kingsley DH. 2016. Temperature-Dependent Persistence of Human Norovirus Within Oysters (Crassostrea virginica). Food Environ Virol 8:141–147.

53. Ueki Y, Shoji M, Suto A, Tanabe T, Okimura Y, Kikuchi Y, Saito N, Sano D, Omura T. 2007. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. Appl Environ Microbiol 73:5698–5701.

54. Nappier SP, Graczyk TK, Schwab KJ. 2008. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by Crassostrea virginica and Crassostrea ariakensis oysters. Appl Environ Microbiol 74:6825–6831.

55. Drouaz N, Schaeffer J, Farkas T, Le Pendu J, Le Guyader FS. 2015. Tulane virus as a potential surrogate to mimic norovirus behavior in oysters. Appl Environ Microbiol 81:5249–5256.

56. Love DC, Lovelace GL, Sobsey MD. 2010. Removal of Escherichia coli, Enterococcus fecalis, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (Crassostrea virginica) and hard shell clams (Mercinaria mercinaria) by depuration. Int J Food Microbiol 143:211–217.

57. Olalemi A, Purnell S, Caplin J, Ebdon J, Taylor H. 2016. The application of phage-based faecal pollution markers to predict the concentration of adenoviruses in mussels (Mytilus edulis) and their overlying waters. J Appl Microbiol 121:1152–1162.

58. Muniain-Mujika I, Girones R, Tofio-Quesada G, Calvo M, Lucena F. 2002. Depuration dynamics of viruses in shellfish. Int J Food Microbiol 77:125–133.

59. Havelaar AH, Hogeboom WM. 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J Appl Bacteriol 56:439–447.

60. AFNOR. 2010. NF V08-106. Enumeration of Escherichia coli in live shellfish - Indirect technique using direct impedance measurement. La Plaine Saint-Denis, France.

61. Campos CJA, Kershaw S, Morgan OC, Lees DN. 2017. Risk factors for norovirus contamination of shellfish water catchments in England and Wales. Int J Food Microbiol 241:318–324.

62. Lees D. 2000. Viruses and bivalve shellfish. Int J Food Microbiol 59:81–116.

63. Pommepuy M, Caprais M-P, Le Saux J-C, Le Mennec C, Parnaudeau S, Madec Y, Monier M, Brest G, Le Guyader F. 2003. Evaluation of viral shellfish depuration in a semi-professional tank, p. 485–499. In Villalba, A, Reguera, B, Romalde, JL, Beiras, R (eds.), Molluscan Shellfish Safety - conselleria de pesca e assuntos maritimos da xunta de galicia and intergovernmental oceanographic commission of UNESCO, Santiago de Compostela (Spain).

64. Olalemi A, Baker-Austin C, Ebdon J, Taylor H. 2016. Bioaccumulation and persistence of faecal bacterial and viral indicators in Mytilus edulis and Crassostrea gigas. Int J Hyg Environ Health 219:592–598.

65. Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J. 2012. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. Curr Opin Virol 2:103–110.

66. Polo D, Feal X, Varela MF, Monteagudo A, Romalde JL. 2014. Depuration kinetics of murine norovirus in shellfish. Food Res Int 64:182–187.

67. DGAL. 2017. Gestion du risque norovirus en lien avec la consommation de coquillages - Protocole cadre de gestion DGAL/SDSSA/2017-326 du 11 avril 2017

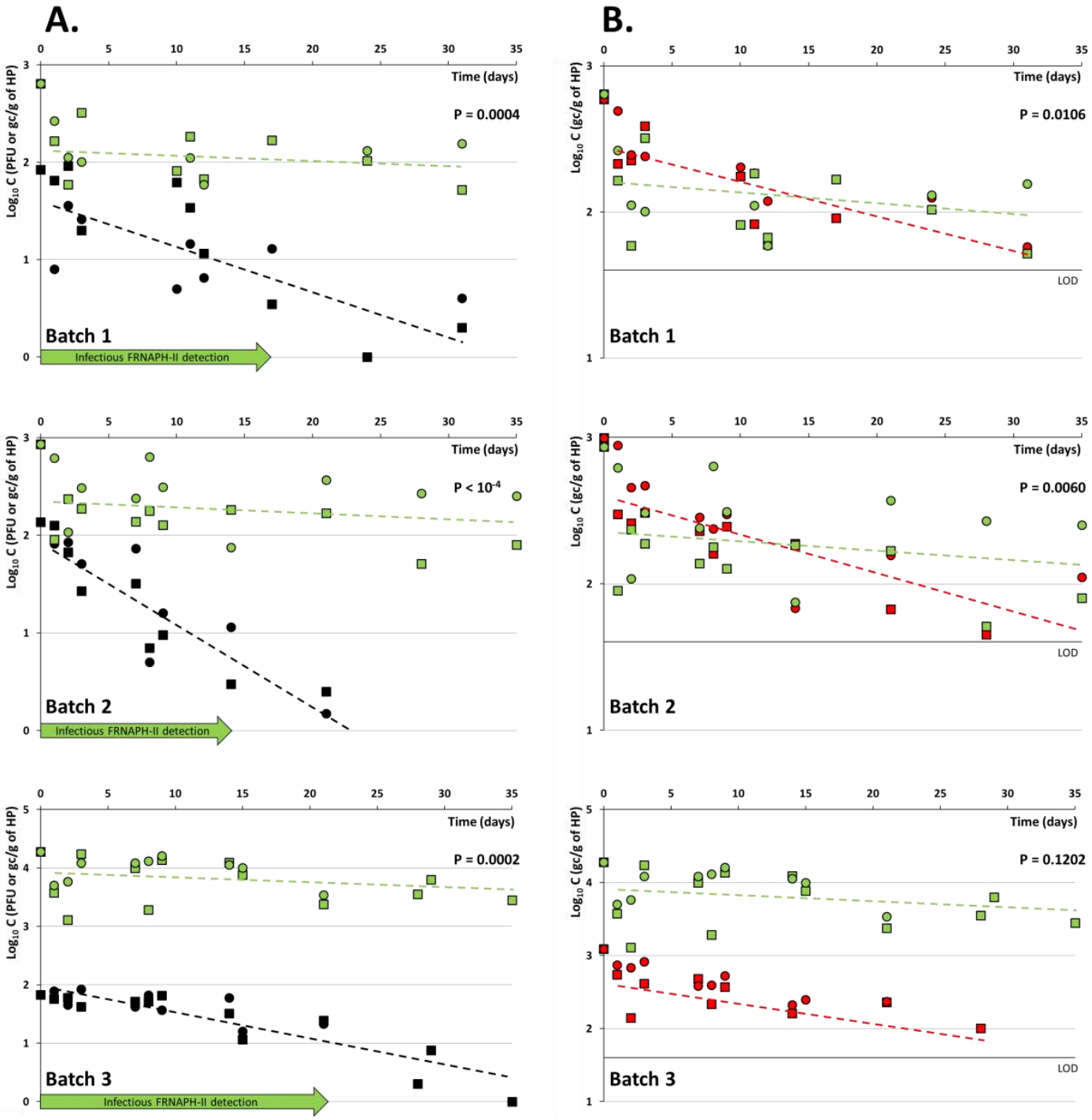

Fig. 1: Behavior of FRNAPH and NoV GII during the storage of oysters. A. Comparison of the decrease in infectious FRNAPH with that in FRNAPH-II genome. B. Comparison of the decrease in NoV GII genome with that in FRNAPH-II genome. Square symbols = storage in UV-treated seawater tanks; circle symbols = storage in natural seawater; black symbols = infectious FRNAPH; green symbols = FRNAPH-II genome; red symbols = NoV GII genome; LOD = detection limit (*i.e.* 40 gc/g of shellfish hepatopancreas [HP]). Dotted lines correspond to log-linear decays observed after day 1. The p-value corresponding to the t-test for comparing the two slopes is indicated in each graph.

Table 1. Prevalence of NoV, FRNAPH and *E. coli* in shellfish.

	Genome					Infectious particles			
	NoV GI	NoV GII	FRNAPH-I	FRNAPH-II	FRNAPH-III	FRNAPH-I	FRNAPH-II	FRNAPH-III	*E. coli*
Winter (Oct. to Apr.) (n=98)	15.3 % (n=15)	46.9 % (n=46)	9.2 % (n=9)	52.0 % (n=51)	2.0 % (n=2)	87.6 % (n=86)	72.5 % (n=71)	1.0 % (n=1)	32.7 % (n=32)
Summer (May to Sep.) (n=13)	0 %	0 %	7.7 % (n=1)	7.7 % (n=1)	7.7 % (n=1)	61.5 % (n=8)	7.7 % (n=1)	7.7 % (n=1)	23.1 % (n=3)
Total (n=111)	13.5 %	41.4 %	9.0 %	46.8 %	2.7 %	84.7 %	64.9 %	1.8 %	31.5 %

Table 2. Contingency table for the detection of infectious FRNAPH-II particles and FRNAPH-II genome in shellfish batches.

FRNAPH-II genome detection	Infectious FRNAPH-II detection		
	-	+	++
-	**28**	17	14
+	10	**6**	15
++	1	5	**15**

Table 3. Contingency table for the detection of FRNAPH-II and NoV GII genomes in shellfish batches.

FRNAPH-II genome detection	NoV GII genome detection		
	-	+	++
-	**49**	9	1
+	11	**13**	7
++	5	7	**9**

Table 4. Estimated decay coefficients for each of the parameters during the storage of shellfish.

		NoV GII genome	FRNAPH II genome	Infectious FRNAPH
Batch 1	$t \leq 1$*	0.5499	0.3244	0.2712
	$t > 1$	0.9195 [0.8944 ; 0.9451]	0.9397 [0.9062 ; 0.9745]	0.9361 [0.9046 ; 0.9686]
Batch 2	$t \leq 1$*	0.5167	0.2751	0.7472
	$t > 1$	0.9127 [0.8888 ; 0.9360]	0.9806 [0.9483 ; 1.0140]	0.8597 [0.8333 ; 0.8872]
Batch 3	$t \leq 1$*	0.5191	0.2292	0.9994
	$t > 1$	0.9256 [0.8926 ; 0.9597]	1.0397 [1.028 ; 1.0759]	0.9253 [0.8954 ; 0.9563]
Whole	$t \leq 1$*	0.5335	0.2735	0.5872
	$t > 1$	0.9003 [0.8848 ; 0.9160]	0.9873 [0.9676 ; 1.0076]	0.9049 [0.8880 ; 0.9222]

The limits of a confidence interval at the 95% probability level are indicated between brackets. * for $t \leq 1$, estimation of the decay coefficients was computed from a limited number of observations (*i.e.* $n \leq 6$), hence the absence of $CI_{0.95}$.

Table 5. Regression analyses for each of the parameters during the storage of shellfish after the first day. a = slope; dc = decay coefficient.

	NoV GII genome	FRNAPH II genome	Infectious FRNAPH
Batch 1	a = - 0.0283 P < 10^{-4} dc = 0.9370 r^2 = 0.6747	a = - 0.0061 P = 0.3596 dc = 0.9860 r^2 =0.0527	a = - 0.0466 P = 0.0002 dc = 0.8982 r^2 =0.5969
Batch 2	a = - 0.0284 P < 10^{-4} dc = 0.9366 r^2 = 0.6804	a = - 0.0064 P = 0.2941 dc = 0.9855 r^2 = 0.0609	a = - 0.0797 P < 10^{-4} dc = 0.8324 r^2 = 0.7641
Batch 3	a = - 0.0234 P = 0.0012 dc = 0.9476 r^2 = 0.4901	a = - 0.0082 P = 0.2884 dc = 0.9814 r^2 = 0.0591	a = - 0.0461 P < 10^{-4} dc = 0.8993 r^2 = 0.7894
Whole	a = - 0.0275 P < 10^{-4} dc = 0.9387 r^2 = 0.6321	a = - 0.0071 P = 0.0870 dc = 0.9838 r^2 = 0.0505	a = - 0.0468 P < 10^{-4} dc = 0.8978 r^2 = 0.4934

6ème PARTIE

Discussion générale et perspectives

La communauté scientifique s'accorde à dire que l'indicateur de pollution universel n'existe pas. C'est ainsi que l'objectif de ce travail visait à déterminer les conditions dans lesquelles les FRNAPH pourraient amener des informations plus précises en tant qu'indicateurs de pollution fécale ou virale dans les matrices hydriques et alimentaires par rapport aux outils classiquement disponibles. Dans cette démarche, une attention particulière a été apportée à l'évaluation de la qualité microbiologique des coquillages, des denrées bien connues pour être à l'origine de maladies alimentaires mettant en cause les virus entériques (Bellou *et al.*, 2013; EFSA, 2012; Koopmans & Duizer, 2004). Nos résultats apportent des précisions importantes sur l'utilisation des FRNAPH, tout d'abord en tant qu'indicateurs de pollution fécale globale, en tant qu'indicateurs pour discriminer l'origine humaine ou animale d'une contamination et enfin, en tant qu'indicateurs de pollution virale. Ces trois points sont discutés ici par rapport aux données de littérature.

Concernant le potentiel des FRNAPH pour évaluer la pollution fécale, leur intérêt doit être évalué par rapport aux indicateurs bactériens classiquement recherchés dans l'eau (*e.g. E. coli*, entérocoques) ou dans les coquillages (*i.e. E. coli*). La prévalence importante des FRNAPH dans les sources majeures de pollution (*i.e.* eaux usées urbaines, eaux usées d'abattoir) est un argument important en faveur de leur utilisation. Dans notre étude, les FRNAPH ont en effet été retrouvés dans l'ensemble des eaux usées provenant de stations d'épuration ou d'abattoirs d'animaux à des concentrations de l'ordre de 10^3 à 10^5 UFP/mL, c'est-à-dire très semblables à celles généralement rapportées dans la littérature (Haramoto *et al.*, 2012; Hata *et al.*, 2013; Lucena *et al.*, 2003; Schaper *et al.*, 2002b). Rappelons néanmoins que de manière générale, les indicateurs bactériens sont retrouvés dans ce type de matrice à des concentrations de l'ordre de 10^4 à $>10^5$ UFC/mL (Costán-Longares *et al.*, 2008; Lucena *et al.*, 2003; Mandilara *et al.*, 2006), c'est-à-dire au moins 10 fois supérieures à celles des FRNAPH.

Les eaux usées intègrent la pollution fécale d'un nombre d'individus conséquent. Si on s'intéresse cette fois aux sources de pollution de moins grande envergure, les données de la littérature soulignent une prévalence relativement faible des FRNAPH à l'échelle de l'individu. Elle est en effet souvent inférieure à 5 % chez l'Homme et généralement plus importante chez l'animal (Calci *et al.*, 1998; Grabow *et al.*, 1995; Havelaar *et al.*, 1990; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Osawa *et al.*, 1981; Schaper *et al.*, 2002b). Nos observations confirment ces faits puisque plus de 80 % des selles d'origine animale analysées dans notre étude sont négatives pour la recherche de FRNAPH. Bien que les sources ponctuelles de pollution soient moins susceptibles d'être à l'origine de la contamination massive du milieu naturel (sauf peut-être dans le cas des

pollutions d'origine animale), l'absence de FRNAPH chez un grand nombre d'individus n'en demeure pas moins problématique. La faible prévalence des FRNAPH à l'échelle de l'individu pose en effet la question de leur présence ou non dans les eaux usées provenant des structures d'assainissement de plus faible capacité. Actuellement, aucune information n'est disponible quant à la taille de la population garantissant la présence des FRNAPH dans les eaux usées à des concentrations compatibles avec leur utilisation en tant qu'indicateurs de pollution fécale.

De la même manière, et si on s'intéresse cette fois plus particulièrement à la contamination des denrées alimentaires, la faible prévalence des FRNAPH à l'échelle de l'individu suppose que leur recherche sera la plupart du temps infructueuse en cas de contamination manuportée. Ce type de contamination peut être observé lors du transport ou de la transformation des denrées alimentaires par du personnel malade excrétant des microorganismes pathogènes et bien qu'elle soit peu probable dans le cas des coquillages, la contamination par la manutention est fréquemment associée à la transmission des pathogènes entériques lors de la consommation de végétaux ou de plats préparés (CDC, 2011; D'Souza *et al.*, 2006; Fiore, 2004; Rönnqvist *et al.*, 2014; Widdowson *et al.*, 2005). Face à cette limite concernant la possible absence des FRNAPH en cas de pollution individuelle ou de faible envergure, précisons que peu de données sont actuellement disponibles concernant leur portage. Dans ce contexte, il serait judicieux de s'intéresser plus précisément au portage des FRNAPH, d'établir si ce dernier est transitoire ou continu et s'il est modifié en cas d'excrétion concomitante de pathogènes entériques par les sujets. Les connaissances concernant l'écologie des FRNAPH doivent donc encore être approfondies.

Ainsi, nos résultats associés à ceux de la littérature démontrent clairement que si les FRNAPH sont incontestablement des indicateurs de pollution fécale, les indicateurs bactériens présentent une prévalence et des concentrations plus importantes lorsqu'on se place à la source de la pollution.

Une fois la pollution fécale disséminée dans l'environnement, deux phénomènes vont être à l'origine de la diminution de la concentration des indicateurs ; il s'agit d'une part de la dilution des eaux usées et d'autre part de l'élimination des microorganismes de la phase hydrique (*i.e.* inactivation, adhésion/agrégation). Si le premier phénomène agit de manière identique sur tous les indicateurs, le second est spécifique de chacun. Il est en effet parfaitement connu que de manière générale, les virus et en particulier les phages ont une survie dans l'environnement supérieure à celle des indicateurs bactériens (Harwood *et al.*, 2005; Havelaar *et al.*, 1993; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jofre, 2007; Jofre *et al.*, 2016, 1995). Ainsi, même si la part relative de ces deux

phénomènes est difficile à estimer dans l'environnement, on peut supposer que dans le cas d'une pollution fécale récente ou en l'absence de traitement inactivant (*i.e.* traitement des eaux usées ou de potabilisation des eaux) ou d'inactivation naturelle (*e.g.* température, rayonnement solaire), ce sont les indicateurs bactériens qui seront les plus abondants comme cela est observé dans les eaux usées ou les selles (*i.e.* effet dilution majoritaire). A l'inverse, dans le cas d'une pollution fécale plus ancienne ou ayant subi un traitement, ce sont les phages qui à terme, deviendront majoritaires. Cette notion est très bien démontrée par nos résultats obtenus lors de l'analyse d'eaux superficielles, des coquillages issus des zones conchylicoles ou encore stockés dans des eaux non polluées.

Dans les eaux superficielles, nos résultats soulignent en effet des concentrations en FRNAPH relativement faibles (*i.e.* 0 à 105 UFP/100 mL) et jusqu'à 100 fois inférieures à celles d'*E. coli* comme cela est classiquement décrit dans les eaux usées ou certaines eaux superficielles (Cole *et al.*, 2003; Contreras-Coll *et al.*, 2002; Haramoto *et al.*, 2012; Ibarluzea *et al.*, 2007; Lucena *et al.*, 2006, 2003; McMinn *et al.*, 2017; Skraber *et al.*, 2002; Sundram *et al.*, 2002). Compte tenu de la méthode d'analyse utilisée ici (*i.e.* analyse de 100 mL d'eau pour la recherche de chacun des indicateurs), il apparaît même des situations où les indicateurs bactériens sont présents en l'absence de FRNAPH (*i.e.* 15 échantillons sur 32). Il semble donc que dans cette situation, le phénomène de dilution soit prédominant et que dans ce contexte, les phages n'apportent aucune information supplémentaire par rapport aux indicateurs bactériens puisque leur recherche peut parfois sous-estimer la pollution fécale. Le recours aux méthodes de concentration classiquement employées pour la recherche des virus dans l'environnement peut dans ce cas être proposé pour améliorer la détection des FRNAPH mais il faut alors tenir compte des inconvénients qu'elles présentent en termes de difficultés techniques et de rendement (Bosch *et al.*, 2011; Bosch, 1998; Cashdollar & Wymer, 2013; Katayama *et al.*, 2002; McQuaig & Noble, 2011; Schwartzbrod, 2000).

Dans les coquillages, différents phénomènes majeurs vont impacter la concentration des indicateurs ; il s'agit tout d'abord de leur bioaccumulation, de leur survie et enfin de leur relargage à partir de ces matrices. Là encore, il est souvent délicat de dissocier l'ensemble de ces évènements dans le cas des coquillages issus des zones de culture. De manière intéressante, la forte prévalence des FRNAPH dans ce type de matrice constitue un argument de taille justifiant leur recherche. En effet, des concentrations en FRNAPH infectieux significativement plus importantes que celles d'*E. coli* ont été observées dans les coquillages, quelle que soit leur qualité microbiologique (*i.e.* catégories allant de A à C, en se basant sur la recherche de *E. coli*). Il apparaît en effet que même dans les situations où *E. coli* est plus abondant que les FRNAPH dans les eaux, le rapport entre les deux indicateurs est généralement inversé dans les coquillages. D'autres études avaient déjà souligné ce

phénomène (Burkhardt & Calci, 2000; Doré *et al.*, 2003, 2000). Dans nos travaux, la recherche des FRNAPH infectieux a d'ailleurs permis de souligner dans de nombreuses situations une contamination fécale des coquillages en l'absence de l'indicateur réglementaire (*i.e.* 74 échantillons sur 127), tandis que la situation inverse est très rarement observée (*i.e.* 1 échantillon). Il est donc clairement établi ici que les FRNAPH infectieux constituent des indicateurs de pollution fécale plus conservateurs que *E. coli* dans les coquillages.

Lors du stockage des coquillages les plus contaminés dans de l'eau de mer non polluée, la survie et le relargage sont cette fois les phénomènes qui impactent le plus la prévalence des microorganismes. Dans ce cas, le bénéfice apporté par les FRNAPH est encore plus marqué. L'élimination rapide d'*E. coli* dans ces conditions est en effet parfaitement documentée (*i.e.* < 48 heures) (Neish, 2013) tandis que nos résultats montrent une persistance des FRNAPH infectieux dans les coquillages pendant plus de 20 jours. Il est d'ailleurs impossible d'éliminer totalement les génomes de phages après un stockage de 30 jours.

En conclusion de ce premier aspect concernant l'utilisation des FRNAPH infectieux en tant qu'indicateurs de contamination fécale, il apparaît évident que leur présence dans l'environnement est synonyme de pollution fécale. Leur recherche constitue clairement une plus-value dans les coquillages, qu'ils soient purifiés ou non. Les principales limites sont observées dans les eaux, dans les situations particulières où la faible prévalence des FRNAPH à l'échelle de l'individu se traduit par l'absence de phages (*i.e.* pollution ponctuelle) et où la dilution de la pollution fécale est le principal phénomène réduisant le niveau de pollution. La recherche d'*E. coli* ou des coliphages somatiques pourrait s'avérer alors plus pertinente dans ces situations, en raison de leurs concentrations plus importantes par rapport à celles des FRNAPH (Grabow, 2001; Havelaar *et al.*, 1990; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jofre *et al.*, 2016; Lin & Ganesh, 2013; Tallon *et al.*, 2005). La recherche d'*E. coli* telle qu'elle est actuellement entreprise semble en effet efficace pour évaluer la pollution fécale (Commission Européenne, 1998; Lin & Ganesh, 2013; Ministère de la santé et des solidarités, 2007; Parlement Européen, 2005; Tallon *et al.*, 2005) et il est incontestable que la présence de cet indicateur bactérien puisse potentiellement être associée à celle de pathogènes entériques et donc à un danger pour les individus. Nous n'avons néanmoins pas investigué de situations où la pollution était plus ancienne et pour lesquelles les phénomènes d'inactivation devraient causer la diminution plus importante de la concentration des bactéries par rapport à celle des FRNAPH. Ces phénomènes sont largement décrits dans la littérature. Il est en effet aujourd'hui particulièrement bien documenté que l'absence d'*E. coli* ne constitue pas toujours un critère

de sécurité, notamment en raison de leur comportement très différent et de leur survie moins importante par rapport aux pathogènes de nature virale dans les eaux environnementales (Harwood *et al.*, 2005; Havelaar *et al.*, 1993; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Jofre *et al.*, 1995). Ce phénomène a aussi pu être observé dans notre étude concernant la contamination des coquillages. Dès lors, insistons sur le fait qu'à l'heure actuelle, l'indicateur de pollution réunissant tous les critères en termes de distribution, de comportement, de survie dans l'environnement mais aussi de détection n'existe pas. C'est pourquoi le recours à différents indicateurs doit être envisagé et en l'absence d'*E. coli* dont la recherche doit constituer la première étape pour évaluer la qualité microbiologique des matrices hydriques ou alimentaires, le recours à d'autres indicateurs est alors justifié. Cette stratégie suppose alors d'identifier des indicateurs plus efficaces, que ce soit pour discriminer l'origine de la pollution fécale ou pour signaler la présence spécifique de virus entériques pathogènes (*i.e.* indicateurs viraux). Concernant ce dernier point, si les coliphages somatiques présentent un avantage considérable en termes de prévalence (Jofre *et al.*, 2016), les FRNAPH sont les seuls bactériophages fécaux à présenter une structure similaire à celle des virus entériques pathogènes.

Concernant la discrimination de l'origine de la pollution fécale, il apparaît que dans l'état actuel des connaissances, la recherche des indicateurs bactériens classiques est totalement inefficace. La pollution d'origine humaine étant la plus à même d'être associée à la présence de microorganismes pathogènes pour l'Homme dans l'environnement (Cabelli *et al.*, 1982; Soller *et al.*, 2016, 2010), pouvoir l'identifier est aujourd'hui primordial et dans ce contexte, le potentiel des FRNAPH a souvent été investigué (Blanch *et al.*, 2006, 2004; Griffith *et al.*, 2003; Harwood *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2009).

Nous avons tout d'abord confirmé dans ce travail que le génotypage des FRNAPH ne permet pas systématiquement de discriminer l'origine d'une contamination fécale (Blanch *et al.*, 2006, 2004). Malgré l'abondance des FRNAPH-I chez l'animal et celle des FRNAPH-II et -III dans les eaux usées d'origine urbaine, certaines situations ne correspondent pas au schéma initialement décrit concernant la distribution des quatre génogroupes (Furuse *et al.*, 1983, 1981, 1978; Osawa *et al.*, 1981). Nous avons en effet isolé des FRNAPH-II et -III chez l'animal (*i.e.* canards, bovins) et des FRNAPH-I dans les eaux usées urbaines. Une analyse de séquence des FRNAPH de différentes origines a néanmoins permis de conclure que les FRNAPH-II et -III restent majoritairement excrétés par l'Homme. Leur détection par la technique de RT-PCR développée par Wolf *et al.* (2010) semble alors globalement la plus sensible puisque cette approche permet la détection du plus grand nombre de souches. Le regroupement des séquences nucléiques des FRNAPH isolés des animaux ont permis par

ailleurs de proposer une approche plus spécifique pour identifier l'origine d'une pollution. La technique de RT-PCR proposée par Ogorzaly & Gantzer (2006) assure en effet la détection spécifique des FRNAPH-II et -III humains, mais ceci au détriment de la sensibilité puisque certaines souches humaines ne sont alors plus détectées. Enfin, il ne semble y avoir aucune spécificité d'hôte si on s'intéresse aux FRNAPH-I, même si leur quantité dans les eaux usées urbaines est moindre par rapport à celle des FRNAPH-II et -III. Rappelons qu'aucun argument n'a à ce jour été avancé quant à l'origine de la distribution des différents génogroupes de FRNAPH chez l'Homme et chez l'animal. Là encore, améliorer les connaissances concernant leur écologie permettrait d'optimiser la manière d'utiliser ces indicateurs pour identifier la source d'une contamination fécale.

Le choix de la méthode à utiliser pour détecter les FRNAPH apparaît donc comme étant une étape déterminante et à ce titre, même si l'objectif premier était ici d'identifier les pollutions d'origine humaine, les systèmes de RT-PCR proposés par Wolf *et al.* (2010) ont souvent été privilégiés dans nos travaux, en particulier concernant la détection des FRNAPH-II. On peut en effet considérer que le risque de faux positif (*i.e.* détection d'une souche de FRNAPH-II qui n'est pas d'origine humaine) est préférable au risque de faux négatif lié à la moins bonne sensibilité de la technique proposée par Ogorzaly & Gantzer (2006). Il semble donc que globalement, la recherche des FRNAPH-II et -III offre une bonne spécificité pour identifier la pollution fécale humaine. Dans l'environnement, lorsque l'effet dilution est majoritaire (*i.e.* pollution récente, absence de traitement des eaux usées), il est alors possible de conclure à une pollution fécale humaine lorsque ces deux génogroupes sont majoritairement retrouvés par rapport aux FRNAPH-I, en particulier si on utilise la méthode de détection proposée par Ogorzaly & Gantzer (2006). Néanmoins, le paramètre survie doit lui aussi être pris en compte. Il est en effet largement documenté que la meilleure résistance des FRNAPH-I est à l'origine de leur forte prévalence dans l'environnement (Brion *et al.*, 2002; Cole *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 2016; Muniesa *et al.*, 2009; Stewart-Pullaro *et al.*, 2006). Dans notre étude, la meilleure stabilité de ce génogroupe a également été observée. En effet, alors que les FRNAPH-II et -III sont très majoritaires dans les eaux usées urbaines, la proportion de FRNAPH-I augmente considérablement sous l'action du temps mais également au cours du traitement d'épuration des eaux effectué avant leur rejet dans le milieu naturel. Il apparaît donc que même en cas de pollution d'origine humaine, les FRNAPH-I seront retrouvés dans le milieu naturel de manière significative en cas de relargage d'eaux usées urbaines traitées ou en cas de pollution ancienne. De manière intéressante, nos travaux soulignent également la présence de FRNAPH-II infectieux dans les eaux usées urbaines après leur traitement et une persistance significative de ce génogroupe est notée au cours du temps. Bien que

minoritaire par rapport aux FRNAPH-I, les FRNAPH-II présentent donc une résistance suffisante pour permettre d'identifier les pollutions d'origine humaine dans l'environnement.

En conclusion de ce point et compte tenu de leur spécificité d'hôte et de leur survie respective, la recherche des FRNAPH-I infectieux dans l'environnement ou dans les matrices alimentaires peut être proposée pour évaluer le niveau global de pollution fécale, tandis que la recherche spécifique des FRNAPH-II infectieux permet d'identifier spécifiquement les pollutions d'origine humaine. La moins bonne résistance des FRNAPH-III, en particulier durant le traitement des eaux usées, peut quant à elle être tournée en avantage en considérant alors que leur présence dans l'environnement soit essentiellement associée aux rejets d'eaux usées urbaines n'ayant pas subi de traitement d'épuration (*i.e.* dysfonctionnement du procédé de traitement des eaux, débordement des eaux usées des stations d'épuration en cas d'intempéries). Nos travaux démontrent enfin que compte tenu de la meilleure persistance des génomes, la recherche directe des FRNAPH par biologie moléculaire sans passer par une étape de culture permet de limiter le biais lié aux survies variables de chacun des génogroupes. Ainsi, si l'objectif est uniquement de discriminer la source de pollution, le recours aux techniques moléculaires est justifié. Une réserve doit néanmoins être émise en cas d'adhésion des particules virales, qu'elle survienne au cours du traitement des eaux usées (*i.e.* adhésion aux boues résiduaires) ou dans l'environnement (*i.e.* adhésion aux sédiments) (Fauvel *et al.*, 2017b; Perkins *et al.*, 2014). On peut en effet supposer que dans ces situations, le bénéfice apporté par la meilleure persistance des génomes soit moindre compte tenu de l'élimination physique des virus.

Si la persistance des génomes apparaît comme étant un avantage pour identifier l'origine d'une contamination fécale, elle est néanmoins souvent décrite comme un inconvénient lorsqu'il s'agit d'évaluer le caractère infectieux des virus. Il est en effet aujourd'hui bien perçu que le recours aux techniques de biologie moléculaire ne permet pas d'identifier le danger réel pour la population (Girones *et al.*, 2010; Santo Domingo *et al.*, 2007). Dans ce contexte, une méthode sensible assurant la détection des FRNAPH infectieux de chacun des génogroupes a été mise au point lors de ce travail. Initialement développée pour l'analyse des coquillages, cette technique couplant la culture à la détection par RT-PCR (*i.e.* ICC-RTqPCR) permet également, après quelques adaptations, l'analyse d'autres matrices alimentaires fréquemment à l'origine de TIAC (*i.e.* fruits rouges, salades) mais également des eaux environnementales.

Le dernier aspect concerne le potentiel des FRNAPH comme indicateurs de pollution virale, c'est-à-dire leur corrélation avec les virus pathogènes dans l'environnement et dans les coquillages. Pour ce point, notre attention s'est particulièrement portée sur la recherche

des NoV puisqu'il s'agit des pathogènes à l'origine de la majorité des cas de gastro-entérites non bactériennes à travers le monde, y compris lorsque les épidémies sont liées à la consommation d'aliments souillés (EFSA, 2015; Hall *et al.*, 2011; Havelaar *et al.*, 2015; Patel *et al.*, 2009; Scallan *et al.*, 2011). Compte tenu des conclusions précédemment énoncées, la relation entre les FRNAPH-II et les NoV a particulièrement été investiguée. Pour cela, nous nous sommes intéressés à chaque étape du cycle de la pollution en évaluant cette corrélation dans les eaux usées urbaines, dans les eaux environnementales et dans les coquillages.

L'analyse des eaux usées urbaines brutes ou traitées a montré que la concentration des FRNAPH-II est toujours supérieure à celle des NoV et cela même au moment du franchissement du pic épidémiologique concernant l'incidence des gastro-entérites. L'abondance d'un indicateur par rapport aux pathogènes constitue un point essentiel (Gerba, 2009; IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991; Yates, 2007) et ce point est donc validé dans le cas des FRNAPH-II, même dans les conditions les plus critiques correspondant à la période épidémique. Notons dès à présent que la recherche des FRNAPH a été réalisée en utilisant des techniques de biologie moléculaire afin de rester homogène avec la détection des NoV pour lesquels la recherche des particules infectieuses n'est pas encore réalisable en routine (Ettayebi *et al.*, 2016). Ce point essentiel devra être considéré tout au long de la réflexion. De manière intéressante, des abattements identiques sont mesurés pour ces deux microorganismes, ce qui suppose alors un comportement similaire lors du traitement des eaux usées. De nombreuses études ont déjà rapporté ce phénomène même si dans ces cas, les FRNAPH étaient généralement recherchés par culture (McMinn *et al.*, 2017; Pouillot *et al.*, 2015). Il semble donc qu'en l'absence de traitement tertiaire, puisque la disparition des virus résulte principalement de leur adhésion aux flocs de boues activées, les résultats fournis par les méthodes moléculaires et la culture peuvent être comparés sans entrainer un biais trop important compte tenu de l'élimination physique des particules virales.

Dans l'environnement, le contexte est bien différent. En effet, si l'élimination physique des microorganismes peut également être observée (*i.e.* adhésion aux particules en suspension ou aux sédiments) (Fauvel *et al.*, 2017b, 2016; Frohnert *et al.*, 2014), la disparition des particules infectieuses résulte également de leur inactivation par l'action des rayonnements UV ou de la chaleur. Dans ce cas, on observe une perte du caractère infectieux des virus mais la détection des courts fragments de leurs génomes est encore possible en utilisant les approches moléculaires (Gassilloud *et al.*, 2003; Pecson *et al.*, 2011; Simonet & Gantzer, 2006). Il existe donc un fossé important entre la présence des génomes et celle des particules infectieuses et dans l'état actuel des connaissances, à défaut de pouvoir cultiver

les NoV, la corrélation entre ces pathogènes et les FRNAPH devrait strictement être investiguée en utilisant des approches moléculaires pour leur détection. Dans ces conditions, nos travaux rapportent une association entre la présence des génomes de NoV et ceux des FRNAPH-II. A notre connaissance, seulement deux récentes études se sont intéressées à la recherche des génomes de FRNAPH et ceux des pathogènes dans les eaux environnementales. Dans les deux cas, une corrélation entre FRNAPH-II et NoV a également été rapportée (Arredondo-Hernandez *et al.*, 2017; Vergara *et al.*, 2015).

Enfin, le dernier point concerne l'association entre les FRNAPH et les NoV dans les coquillages. En effet si l'accumulation des NoV dans ce type de matrice alimentaire est aujourd'hui bien documentée (Araud *et al.*, 2016; Drouaz *et al.*, 2015; Maalouf *et al.*, 2011, 2010; Ueki *et al.*, 2007), ce phénomène est également observé dans le cas des FRNAPH (Burkhardt & Calci, 2000; Doré *et al.*, 2003, 2000; Flannery *et al.*, 2013). En utilisant toujours des approches moléculaires lors de l'analyse d'un nombre significatif de coquillages impactés par différents niveaux de pollution, nos travaux révèlent également une association entre la présence des FRNAPH-II et celle des NoV dans ces matrices. Dans ce contexte, nous avons également comparé l'élimination des NoV et des FRNAPH lors de la purification des coquillages. Les données actuelles de la littérature suggèrent en effet que la persistance des NoV dans les coquillages au cours de ce procédé pourrait remettre en cause l'utilisation d'indicateurs pour évaluer leur présence (Drouaz *et al.*, 2015; Neish, 2013). Or, ces conclusions reposent uniquement sur la persistance des génomes de NoV et aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la persistance des NoV infectieux dans ces conditions. La disparition plus rapide qui est observée pour les FRNAPH infectieux pourrait alors résulter soit de l'élimination physique des particules virales (ce qui remet effectivement en cause leur utilisation en tant qu'indicateurs) ou alors, elle pourrait simplement être liée à leur inactivation au sein des coquillages et dans ce cas, la comparaison avec la persistance des génomes de NoV est peu pertinente. Afin de distinguer ces deux situations et pour la première fois, nous avons entrepris la recherche des FRNAPH-II en utilisant des approches moléculaires lors de la purification des coquillages. De manière intéressante, une meilleure persistance des génomes de FRNAPH-II par rapport à celle des NoV est observée, ce qui remet alors considérablement en doute les conclusions actuellement fournies par la littérature. En effet, alors que le rôle de récepteur favorisant la persistance des NoV dans les coquillages est souvent évoqué (Le Guyader *et al.*, 2006b; Tian *et al.*, 2006), la plus longue persistance des FRNAPH en l'absence de récepteurs dédiés souligne l'importance que peuvent avoir les interactions non spécifiques dans la rétention des microorganismes. Il conviendrait alors de mieux documenter la place de ce type d'interaction dans la séquestration des NoV et la part effective des récepteurs qui leur sont spécifiques.

En conclusion de ces résultats concernant l'utilisation des FRNAPH en tant qu'indicateurs de pollution virale, l'abattement des FRNAPH-II et des NoV lors du traitement des eaux usées et leur corrélation dans les eaux environnementales ainsi que dans les coquillages supposent un comportement très similaire de ces microorganismes. Par ailleurs, l'utilisation des méthodes de détection appropriées a montré que contrairement à ce qui est largement décrit dans la littérature, la persistance des FRNAPH dans les coquillages n'est pas inférieure à celle des NoV. Compte tenu de ces nouveaux éléments, deux interrogations peuvent alors être émises concernant la gestion du risque viral.

La première concerne la stratégie à adopter pour évaluer la qualité virologique des coquillages mais également celle des autres matrices alimentaires. Dans l'état actuel des connaissances, est-il préférable de rechercher les génomes des NoV (International Organization for Standardization, 2017) ou alors, est-il plus pertinent d'opter pour la recherche d'indicateurs cultivables ? Pour répondre à cette question, rappelons que la principale limite relative à la recherche des génomes viraux concerne leur très longue persistance qui a pour conséquence l'absence de lien entre leur présence et celle des particules infectieuses correspondantes. Cette notion est bien perçue lorsque des génomes viraux sont détectés dans les matrices hydriques (Girones *et al.*, 2010) mais à notre connaissance, ce phénomène n'a jamais été documenté dans les coquillages. Dans nos travaux, la recherche des FRNAPH par culture ainsi que par biologie moléculaire a confirmé la meilleure stabilité des génomes par rapport au caractère infectieux des virus dans ce type de matrice. Appliquée aux FRNAPH, la recherche des génomes a ainsi conduit à leur détection dans des situations où les particules infectieuses étaient absentes et inversement, compte tenu des limites de détection des approches moléculaires actuellement disponibles, la présence de virus infectieux en l'absence de génomes détectables a également pu être rapportée. Transposées à la recherche des NoV, ces observations remettent fortement en cause l'application de la norme ISO 15216 pour évaluer le danger lié à la présence des virus entériques pathogènes dans les matrices alimentaires. Dans ce contexte, la recherche d'un indicateur viral cultivable comme les FRNAPH peut alors présenter un intérêt.

Cette première réflexion amène directement la seconde interrogation qui concerne la pertinence des FRNAPH en tant qu'indicateurs pour évaluer le danger viral. En effet, l'ensemble de nos résultats démontre aujourd'hui une corrélation entre la présence des génomes de FRNAPH-II et celle des génomes de NoV dans les eaux environnementales et les coquillages. Bien que ces observations constituent un premier argument essentiel concernant la pertinence des FRNAPH-II infectieux pour évaluer le danger viral, la perspective majeure permettant de valider de manière formelle l'utilisation de ces indicateurs

devra concerner cette fois l'étude de la corrélation entre FRNAPH-II infectieux et NoV infectieux dans les matrices alimentaires. Pour ce faire, deux options sont envisageables à plus ou moins court terme.

La première nécessite de progresser sur les techniques permettant la culture des NoV. Bien que des avancées sont régulièrement faites concernant ce point (Ettayebi *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2014), la recherche des NoV infectieux demeurera vraisemblablement fastidieuse et coûteuse, ce qui limitera son application en routine pour évaluer la qualité virologique des aliments. Elle pourra néanmoins dans un futur plus ou moins proche être employée en laboratoire pour valider ou non l'utilisation des FRNAPH-II infectieux en permettant d'étudier cette corrélation.

La seconde possibilité permettant d'étudier cette corrélation concerne l'analyse de matrices alimentaires à l'origine de TIAC causées par les NoV. Dans l'état actuel des connaissances, cette option est en effet la seule garantissant la présence de particules infectieuses du pathogène dans un aliment. Dans ce sens, l'étude réalisée par Woods *et al.* (2016) a permis de mettre en évidence la présence de FRNAPH infectieux dans certains lots de coquillages à l'origine de maladies alimentaires (*i.e.* 3 lots sur 8). L'absence de FRNAPH infectieux a néanmoins été rapportée dans 5 lots. Il semble que dans cette étude, les FRNAPH infectieux aient été détectés dans les lots associés à une pollution fécale significative (*i.e.* rejets d'eaux usées de stations d'épuration, vidange de bateaux), tandis que les lots ne contenant pas de FRNAPH infectieux étaient vraisemblablement impactés par une pollution de plus faible envergure. Malgré la pertinence de ce type d'investigation, le manque de sensibilité de la méthode utilisée ici pour rechercher les FRNAPH infectieux peut être évoqué puisque l'analyse des coquillages entiers a été entreprise. La méthode mise au point lors de nos travaux aurait peut-être permis d'isoler des phages infectieux compte tenu de sa sensibilité. Afin d'anticiper cette perspective, nous avons appliqué cette technique à l'analyse de différentes matrices alimentaires à l'origine de TIAC causées par les NoV. L'analyse de trois lots de coquillages a ainsi révélé la présence de FRNAPH-II dans deux d'entre eux, tandis que le 3ème était positif pour la recherche des FRNAPH-I. De la même façon, cette méthode de détection a été appliquée avec quelques modifications à l'analyse de fruits rouges à l'origine d'une importante TIAC causée par les NoV en Allemagne (*i.e.* 11 000 cas) (Mäde *et al.*, 2013). Dans ce cas également, les matrices analysées étaient positives pour la recherche des FRNAPH-II et -III infectieux. Bien que basés sur l'analyse d'un nombre limité d'échantillons, ces résultats suggèrent de persister dans cette démarche. La sensibilité accrue de la méthode développée ici constitue donc une réelle plus-value mais pourrait également constituer une limite. En effet, son application à l'analyse de lots commerciaux de coquillages a montré une forte prévalence des FRNAPH infectieux puisque dans notre

étude, 34 % et 7 % d'entre eux étaient respectivement positifs pour la recherche des FRNAPH-I et -II infectieux. Si la détection des FRNAPH infectieux constitue donc incontestablement une indication sur la contamination fécale des denrées alimentaires et la présence de particules virales infectieuses, il conviendrait de ne pas basculer dans la mise en place de mesures trop drastiques pour évaluer la qualité microbiologique de ces matrices. Il paraît essentiel dans ce cas de vérifier si le niveau de pollution mesuré par la recherche des FRNAPH infectieux peut être corrélé avec le danger viral. Cette démarche pourrait permettre de définir des valeurs seuils concernant la recherche des FRNAPH, telles qu'elles sont actuellement établies lors de la recherche d'*E. coli* dans les coquillages.

Rappelons en effet que la validation d'un indicateur ne se fait pas par la recherche d'une corrélation stricte avec les pathogènes puisque ces microorganismes présentent des écologies très différentes. Ainsi, la présence d'un indicateur en l'absence de pathogènes peut être observée, mais à l'inverse, il n'est pas concevable qu'un indicateur soit absent en cas de présence de virus entériques pathogènes.

Références bibliographiques

Abdelzaher, A.M., Wright, M.E., Ortega, C., Hasan, A.R., Shibata, T., Solo-Gabriele, H.M., Kish, J., Withum, K., He, G., Elmir, S.M., Bonilla, J.A., Bonilla, T.D., Palmer, C.J., Scott, T.M., Lukasik, J., Harwood, V.J., McQuaig, S., Sinigalliano, C.D., Gidley, M.L., Wanless, D., Plano, L.R.W., Garza, A.C., Zhu, X., Stewart, J.R., Dickerson, J.W., Yampara-Iquise, H., Carson, C., Fleisher, J.M., Fleming, L.E., 2011. Daily measures of microbes and human health at a non-point source marine beach. J. Water Health 9, 443–457.

Ackermann, H.-W., 2009. Phage Classification and Characterization, in: Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. (Eds.), Bacteriophages : Methods and Protocols. pp. 127–140.

Ackermann, H.-W., 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch. Virol. 152, 227–243.

Ackermann, H.-W., 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. Arch. Virol. 146, 843–857.

AFSSA, 2007. Bilan des connaissances relatives au virus transmissibles à l'Homme par voie orale.

Agulló-Barceló, M., Galofré, B., Sala, L., García-Aljaro, C., Lucena, F., Jofre, J., 2016. Simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages in different settings by Escherichia coli strain CB390. FEMS Microbiol. Lett. 363, fnw180.

Ahmed, W., Tucker, J., Bettelheim, K.A., Neller, R., Katouli, M., 2007. Detection of virulence genes in Escherichia coli of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic E. coli in surface waters. Water Res. 41, 3785–3791.

Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L., Girones, R., 2009. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. Water Res. 43, 2011–9.

Allwood, P.P.B., Malik, Y.S.Y., Hedberg, C.W., Goyal, S.M., 2003. Survival of F-specific RNA coliphage, feline calicivirus, and Escherichia coli in water: a comparative study. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5707–5710.

Amarasiri, M., Kitajima, M., Nguyen, T.H., Okabe, S., Sano, D., 2017. Bacteriophage removal efficiency as a validation and operational monitoring tool for virus reduction in wastewater reclamation: Review. Water Res. 121, 258–269.

Araud, E., DiCaprio, E., Ma, Y., Lou, F., Gao, Y., Kingsley, D., Hughes, J.H., Li, J., 2016. Thermal Inactivation of Enteric Viruses and Bioaccumulation of Enteric Foodborne Viruses in Live Oysters (Crassostrea virginica). Appl. Environ. Microbiol. 82, 2086–2099.

Armon, R., Kott, Y., 1996. Bacteriophages as indicators of pollution. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 26, 299–335.

Arredondo-Hernandez, L.J.R., Diaz-Avalos, C., Lopez-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., Mazari-Hiriart, M., 2017. FRNA Bacteriophages as Viral Indicators of Faecal Contamination in Mexican Tropical Aquatic Systems. PLoS One 12, e0170399.

Ashbolt, N.J., 2015. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. Curr. Environ. Heal. Reports 2, 95–106.

Ashbolt, N.J., 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicology 198, 229–238.

Ashbolt, N.J., Grabow, W.O.K., Snozzi, M., 2001. Indicators of microbial water quality, in: Fewtrell, L., Bartram, J. (Eds.), Water Quality: Guidelines, Standards and Health. IWA Publishing, pp. 289–316.

ASQAAC, 2016. Australian Shellfish Quality Assurance Program - Operations manual.

Atmar, R.L., Neill, F.H., Woodley, C.M., Manger, R., Shay Fout, G., Burkhardt, W., Leja, L., McGovern, E.R., Le Guyader, F., Metcalf, T.G., Estes, M.K., 1996. Collaborative evaluation of a method for the detection of Norwalk virus in shellfish tissues by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 62, 254–258.

Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Graham, D.Y., 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. Emerg. Infect. Dis. 14, 1553–1557.

Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., Uyttendaele, M., 2011. Review: Norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: A threat to human health? Int. J. Food Microbiol. 151, 261–269.

Baert, L., Uyttendaele, M., Vermeersch, M., Van Coillie, E., Debevere, J., 2008. Survival and transfer of murine norovirus 1, a surrogate for human noroviruses, during the production process of deep-frozen onions and spinach. J. Food Prot. 71, 1590–1597.

Baker, K., Morris, J., McCarthy, N., Saldana, L., Lowther, J., Collinson, A., Young, M., 2011. An outbreak of norovirus infection linked to oyster consumption at a UK restaurant, February 2010. J. Public Health. 33, 205–211.

Ballesté, E., Blanch, A.R., 2011. Bifidobacterial Diversity and the Development of New Microbial Source Tracking Indicators. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3518–3525.

Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Margolin, A.B., 2005. Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. J. Water Health 3, 59–68.

Bartsch, S.M., Lopman, B.A., Ozawa, S., Hall, A.J., Lee, B.Y., 2016. Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. PLoS One 11, e0151219.

Beck, S.E., Rodriguez, R.A., Hawkins, M.A., Hargy, T.M., Larason, T.C., Linden, K.G., 2016. Comparison of UV-induced inactivation and RNA damage in MS2 phage across the germicidal UV spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 82, 1468–1474.

Beekwilder, J., Nieuwenhuizen, R., Havelaar, A.H., van Duin, J., 1996. An oligonucleotide hybridization assay for the identification and enumeration of F-specific RNA phages in surface water. J. Appl. Bacteriol. 80, 179–186.

Bellou, M., Kokkinos, P., Vantarakis, A., 2013. Shellfish-Borne Viral Outbreaks: A Systematic Review. Food Environ. Virol. 5, 13–23.

Benjamin-Chung, J., Arnold, B.F., Wade, T.J., Schiff, K., Griffith, J.F., Dufour, A.P., Weisberg, S.B., Colford, J.M., 2017. Coliphages and Gastrointestinal Illness in Recreational Waters. Epidemiology 28, 644–652.

Berg, D.E., Kohn, M.A., Farley, T.A., McFarland, L.M., 2000. Multi- State Outbreaks of Acute Gastroenteritis Traced to Fecal- Contaminated Oysters Harvested in Louisiana. J. Infect. Dis. 181, S381–S386.

Berg, G., 1978. The indicator system, in: Berg, G. (Ed.), Indicators of Viruses in Water and Food. Ann Arbor Science Publishers, pp. 1–13.

Berger, C.N., Sodha, S. V., Shaw, R.K., Griffin, P.M., Pink, D., Hand, P., Frankel, G., 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. Environ. Microbiol. 12, 2385–2397.

Bernard, H., Faber, M., Wilking, H., Haller, S., Höhle, M., Schielke, A., Ducomble, T., Siffczyk, C., Merbecks, S., Fricke, G., Hamouda, O., Stark, K., Werber, D., Outbreak Investigation Team, C., 2014. Large multistate outbreak of norovirus gastroenteritis associated with frozen strawberries, Germany, 2012. Euro Surveill. 19, pii=20719.

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

Betancor, L., Schelotto, F., Martinez, A., Pereira, M., Algorta, G., Rodriguez, M.A., Vignoli, R., Chabalgoity, J.A., 2004. Random Amplified Polymorphic DNA and Phenotyping Analysis of Salmonella enterica Serovar Enteritidis Isolates Collected from Humans and Poultry in Uruguay from 1995 to 2002. J. Clin. Microbiol. 42, 1155–1162.

Bitler, E.J., Mattews, J.E., Dickey, B.W., Eisenberg, J.N.S., Leon, J.S., 2013. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. Epidemiol. Infect. 141, 1563–1571.

Blanch, A.R., Belanche-Muñoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kühn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skraber, S., Papageorgiou, G., Taylor, H.D., Wallis, J., Jofre, J., 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. J. Water Health 2, 249–260.

Blanch, A.R., Belanche-Muñoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kühn, I., Mocé, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skraber, S., Papageorgiou, G.T., Taylor, H., Wallis, J., Jofre, J., 2006. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5915–5926.

Blanco, A., Guix, S., Fuster, N., Fuentes, C., Bartolomé, R., Cornejo, T., Pintó, R. M., Bosch, A., 2017. Norovirus in Bottled Water Associated With Gastroenteritis Outbreak, Spain, 2016. Emerg. Infect. Dis. 23, 1531–1534.

Boehm, A.B., Van De Werfhorst, L.C., Griffith, J.F., Holden, P.A., Jay, J.A., Shanks, O.C., Wang, D., Weisberg, S.B., 2013. Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study. Water Res. 47, 6812–6828.

Bofill-Mas, S., Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Carratalà, A., Hundesa, A., Girones, R., 2013. Quantification of Human and Animal Viruses to Differentiate the Origin of the Fecal Contamination Present in Environmental Samples. Biomed Res. Int. 2013, 1–11.

Bollback, J.P., Huelsenbeck, J.P., 2001. Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (Family Leviviridae). J. Mol. Evol. 52, 117–128.

Bonjoch, X., Ballesté, E., Blanch, A.R., 2005. Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. Water Res. 39, 1621–1627.

Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28, 495–503.

Borchardt, M.A., Haas, N.L., Hunt, R.J., 2004. Vulnerability of drinking water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric virus contamination from surface water contributions. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5937–5946.

Bosch, A., 1998. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. Int. Microbiol. 1, 191–196.

Bosch, A., Lucena, F., Diez, J.M., Gajardo, R., Blasi, M., Jofre, J., 1991. Waterborne Viruses Associated With Hepatitis Outbreak on JSTOR. J. Am. Water Work. Assoc. 83, 80–83.

Bosch, A., Sánchez, G., Abbaszadegan, M., Carducci, A., Guix, S., Le Guyader, F.S., Netshikweta, R., Pintó, R.M., van der Poel, W.H.M., Rutjes, S., Sano, D., Taylor, M.B., van Zyl, W.B., Rodríguez-Lázaro, D., Kovač, K., Sellwood, J., 2011. Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food. Food Anal. Methods 4, 4–12.

Boudaud, N., Machinal, C., David, F., Fréval-Le Bourdonnec, A., Jossent, J., Bakanga, F., Arnal, C., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., Gantzer, C., 2012. Removal of MS2, Qβ and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. Water Res. 46, 2651–2664.

Boxman, I.L.A., Verhoef, L., Vennema, H., Ngui, S.L., Friesema, I.H.M., Whiteside, C., Lees, D., Koopmans, M., 2016. International linkage of two food-borne hepatitis A clusters through traceback of mussels, the Netherlands, 2012. Euro Surveill. 21, pii=30113.

Brandsma, S.R., Muehlhauser, V., Jones, T.H., 2012. Survival of murine norovirus and F-RNA coliphage MS2 on pork during storage and retail display. Int. J. Food Microbiol. 159, 193–197.

Brié, A., Bertrand, I., Meo, M., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. The Effect of Heat on the Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2. Food Environ. Virol. 8, 251–261.

Brinton Jr., C.C., Gemski Jr, P., Carnahan, J., 1964. A new type of bacterial pilus genetically controlled by the fertility factor of E. coli K 12 and its role in chromosome transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 776–783.

Brion, G.M., Meschke, J.S., Sobsey, M.D., 2002. F-specific RNA coliphages: occurrence, types, and survival in natural waters. Water Res. 36, 2419–2425.

Brion, G.M., Silverstein, J., 1999. Iodine disinfection of a model bacteriophage, MS2, demonstrating apparent rebound. Water Res. 33, 169–179.

Brooks, L.E., Field, K.G., 2017. Global model fitting to compare survival curves for fecal indicator bacteria and ruminant-associated genetic markers. J. Appl. Microbiol. 38, 42–49.

Bull, R.A., Eden, J.-S., Rawlinson, W.D., White, P.A., 2010. Rapid Evolution of Pandemic Noroviruses of the GII.4 Lineage. PLoS Pathog. 6, e1000831.

Burkhardt, W., Calci, K.R., 2000. Selective Accumulation May Account for Shellfish-Associated Viral Illness. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1375–1378.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin. Chem. 55, 611–622.

Butot, S., Putallaz, T., Sánchez, G., 2008. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. Int. J. Food Microbiol. 126, 30–35.

Butot, S., Zuber, S., Baert, L., 2014. Sample preparation prior to molecular amplification: Complexities and opportunities. Curr. Opin. Virol. 4, 66–70.

Cabelli, V.J., 1988. Narragansett Bay Esturary Program NBP-90-32. Microbial Indicator Levels in Shellfish, Water and Sediments from the Upper Narragansett Bay Conditional Shellfish-growing Area.

Cabelli, V.J., 1978. New standards for enteric bacteria, in: Mitchell, R. (Ed.), Water Pollution Microbiology. New York, pp. 233–271.

Cabelli, V.J., Dufour, A.P., McCabe, L.J., Levin, M.A., 1982. Swimming-associated gastroenteritis and water quality. Am. J. Epidemiol. 115, 606–616.

Calci, K.R., Burkhardt, W., Watkins, W.D., Rippey, S.R., 1998. Occurrence of male-specific bacteriophage in feral and domestic animal wastes, human feces, and human-associated wastewaters. Appl. Environ. Microbiol. 64, 5027–5029.

Campos, C.J.A., Avant, J., Gustar, N., Lowther, J., Powell, A., Stockley, L., Lees, D.N., 2015. Fate of Human Noroviruses in Shellfish and Water Impacted by Frequent Sewage Pollution Events. Environ. Sci. Technol. 49, 8377–8385.

Campos, C.J.A., Avant, J., Lowther, J., Till, D., Lees, D.N., 2016. Human norovirus in untreated sewage and effluents from primary, secondary and tertiary treatment processes. Water Res. 103, 224–232.

Campos, C.J.A., Kershaw, S., Morgan, O.C., Lees, D.N., 2017. Risk factors for norovirus contamination of shellfish water catchments in England and Wales. Int. J. Food Microbiol. 241, 318–324.

Campos, C.J.A., Lees, D.N., 2014. Environmental Transmission of Human Noroviruses in Shellfish Waters. Appl. Environ. Microbiol. 80, 3552–3561.

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, 2761–2765.

Caro, L.G., Schnos, M., Maria, S., 1966. The attachement of the male-specific bacteriophage F1 to sensitive strains of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 126–132.

Carratalà, A., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Rusiñol, M., Fresno, S., Cook, N., Girones, R., 2013. Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces. Int. J. Food Microbiol. 164, 128–34.

Carrique-Mas, J., Andersson, Y., Petersén, B., Hedlund, K.O., Sjögren, N., Giesecke, J., 2003. A norwalk-like virus waterborne community outbreak in a Swedish village during peak holiday season. Epidemiol. Infect. 131, 737–744.

Carroll, S., Hargreaves, M., Goonetilleke, A., 2005. Sourcing faecal pollution from onsite wastewater treatment systems in surface waters using antibiotic resistance analysis*. J. Appl. Microbiol. 99, 471–482.

Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R., 2001. Identification of Fecal Escherichia coli from Humans and Animals by Ribotyping Identification of Fecal Escherichia coli from Humans and Animals by Ribotyping. Appl. Environ. Microbiol. 67, 1503–1507.

Carson, C.A., Shear, B.L., Ellersieck, M.R., Schnell, J.D., 2003. Comparison of ribotyping and repetitive extragenic palindromic-PCR for identification of fecal Escherichia coli from humans and animals. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1836–1839.

Carter, M.J., 2005. Enterically infecting viruses: Pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. J. Appl. Microbiol. 98, 1354–1380.

Casanovas-Massana, A., Gómez-Doñate, M., Sánchez, D., Belanche-Muñoz, L.A., Muniesa, M., Blanch, A.R., 2015. Predicting fecal sources in waters with diverse pollution loads using general and molecular host-specific indicators and applying machine learning methods. J. Environ. Manage. 151, 317–325.

Cashdollar, J.L., Wymer, L., 2013. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. J. Appl. Microbiol. 115, 1–11.

CDC, 2011. Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 60, 1–18.

CEFAS, 2014. European Union Reference Laboratory for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs - Annual technical report for calendar year 2013.

CEFAS, 2007. Enumeration Of Male-Specific RNA Bacteriophages In Bivalve Molluscan Shellfish. Weymouth, UK.

Chalmers, J.W.T., McMillan, J.H., 1995. An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. Epidemiol. Infect. 115, 163–167.

Charles, K.J., Shore, J., Sellwood, J., Laverick, M., Hart, A., Pedley, S., 2009. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. J. Appl. Microbiol. 106, 1827–1837.

Chen, H., Qian, F., Xu, J., Chan, M., Shen, Z., Zai, S., Shan, M., Cai, J., Zhang, W., He, J., Liu, Y., Zhang, J., Yuan, Z., Zhu, Z., Hu, Y., 2015. A novel norovirus GII.17 lineage contributed to adult gastroenteritis in Shanghai, China, during the winter of 2014–2015. Emerg. Microbes Infect. 4, e67.

Cheng, H.W.A., Lucy, F.E., Broaders, M.A., Mastitsky, S.E., Chen, C.H., Murray, A., 2012. Municipal wastewater treatment plants as pathogen removal systems and as a contamination source of noroviruses and Enterococcus faecalis. J. Water Health 10, 380–389.

Chern, E.C., Tsai, Y., Olson, B.H., 2004. Occurrence of Genes Associated with Enterotoxigenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli in Agricultural Waste Lagoons. Appl. Environ. Microbiol. 70, 356–362.

Choi, C., Kingsley, D.H., 2016. Temperature-Dependent Persistence of Human Norovirus Within Oysters (Crassostrea virginica). Food Environ. Virol. 8, 141–147.

Choi, S., Jiang, S.C., 2005. Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. Appl. Environ. Microbiol. 71, 7426–7433.

Chung, H., Jaykus, L.-A., Lovelace, G., Sobsey, M.D., 1998. Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters. Water Sci. Technol. 38, 37–44.

Clark, B., McKendrick, M., 2004. A review of viral gastroenteritis. Curr. Opin. Infect. Dis. 17, 461–469.

Cliver, D.O., 2009. Capsid and Infectivity in Virus Detection. Food Environ. Virol. 1, 123–128.

Cliver, D.O., Ellender, R.D., Sobsey, M.D., 1983. Methods to Detect Viruses in Foods : Testing and Interpretation of Results 1. J. Food Prot. 46, 345–357.

Cole, D., Long, S.C., Sobsey, M.D., 2003. Evaluation of F+ RNA and DNA Coliphages as Source-Specific Indicators of Fecal Contamination in Surface Waters. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6507–6514.

Colford, J.M., Wade, T.J., Schiff, K.C., Wright, C.C., Griffith, J.F., Sandhu, S.K., Burns, S., Sobsey, M., Lovelace, G., Weisberg, S.B., 2007. Water Quality Indicators and the Risk of Illness at Beaches With Nonpoint Sources of Fecal Contamination. Epidemiology 18, 27–35.

Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, 2016. E. PILLY, Maladies Infectieuses et Tropicales.

Collier, M.G., Khudyakov, Y.E., Selvage, D., Adams-Cameron, M., Epson, E., Cronquist, A., Jervis, R.H., Lamba, K., Kimura, A.C., Sowadsky, R., Hassan, R., Park, S.Y., Garza, E., Elliott, A.J., Rotstein, D.S., Beal, J., Kuntz, T., Lance, S.E., Dreisch, R., Wise, M.E., Nelson, N.P., Suryaprasad, A., Drobeniuc, J., Holmberg, S.D., Xu, F., 2014. Outbreak of hepatitis A in the USA associated with frozen pomegranate arils imported from Turkey: An epidemiological case study. Lancet Infect. Dis. 14, 976–981.

Commission Européenne, 2015. Règlement (UE) 2015/2285 de la Commission du 30 janvier 2015 modifiant l'annexe II du règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine au regard de certaines exigences applicables aux mollusques bivalves, aux échinodermes, aux tuniciers et aux gastéropodes marins vivants et l'annexe I du règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. J. Off. l'Union Eur. L323, 2–4.

Commission Européenne, 1998. Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. J. Off. l'Union Eur. L330, 1–30.

Conaty, S., Bird, P., Bell, G., Kraa, E., Grohmann, G., McAnulty, J.M., 2000. Hepatitis A in New South Wales, Australia from consumption of oysters: the first reported outbreak. Epidemiol. Infect. 124, 121–130.

Contreras-Coll, N., Lucena, F., Mooijman, K., Havelaar, A., Pierzo, V., Boque, M., Gawler, A., Höller, C., Lambiri, M., Mirolo, G., Moreno, B., Niemi, M., Sommer, R., Valentin, B., Wiedenmann, A., Young, V., Jofre, J., 2002. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. Water Res. 36, 4963–4974.

Cook, N., Knight, A., Richards, G., Stein, J., 2015. FSA Project FS101120 : A critical review on the survival and elimination of norovirus in food and on food contact surfaces.

Cook, N., Knight, A., Richards, G.P., 2016. Persistence and Elimination of Human Norovirus in Food and on Food Contact Surfaces: A Critical Review. J. Food Prot. 79, 1273–1294.

Costa-Mattioli, M., Cristina, J., Perez-bercof, R., Casane, D., Colina, R., Garcia, L., Vega, I., Glikman, G., Romanowsky, V., Castello, A., Nicand, E., Gassin, M., Billaudel, S., Ferre, V., 2002. Molecular Evolution of Hepatitis A Virus : a New Classification Based on the Complete VP1 Protein. J. Virol. 76, 9516–9525.

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, 3846–3855.

Costán-Longares, A., Montemayor, M., Payán, A., Méndez, J., Jofre, J., Mujeriego, R., Lucena, F., 2008. Microbial indicators and pathogens: Removal, relationships and predictive capabilities in water reclamation facilities. Water Res. 42, 4439–4448.

Costantini, V., Loisy, F., Joens, L., Le Guyader, F.S., Saif, L.J., 2006. Human and Animal Enteric Caliciviruses in Oysters from Different Coastal Regions of the United States. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1800–1809.

Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P., 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. Int. J. Food Microbiol. 201, 17–26.

Couturier, E., Letort, M., Roque, A., Dussaix, E., Delarocque-astagneau, E., 2007. Hépatite aiguë A en France en 2006 Première année de surveillance par la déclaration obligatoire. Bull. épidémiologique Hebd. - InVS 29–30, 253–256.

Croci, D.L., De Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A., Divizia, M., Donia, D., Cosentino, A.M., Moretti, P., Costantini, G., 2000. Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and Escherichia coli in Adriatic Sea mussels. J. Appl. Microbiol. 88, 293–298.

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, 5743–5751.

d'Hérelle, F., 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Académie des Sci. Paris 165, 373–378.

D'Souza, D.H., Sair, A., Williams, K., Papafragkou, E., Jean, J., Moore, C., Jaykus, L., 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. Int. J. Food Microbiol. 108, 84–91.

Da Silva, A.K., Le Saux, J.C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7891–7897.

Dancho, B.A., Chen, H., Kingsley, D.H., 2012. Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin. Int. J. Food Microbiol. 155, 222–226.

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., Mead, P., 2000. A Foodborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with Norwalk- like Viruses: First Molecular Traceback to Deli Sandwiches Contaminated during Preparation. J. Infect. Dis. 181, 1467–1470.

David, S.T., McIntyre, L., MacDougall, L., Kelly, D., Liem, S., Schallié, K., McNabb, A., Houde, A., Mueller, P., Ward, P., Trottier, Y.-L., Brassard, J., 2007. An Outbreak of Norovirus Caused by Consumption of Oysters from Geographically Dispersed Harvest Sites, British Columbia, Canada, 2004. Foodborne Pathog. Dis. 4, 349–358.

Dawson, D.J., Paish, A., Staffell, L.M., Seymour, I.J., Appleton, H., 2005. Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus. J. Appl. Microbiol. 98, 203–209.

De Giglio, O., Caggiano, G., Bagordo, F., Barbuti, G., Brigida, S., Lugoli, F., Grassi, T., La Rosa, G., Lucentini, L., Uricchio, V., De Donno, A., Montagna, M., 2017. Enteric Viruses and Fecal Bacteria Indicators to Assess Groundwater Quality and Suitability for Irrigation. Int. J. Environ. Res. Public Health 14, 558.

de Graaf, M., van Beek, J., Koopmans, M.P.G., 2016. Human norovirus transmission and evolution in a changing world. Nat. Rev. Microbiol. 14, 421–433.

de Graaf, M., van Beek, J., Vennema, H., Podkolzin, A., Hewitt, J., Bucardo, F., Templeton, K., Mans, J., Nordgren, J., Reuter, G., Lynch, M., Rasmussen, L., Iritani, N., Chan, M., Martella, V., Ambert-Balay, K., Vinjé, J., White, P., Koopmans, M., 2015. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? Euro Surveill. 20, pii=21178.

De Luca, G., Sacchetti, R., Leoni, E., Zanetti, F., 2013. Removal of indicator bacteriophages from municipal wastewater by a full-scale membrane bioreactor and a conventional activated sludge process: implications to water reuse. Bioresour. Technol. 129, 526–531.

de Mesquita, M.M.F., Evison, L.M., West, P.A.A., 1991. Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (Mytilus edulis) under artificial depuration conditions. J. Appl. Bacteriol. 70, 495–501.

de Wit, M.A.S., Widdowson, M.A., Vennema, H., de Bruin, E., Fernandes, T., Koopmans, M., 2007. Large outbreak of norovirus: The baker who should have known better. J. Infect. 55, 188–193.

Debartolomeis, J., Cabelli, V.J., 1991. Evaluation of an Escherichia coli host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1301–1305.

Debbink, K., Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Baric, R.S., 2012. Norovirus Immunity and the Great Escape. PLoS Pathog. 8, e1002921.

Dennis, J.M., Wolman, A., 1959. 1955-56 Infectious Hepatitis Epidemic in Delhi, India [with Discussion]. J. Am. Water Works Assoc. 51, 1288–1298.

Dent, K.C., Thompson, R., Barker, A.M., Hiscox, J.A., Barr, J.N., Stockley, P.G., Ranson, N.A., 2013. The Asymmetric Structure of an Icosahedral Virus Bound to Its Receptor Suggests a Mechanism for Genome Release. Structure 21, 1225–1234.

DGAL, 2013. Contamination des zones de production de coquillages par les norovirus - Protocole cadre de gestion DGAL/SDSSA/N2013-8187 du 20 novembre 2013.

Di Girolamo, R., Liston, J., Matches, J., 1977. Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. Appl. Environ. Microbiol. 33, 19–25.

DiCaprio, E., Purgianto, A., Ma, Y., Hughes, J., Dai, X., Li, J., 2015. Attachment and localization of human norovirus and animal caliciviruses in fresh produce. Int. J. Food Microbiol. 211, 101–108.

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 Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 435, 178–187.

Diston, D., Wicki, M., 2015. Occurrence of bacteriophages infecting Bacteroides host strains (ARABA 84 and GB-124) in fecal samples of human and animal origin. J. Water Health 13, 654–661.

Doré, B., Keaveney, S., Flannery, J., Rajko-Nenow, P., 2010. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. Euro Surveill 15, pii=19567.

Doré, W.J., Henshilwood, K., Lees, D.N., 2000. Evaluation of F-Specific RNA Bacteriophage as a Candidate Human Enteric Virus Indicator for Bivalve Molluscan Shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1280–1285.

Doré, W.J., Henshilwood, K., Lees, D.N., 1998. The development of management strategies for control of virological quality in oysters. Water Sci. Technol. 38, 29–35.

Doré, W.J., Lees, D.N., 1995. Behavior of Escherichia coli and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2830–2834.

Doré, W.J., Mackie, M., Lees, D.N., 2003. Levels of male-specific RNA bacteriophage and Escherichia coli in molluscan bivalve shellfish from commercial harvesting areas. Lett. Appl. Microbiol. 36, 92–96.

Drouaz, N., Schaeffer, J., Farkas, T., Le Pendu, J., Le Guyader, F.S., 2015. Tulane virus as a potential surrogate to mimic norovirus behavior in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 81, 5249–5256.

Dryden, S.K., Ramaswami, B., Yuan, Z., Giammar, D.E., Angenent, L.T., 2006. A rapid reverse transcription-PCR assay for F+ RNA coliphages to trace fecal pollution in Table Rock Lake on the Arkansas–Missouri border. Water Res. 40, 3719–3724.

Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., de Groot, A., Twisk, F., Koopmans, M., 2004. Inactivation of Caliciviruses. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4538–4543.

Duizer, E., Koopmans, M., 2013. Norovirus, in: Motarjemi, Y. (Ed.), Encyclopedia of Food Safety. p. 223.

Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P.G., Estes, M.K., 2004. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. J. Gen. Virol. 85, 79–87.

Durán, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F., Jofre, J., 2002. Removal and inactivation of indicator bacteriophages in fresh waters. J. Appl. Microbiol. 92, 338–347.

Durán, A.E., Muniesa, M., Mocé-Llivina, L., Campos, C., Jofre, J., Lucena, F., 2003. Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. J. Appl. Microbiol. 95, 29–37.

Duran, M., Haznedaroğlu, B.Z., Zitomer, D.H., 2006. Microbial source tracking using host specific FAME profiles of fecal coliforms. Water Res. 40, 67–74.

Duran, M., Yurtsever, D., Dunaev, T., 2009. Choice of indicator organism and library size considerations for phenotypic microbial source tracking by FAME profiling. Water Sci. Technol. 60, 2659–2668.

Ebdon, J., Muniesa, M., Taylor, H., 2007. The application of a recently isolated strain of Bacteroides (GB-124) to identify human sources of faecal pollution in a temperate river catchment. Water Res. 41, 3683–3690.

Ebdon, J.E., Taylor, H.D., 2006. Geographical stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources. Environ. Sci. Technol. 40, 5327–5232.

Ebentier, D.L., Hanley, K.T., Cao, Y., Badgley, B.D., Boehm, A.B., Ervin, J.S., Goodwin, K.D., Gourmelon, M., Griffith, J.F., Holden, P.A., Kelty, C.A., Lozach, S., McGee, C., Peed, L.A., Raith, M., Ryu, H., Sadowsky, M.J., Scott, E.A., Domingo, J.S., Schriewer, A., Sinigalliano, C.D., Shanks, O.C., Van De Werfhorst, L.C., Wang, D., Wuertz, S., Jay, J.A., 2013. Evaluation of the repeatability and reproducibility of a suite of qPCR-based microbial source tracking methods. Water Res. 47, 6839–6848.

Edwards, D.R., Coyne, M.S., Daniel, T.C., Vendrell, P.F., Murdoch, J.F., Moore, P.A., 1997. Indicator bacteria concentrations of two Northwest Arkansas streams in relation to flow and season. Trans. ASAE 40, 103–109.

EFSA, 2016. Technical specifications for a European baseline survey of norovirus in oysters. EFSA J. 14, 4414.

EFSA, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA J. 13, 4329.

EFSA, 2012. Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. EFSA J. 10, 2500.

EFSA, 2011. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. EFSA J. 9, 2190.

Eftim, S.E., Hong, T., Soller, J., Boehm, A., Warren, I., Ichida, A., Nappier, S.P., 2017. Occurrence of norovirus in raw sewage – A systematic literature review and meta-analysis. Water Res. 111, 366–374.

Egli, A., Infanti, L., Dumoulin, A., Buser, A., Samaridis, J., Stebler, C., Gosert, R., Hirsch, H.H., 2009. Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replication in 400 Healthy Blood Donors. J. Infect. Dis. 199, 837–846.

Einöder-Moreno, M., Lange, H., Grepp, M., Osborg, E., Vainio, K., Vold, L., 2016. Non-heat-treated frozen raspberries the most likely vehicle of a norovirus outbreak in Oslo, Norway, November 2013. Epidemiol. Infect. 144, 2765–2772.

Esseili, M.A., Wang, Q., Saif, L.J., 2012. Binding of human GII.4 norovirus virus-like particles to carbohydrates of romaine lettuce leaf cell wall materials. Appl. Environ. Microbiol. 78, 786–794.

Ethelberg, S., Lisby, M., Böttiger, B., Schultz, A.C., Villif, A., Jensen, T., Olsen, K.E., Scheutz, F., Kjelsø, C., Müller, L., 2010. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. Euro Surveill. 15, pii=19484.

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., Estes, M.K., 2016. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids. Science 353, 1387–1393.

Evenson, C.J., Strevett, K.A., 2006. Discriminant analysis of fecal bacterial species composition for use as a phenotypic microbial source tracking method. Res. Microbiol. 157, 437–444.

FAO, 2010. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Purification des coquillages bivalves : aspects fondamentaux et pratiques.

Fauvel, B., Cauchie, H.-M., Gantzer, C., Ogorzaly, L., 2016. Contribution of hydrological data to the understanding of the spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events. Water Res. 94, 328–340.

Fauvel, B., Gantzer, C., Cauchie, H.M., Ogorzaly, L., 2017a. In Situ Dynamics of F-Specific RNA Bacteriophages in a Small River: New Way to Assess Viral Propagation in Water Quality Studies. Food Environ. Virol. 9, 89–102.

Fauvel, B., Ogorzaly, L., Cauchie, H.M., Gantzer, C., 2017b. Interactions of infectious F-specific RNA bacteriophages with suspended matter and sediment: Towards an understanding of FRNAPH distribution in a river water system. Sci. Total Environ. 574, 960–968.

FDA, 2015. National Shellfish Sanitation Program (NSSP) - Guide for the control of molluscan shellfish 2015.

Fernandez-Cassi, X., Silvera, C., Cervero-Aragó, S., Rusiñol, M., Latif-Eugeni, F., Bruguera-Casamada, C., Civit, S., Araujo, R.M., Figueras, M.J., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2016. Evaluation of the microbiological quality of reclaimed water produced from a lagooning system. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 16816–16833.

Field, K.G., Samadpour, M., 2007. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. Water Res. 41, 3517–3538.

Fiore, A.E., 2004. Hepatitis A Transmitted by Food. Clin. Infect. Dis. 38, 705–715.

Fitzgerald, T.L., Merritt, T.D., Zammit, A., McLeod, C., Landinez, L.M., White, P.A., Munnoch, S.A., Durrheim, D.N., 2014. An outbreak of norovirus genogroup II associated with New South Wales oysters. Commun. Dis. Intell. Q. Rep. 38, E9–E15.

Flannery, J., Keaveney, S., Doré, W., 2009. Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oyster. J. Food Prot. 72, 2358–2362.

Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O'Flaherty, V., Doré, W., 2013a. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. Water Res. 47, 5222–5231.

Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O'Flaherty, V., Doré, W., 2012. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. Appl. Environ. Microbiol. 78, 3400–3406.

Flannery, J., Rajko-Nenow, P., Keaveney, S., O'Flaherty, V., Doré, W., 2013b. Simulated sunlight inactivation of norovirus and FRNA bacteriophage in seawater. J. Appl. Microbiol. 115, 915–922.

Fong, T.T., Lipp, E.K., 2005. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments : Health Risks , Detection , and Potential Water Quality Assessment Tools. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69, 357–371.

Formiga-Cruz, M., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.-C., Henshilwood, K., Hernroth, B.E., Jofre, J., Lees, D.N., Lucena, F., Papapetropoulou, M., Rangdale, R.E., Tsibouxi, A., Vantarakis, A., Girones, R., 2003. Evaluation of Potential Indicators of Viral Contamination in Shellfish and Their Applicability to Diverse Geographical Areas. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1556–1563.

Formiga-Cruz, M., Tofino-Quesada, G., Bofill-Mas, S., Lees, D.N., Henshilwood, K., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.-C., Hernroth, B.E., Vantarakis, A., Tsibouxi, A., Papapetropoulou, M., Furones, M.D., Girones, R., 2002. Distribution of Human Virus Contamination in Shellfish from Different Growing Areas in Greece, Spain, Sweden, and the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5990–5998.

Friedman, D.S., Heisey-Grove, D., Argyros, F., Berl, E., Nsubuga, J., Stiles, T., Fontana, J., Beard, R.S., Monroe, S., McGrath, M.E., Sutherby, H., Dicker, R.C., DeMaria, A., Matyas, B.T., 2005. An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with wedding cakes. Epidemiol. Infect. 133, 1057–1063.

Friedman, S.D., Cooper, E.M., Calci, K.R., Genthner, F.J., 2011. Design and assessment of a real time reverse transcription-PCR method to genotype single-stranded RNA male-specific coliphages (Family Leviviridae). J. Virol. Methods 173, 196–202.

Friedman, S.D., Cooper, E.M., Casanova, L., Sobsey, M.D., Genthner, F.J., 2009a. A reverse transcription-PCR assay to distinguish the four genogroups of male-specific (F+) RNA coliphages. J. Virol. Methods 159, 47–52.

Friedman, S.D., Genthner, F.J., Gentry, J., Sobsey, M.D., Vinjé, J., 2009b. Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (Family Leviviridae). J. Virol. 83, 11233–11243.

Frohnert, A., Apelt, S., Klitzke, S., Chorus, I., Szewzyk, R., Selinka, H.C., 2014. Transport and removal of viruses in saturated sand columns under oxic and anoxic conditions - Potential implications for groundwater protection. Int. J. Hyg. Environ. Health 217, 861–870.

Fu, J., Ai, J., Jin, M., Jiang, C., Zhang, J., Shi, C., Lin, Q., Yuan, Z., Qi, X., Bao, C., Tang, F., Zhu, Y., 2015. Emergence of a new GII.17 norovirus variant in patients with acute gastroenteritis in jiangsu, China, september 2014 to march 2015. Euro Surveill. 20, pii= 21157.

Furukawa, T., Suzuki, Y., 2013. A Proposal for Source Tracking of Fecal Pollution in Recreational Waters by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Microbes Environ. 28, 444–449.

Furuse, K., Ando, A., Osawa, S., Watanabe, I., 1981. Distribution of ribonucleic acid coliphages in raw sewage from treatment plants in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 41, 1139–1143.

Furuse, K., Osawa, S., Kawashiro, J., Tanaka, R., Ozawa, A., Sawamura, S., Yanagawa, Y., Nagao, T., Watanabe, I., 1983. Bacteriophage distribution in human faeces: continuous survey of healthy subjects and patients with internal and leukaemic diseases. J. Gen. Virol. 64, 2039–2043.

Furuse, K., Sakurai, T., Hirashima, A., Ando, A., Watanabe, I., 1978. Distribution of ribonucleic acid coliphages in South and East Asia. Appl. Environ. Microbiol. 35, 995–1002.

Fuster, N., Pintó, R.M., Fuentes, C., Beguiristain, N., Bosch, A., 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 Res. 101, 226–232.

Gallay, A., de Valk, H., Cournot, M., Ladeuil, B., Hemery, C., Castor, C., Bon, F., Mégraud, F., Le Cann, P., Desenclos, J.C., 2006. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. Clin. Microbiol. Infect. 12, 561–570.

Gallimore, C.I., Cheesbrough, J.S., Lamden, K., Bingham, C., Gray, J.J., 2005. Multiple norovirus genotypes characterised from an oyster-associated outbreak of gastroenteritis. Int. J. Food Microbiol. 103, 323–330.

Gallot, C., Grout, L., Roque-Afonso, A.-M., Couturier, E., Carrillo-Santisteve, P., Pouey, J., Letort, M.-J., Hoppe, S., Capdepon, P., Saint-Martin, S., de Valk, H., Vaillant, V., 2011. Hepatitis A Associated with Semidried Tomatoes, France, 2010. Emerg. Infect. Dis. 17, 566–567.

Gao, X., Esseili, M.A., Lu, Z., Saif, L.J., Wang, Q., 2016. Recognition of Histo-Blood Group Antigen-Like Carbohydrates in Lettuce by Human GII.4 Norovirus. Appl. Environ. Microbiol. 82, 2966–2974.

Gao, Z., Liu, B., Huo, D., Yan, H., Jia, L., Du, Y., Qian, H., Yang, Y., Wang, X., Li, J., Wang, Q., 2015. Increased norovirus activity was associated with a novel norovirus GII.17 variant in Beijing, China during winter 2014–2015. BMC Infect. Dis. 15, 574.

Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of Viral Genomes in Mineral Water : a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk ? Appl. Environ. Microbiol. 69, 3965–3969.

Geldreich, E.E., Kenner, B.A., 1969. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. J. water Pollut. Control Fed. 41, R336–R352.

Geldreich, E.E., Litsky, W., 1976. Fecal coliform and fecal streptococcus density relationships in waste discharges and receiving waters. CRC Crit. Rev. Environ. Control 6, 349–369.

Gerba, C.P., 2009. Indicator Microorganisms, in: Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (Eds.), Environmental Microbiology. pp. 485–499.

Gerba, C.P., 2007. Virus occurrence and survival in the environmental waters, in: Bosch, A. (Ed.), Human Virus in Water : Perspectives in Medical Virology. Elsevier, pp. 91–108.

Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., 2017. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. Environ. Sci. Technol. 51, 7318–7325.

Gerba, C.P., Goyal, S.M., LaBelle, R.L., Bodgan, G.F., 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. Am. J. Public Health 69, 1116–1119.

Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S., 2010. Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques. Water Res. 44, 4325–4339.

Golmohammadi, R., Valegård, K., Fridborg, K., Liljas, L., 1993. The refined Structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. J. Mol. Biol. 234, 620–639.

Gossner, C.M., Severi, E., 2014. Three simultaneous, food-borne, multi-country outbreaks of hepatitis A virus infection reported in EPIS-FWD in 2013: what does it mean for the European Union? Euro Surveill. 19, pii=20941.

Gourmelon, M., Caprais, M.P., Segura, R., Le Mennec, C., Lozach, S., Piriou, J.Y., Rince, A., 2007. Evaluation of Two Library-Independent Microbial Source Tracking Methods To Identify Sources of Fecal Contamination in French Estuaries. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4857–4866.

Grabow, W.O.K., 2001. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. Water Sa 27, 251–268.

Grabow, W.O.K., 1990. Microbiology of drinking water treatment : reclaimed wastewater, in: McFeters, G. (Ed.), Drinking Water Microbiology - Progress and Recent Developments. New York, pp. 185–203.

Grabow, W.O.K., Neubrech, T.E., Holtzhausen, C.S., Jofre, J., 1995. Bacteroides fragilis and Escherichia coli bacteriophages: Excretion by humans and animals. Water Sci. Technol. 31, 223–230.

Grabow, W.O.K., Taylor, M.B., de Villiers, J.C., 2001. New methods for the detection of viruses : call for review of drinking water quality guidelines. Water Sci. Technol. 43, 1–8.

Griffin, J.S., Plummer, J.D., Long, S.C., 2008. Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. Virol. J. 5, 112.

Griffith, J.F., Weisberg, S.B., McGee, C.D., 2003. Evaluation of microbial source tracking methods using mixed fecal sources in aqueous test samples. J. Water Health 1, 141–51.

Grove, S.F., Forsyth, S., Wan, J., Coventry, J., Cole, M., Stewart, C.M., Lewis, T., Ross, T., Lee, A., 2008. Inactivation of hepatitis A virus, poliovirus and a norovirus surrogate by high pressure processing. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 9, 206–210.

Guan, D., Joerger, R.D., Kniel, K.E., Calci, K.R., Hicks, D.T., Pivarnik, L.F., Hoover, D.G., 2007. Effect of high hydrostatic pressure on four genotypes of F-specific RNA bacteriophages. J. Appl. Microbiol. 102, 51–56.

Guélin, A., 1948. Etude quantitative de bactériophages de la mer. Ann. Inst. Pasteur 74, 104–108.

Guzmán, C., Mocé-Llivina, L., Lucena, F., Jofre, J., 2008. Evaluation of Escherichia coli host strain CB390 for simultaneous detection of somatic and F-specific coliphages. Appl. Environ. Microbiol. 74, 531–534.

Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C., Regli, S., 1993. Risk assessment of virus in drinking water. Risk Anal. 13, 545–52.

Hall, A.J., Rosenthal, M., Gregoricus, N., Greene, S.A., Ferguson, J., Henao, O.L., Vinjé, J., Lopman, B.A., Parashar, U.D., Widdowson, M.A., 2011. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. Emerg. Infect. Dis. 17, 1381–1388.

Halliday, M.L., Kang, L.-Y., Zhou, T.-K., Hu, M.-D., Pan, Q.-C., Fu, T.-Y., Huang, Y.-S., Hu, S.-L., 1991. An Epidemic of Hepatitis A Attributable to the Ingestion of Raw Clams in Shanghai, China. J. Infect. Dis. 164, 852–859.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M., 2011a. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 424–436.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M., 2011b. Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. Water Res. 45, 1358–1368.

Han, T.-H., Kim, S.-C., Kim, S.-T., Chung, C.-H., Chung, J.-Y., 2014. Detection of norovirus genogroup IV, klassevirus, and pepper mild mottle virus in sewage samples in South Korea. Arch. Virol. 159, 457–463.

Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M., 2015. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. Sci. Total Environ. 520, 32–38.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2005. Application of Cation-Coated Filter Method to Detection of Noroviruses, Enteroviruses, Adenoviruses, and Torque Teno Viruses in the Tamagawa River in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 71, 2403–2411.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2006. Seasonal profiles of human noroviruses and indicator bacteria in a wastewater treatment plant in Tokyo, Japan. Water Sci. Technol. 54, 301–308.

Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Asami, M., Akiba, M., Kunikane, S., 2009. Application of real-time PCR assays to genotyping of F-specific phages in river water and sediments in Japan. Water Res. 43, 3759–3764.

Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S., 2010. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. Water Res. 44, 1747–1752.

Haramoto, E., Otagiri, M., Morita, H., Kitajima, M., 2012. Genogroup distribution of F-specific coliphages in wastewater and river water in the Kofu basin in Japan. Lett. Appl. Microbiol. 54, 367–373.

Harmon, S.M., West, R.T., Yates, J.R., 2014. Identifying fecal pollution sources using 3M™ Petrifilm™ count plates and antibiotic resistance analysis in the Horse Creek Watershed in Aiken County, SC (USA). Environ. Monit. Assess. 186, 8215–8227.

Harrault, L., Jardé, E., Jeanneau, L., Petitjean, P., 2014. Are fecal stanols suitable to record and identify a pulse of human fecal contamination in short-term exposed shellfish? A microcosm study. Mar. Pollut. Bull. 89, 40–48.

Hartard, C., Banas, S., Loutreul, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016. Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters. Appl. Environ. Microbiol. 82, 5709–5719.

Hartard, C., Banas, S., Rivet, R., Boudaud, N., Gantzer, C., 2017. Rapid and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: Application to marketed products. Food Microbiol. 63, 248–254.

Hartard, C., Leclerc, M., Rivet, R., Maul, A., Loutreul, J., Banas, S., Boudaud, N., Gantzer, C. F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of oysters. *(in press Appl. Environ. Microbiol.)*

Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., Gantzer, C., 2015. Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins. Appl. Environ. Microbiol. 81, 6505–6515.

Haruna, I., Ito, Y.H., Yamane, K., Miyake, T., Shiba, T., Watanabe, I., 1971. Isolation and properties of RNA replicases induced by SP and FI phages. Proc Natl Acad Sci USA 68, 1778–1779.

Harwood, V.J., Boehm, A.B., Sassoubre, L.M., Vijayavel, K., Stewart, J.R., Fong, T.T., Caprais, M.P., Converse, R.R., Diston, D., Ebdon, J., Fuhrman, J.A., Gourmelon, M., Gentry-Shields, J., Griffith, J.F., Kashian, D.R., Noble, R.T., Taylor, H., Wicki, M., 2013. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. Water Res. 47, 6929–6943.

Harwood, V.J., Brownell, M., Wang, S., Lepo, J., Ellender, R.D., Ajidahun, A., Hellein, K.N., Kennedy, E., Ye, X., Flood, C., 2009. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. Water Res. 43, 4812–4819.

Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2005. Validity of the Indicator Organism Paradigm for Pathogen Reduction in Reclaimed Water and Public Health Protection. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3163–3170.

Harwood, V.J., Stoeckel, D.M., 2011. Performance Criteria, in: Hagedorn, C., Blanch, A.R., Harwood, V.J. (Eds.), Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies. Springer New York, New York, NY, pp. 7–30.

Hassard, F., Sharp, J.H., Taft, H., LeVay, L., Harris, J.P., McDonald, J.E., Tuson, K., Wilson, J., Jones, D.L., Malham, S.K., 2017. Critical Review on the Public Health Impact of Norovirus Contamination in Shellfish and the Environment: A UK Perspective. Food Environ. Virol. 9, 123–141.

Hata, A., Hanamoto, S., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., 2016. Quantitative Distribution of Infectious F-Specific RNA Phage Genotypes in Surface Waters. Appl. Environ. Microbiol. 82, 4244–4252.

Hata, A., Kitajima, M., Katayama, H., 2013. Occurrence and reduction of human viruses, F-specific RNA coliphage genogroups and microbial indicators at a full-scale wastewater treatment plant in Japan. J. Appl. Microbiol. 114, 545–554.

Haugland, R.A., Varma, M., Sivaganesan, M., Kelty, C., Peed, L., Shanks, O.C., 2010. Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected Bacteroidales species and human fecal waste by qPCR. Syst. Appl. Microbiol. 33, 348–357.

Havelaar, A.H., Furuse, K., Hogeboom, W.M., 1986. Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. J. Appl. Bacteriol. 60, 255–262.

Havelaar, A.H., Hogeboom, W.M., 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. J. Appl. Bacteriol. 56, 439–447.

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., Devleesschauwer, B., 2015. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010. PLOS Med. 12, e1001923.

Havelaar, A.H., Pot-Hogeboom, W.M., Furuse, K., Pot, R., Hormann, M.P., 1990. F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. J. Appl. Bacteriol. 69, 30–37.

Havelaar, A.H., van Olphen, M., Drost, Y.C., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. Appl. Environ. Microbiol. 59, 2956–2962.

Hellmer, M., Paxeus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., Bergstrom, T., Norder, H., 2014. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. Appl. Environ. Microbiol. 80, 6771–6781.

Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2015. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. Int. J. Food Microbiol. 202, 57–65.

Herbst-Kralovetz, M.M., Radtke, A.L., Lay, M.K., Hjelm, B.E., Bolick, A.N., Sarker, S.S., Atmar, R.L., Kingsley, D.H., Arntzen, C.J., Estes, M.K., Nickerson, C.A., 2013. Lack of norovirus replication and histo-blood group antigen expression in 3-dimensional intestinal epithelial cells. Emerg. Infect. Dis. 19, 431–438.

Hernroth, B.E., Conden-Hansson, A.-C., Rehnstam-Holm, A.-S., Girones, R., Allard, A.K., 2002. Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, Mytilus edulis: the First Scandinavian Report. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4523–4533.

Hewitt, J., Leonard, M., Greening, G.E., Lewis, G.D., 2011. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. Water Res. 45, 6267–6276.

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

Hodgson, K.R., Torok, V.A., Turnbull, A.R., 2017. Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusc management. Food Microbiol. 65, 284–293.

Hoebe, C.J.P.A., Vennema, H., de Roda Husman, A.M., van Duynhoven, Y.T.H.P., 2004. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. J. Infect. Dis. 189, 699–705.

Hoehne, M., Schreier, E., 2006. Detection of Norovirus genogroup I and II by multiplex real-time RT-PCR using a 3'-minor groove binder-DNA probe. BMC Infect. Dis. 6, 69.

Hoffmann, S., Batz, M.B., Morris Jr., J.G., 2012. Annual Cost of Illness and Quality-Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens. J. Food Prot. 75, 1292–1302.

Hot, D., Legeay, O., Jacques, J., Gantzer, C., Caudrelier, Y., Guyard, K., Lange, M., Andréoletti, L., 2003. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. Water Res. 37, 4703–4710.

Hsu, F.C., Shieh, Y.S.C., Duin, J.V.A.N., Beekwilder, M.J., Sobsey, M.D., Hsu, F.C., Shieh, Y.S.C., Duin, J.V.A.N., van Duin, J., Beekwilder, M.J., Sobsey, M.D., 1995. Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3960–3966.

Humphrey, T.J., Martin, K., 1993. Bacteriophage as models for virus removal from Pacific oysters (Crassostrea gigas) during re-laying. Epidemiol. Infect. 111, 325–335.

Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Albinana-Gimenez, N., Rodriguez-Manzano, J., Bofill-Mas, S., Suñen, E., Rosina Girones, R., 2009. Development of a qPCR assay for the quantification of porcine adenoviruses as an MST tool for swine fecal contamination in the environment. J. Virol. Methods 158, 130–135.

Hundesa, A., Maluquer de Motes, C., Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Girones, R., 2006. Identification of Human and Animal Adenoviruses and Polyomaviruses for Determination of Sources of Fecal Contamination in the Environment. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7886–7893.

Huppatz, C., Munnoch, S.A., Worgan, T., Merritt, T.D., Dalton, C., Kelly, P.M., Durrheim, D.N., 2008. A norovirus outbreak associated with consumption of NSW oysters: implications for quality assurance systems. Commun. Dis. Intell. 32, 88–91.

IAWPRC Study group on Health Related Water Microbiology, 1991. Bacteriophages As Model Viruses in Water-Quality Control. Water Res. 25, 529–545.

Ibarluzea, J.M., Moreno, B., Serrano, E., Larburu, K., Maiztegi, M.J., Yarzabal, A., Santa Marina, L., 2007. Somatic coliphages and bacterial indicators of bathing water quality in the beaches of Gipuzkoa, Spain. J. Water Health 5, 417–426.

Ijzerman, M.M., Dahling, D.R., Fout, G.S., 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 63, 145–153.

Ijzerman, M.M., Falkinham, J.O., Hagedorn, C., 1993. A liquid, colorimetric presence-absence coliphage detection method. J. Virol. Methods 45, 229–234.

Ijzerman, M.M., Falkinham, J.O., Reneau, R.B., Hagedorn, C., 1994. Field evaluation of two colorimetric coliphage detection methods. Appl. Environ. Microbiol. 60, 826–830.

International Organization for Standardization, 2017. NF EN ISO 15216-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 2001a. ISO 10705-1. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 2001b. ISO 10705-4. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting Bacteroides fragilis. Geneva, Switzerland.

International Organization for Standardization, 2000. ISO 10705-2. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages. Geneva, Switzerland.

ISSC, 2009. Interstate Shellfish Sanitation Conference - Summary of actions - 2009 Biennial Meeting. Manchester, UK.

Jacobsen, K.H., Wiersma, S.T., 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. Vaccine 28, 6653–6657.

Jean, J., Morales-Rayas, R., Anoman, M.N., Lamhoujeb, S., 2011. Inactivation of hepatitis A virus and norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses). Food Microbiol. 28, 568–572.

Jeong, M.-I., Park, S.Y., Ha, S.-D., 2017. Thermal inactivation of human norovirus on spinach using propidium or ethidium monoazide combined with real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Food Control 78, 79–84.

Jiang, S., Noble, R., Chu, W., 2001. Human Adenoviruses and Coliphages in Urban Runoff-Impacted Coastal Waters of Southern California. Appl. Environ. Microbiol. 67, 179–184.

Jiang, S.C., 2006. Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. Environ. Sci. Technol. 40, 7132–7140.

Jiang, S.C., Chu, W., He, J.-W., 2007. Seasonal Detection of Human Viruses and Coliphage in Newport Bay, California. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6468–6474.

Jiang, X., Wang, M., Wang, K., Estes, M.K., 1993. Sequence and Genomic organization of Norwalk Virus. Virology 195, 51–61.

Jimenez-Clavero, M.A., Escribano-Romero, E., Mansilla, C., Gomez, N., Cordoba, L., Roblas, N., Ponz, F., Ley, V., Saiz, J.-C., 2005. Survey of Bovine Enterovirus in Biological and Environmental Samples by a Highly Sensitive Real-Time Reverse Transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3536–3543.

Jimenez-Clavero, M.A., Fernandez, C., Ortiz, J.A., Pro, J., Carbonell, G., Tarazona, J. V., Roblas, N., Ley, V., 2003. Teschoviruses as Indicators of Porcine Fecal Contamination of Surface Water. Appl. Environ. Microbiol. 69, 6311–6315.

Jofre, J., 2007. Indicators of waterborne enteric viruses, in: Bosch, A. (Ed.), Human Virus in Water : Perspectives in Medical Virology. Elsevier, pp. 227–249.

Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., Muniesa, M., 2014. Bacteriophages infecting Bacteroides as a marker for microbial source tracking. Water Res. 55, 1–11.

Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A., Muniesa, M., 2016. Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. Water 8, 199.

Jofre, J., Ollé, E., Ribas, F., Vidal, A., Lucena, F., 1995. Potential usefulness of bacteriophages that infect Bacteroides fragilis as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3227–3231.

Jofre, J., Stewart, J.R., Grabow, W., 2011. Phage methods, in: Hagedorn, C., Blanch, A.R., Harwood, V.J. (Eds.), Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies. pp. 137–156.

Johnson, L.K., Brown, M.B., Carruthers, E.A., Ferguson, J.A., Dombek, P.E., Sadowsky, M.J., 2004. Sample Size, Library Composition, and Genotypic Diversity among Natural Populations of. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4478–4485.

Johnston, C., Byappanahalli, M.N., Gibson, J.M., Ufnar, J.A., Whitman, R.L., Stewart, J.R., 2013. Probabilistic Analysis Showing That a Combination of Bacteroides and Methanobrevibacter Source Tracking Markers Is Effective for Identifying Waters Contaminated by Human Fecal Pollution. Environ. Sci. Technol. 47, 13621–13628.

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., 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. Science 346, 755–759.

Jones, T.H., Brassard, J., Topp, E., Wilkes, G., Lapen, D.R., 2017. Waterborne Viruses and F-Specific Coliphages in Mixed-Use Watersheds: Microbial Associations, Host Specificities, and Affinities with Environmental/Land Use Factors. Appl. Environ. Microbiol. 83, e02763-16.

Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Takeda, N., Katayama, K., 2003. Broadly Reactive and Highly Sensitive Assay for Norwalk-Like Viruses Based on Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 41, 1548–1557.

Kaplan, J.E., Goodman, R.A., Schonberger, L.B., Lippy, E.C., Gary, G.W., 1982. Gastroenteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with a municipal water system. J Infect Dis 146, 190–197.

Karim, M.R., Fout, G.S., Johnson, C.H., White, K.M., Parshionikar, S.U., 2015. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. J. Virol. Methods 219, 51–61.

Karnik, S., Billeter, M., 1983. The lysis function of RNA bacteriophage Qbeta is mediated by the maturation (A2) protein. EMBO J. 2, 1521–1526.

Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. Water Res. 42, 1441–1448.

Katayama, H., Shimasaki, A., Ohgaki, S., 2002. Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1033–1039.

Khan, A.S., Moe, C.L., Glass, R.I., Monroe, S.S., Estes, M.K., Chapman, L.E., Jiang, X., Humphrey, C., Pon, E., Iskander, J.K., Schonberger, L.B., 1994. Norwalk virus-associated gastroenteritis traced to ice consumption aboard a cruise ship in Hawaii: Comparison and application of molecular method- based assays. J. Clin. Microbiol. 32, 318–322.

Khatib, L.A., Tsai, Y.L., Olson, B.H., 2003. A biomarker for the identification of swine fecal pollution in water, using the STII toxin gene from enterotoxigenic Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63, 231–238.

Kim, D.-K., Kim, S.-J., Kang, D.-H., 2017. Inactivation modeling of human enteric virus surrogates, MS2, Qβ, and ΦX174, in water using UVC-LEDs, a novel disinfecting system. Food Res. Int. 91, 115–123.

Kim, J.Y., Lee, H., Lee, J.E., Chung, M.-S., Ko, G.P., 2013. Identification of Human and Animal Fecal Contamination after Rainfall in the Han River, Korea. Microbes Environ. 28, 187–194.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2012. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier. ed. San Diego.

Kingsley, D.H., Meade, G.K., Richards, G.P., 2002. Detection of both Hepatitis A Virus and Norwalk-Like Virus in Imported Clams Associated with Food-Borne Illness. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3914–3918.

Kirking, H.L., Cortes, J., Burrer, S., Hall, A.J., Cohen, N.J., Lipman, H., Kim, C., Daly, E.R., Fishbein, D.B., 2010. Likely transmission of norovirus on an airplane, October 2008. Clin. Infect. Dis. 50, 1216–1221.

Kirs, M., Smith, D.C., 2007. Multiplex Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase PCR for F+-Specific RNA Coliphages: a Method for Use in Microbial Source Tracking. Appl. Environ. Microbiol. 73, 808–814.

Klovins, J., Overbeek, G.P., van den Worm, S.H.E., Ackermann, H.-W., van Duin, J., 2002. Nucleotide sequence of a ssRNA phage from Acinetobacter: kinship to coliphages. J. Gen. Virol. 83, 1523–1533.

Knight, A., Li, D., Uyttendaele, M., Jaykus, L.-A., 2012. A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity. Crit. Rev. Microbiol. 7828, 1–15.

Ko, S.-M., Kim, J.-O., Oh, M.-J., Kim, D., 2011. Effects of an Oxidative Agent and Lectins on the Binding Inhibition of Recombinant Hepatitis A Virus Proteins to Oyster Digestive Tissues. J. Food Prot. 74, 157–160.

Kohn, M.A., Farley, T.A., Ando, T., Curtis, M., Wilson, S.A., Jin, Q., Monroe, S.S., Baron, R.C., Mcfarland, L.M., Glass, R.I., 1995. An Outbreak of Norwalk Virus Gastroenteritis Associated With Eating Raw Oysters. JAMA 273, 466–471.

Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Söderberg, K., Vasickova, P., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A.M., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., von Bonsdorff, C.-H., Rzeżutka, A., Petrovic, T., Maunula, L., Pavlik, I., Vantarakis, A., 2017. Virological Quality of Irrigation Water in Leafy Green Vegetables and Berry Fruits Production Chains. Food Environ. Virol. 9, 72–78.

Koning, R.I., Gomez-Blanco, J., Akopjana, I., Vargas, J., Kazaks, A., Tars, K., Carazo, J.M., Koster, A.J., 2016. Asymmetric cryo-EM reconstruction of phage MS2 reveals genome structure in situ. Nat. Commun. 7, 12524.

Koopmans, M., Duizer, E., 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. Int. J. Food Microbiol. 90, 23–41.

Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinjé, J., de Medici, D., Monroe, S., 2002. Foodborne viruses. FEMS Microbiol. Rev. 26, 187–205.

Kotwal, G., Cannon, J.L., 2014. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. Curr. Opin. Virol. 4, 37–43.

Kumar, S., Subhadra, S., Singh, B., Panda, B.K., 2013. Hepatitis E virus: the current scenario. Int. J. Infect. Dis. 17, e228–e233.

Kuroda, K., Nakada, N., Hanamoto, S., Inaba, M., Katayama, H., Do, A.T., Nga, T.T.V., Oguma, K., Hayashi, T., Takizawa, S., 2015. Pepper mild mottle virus as an indicator and a tracer of fecal pollution in water environments: Comparative evaluation with wastewater-tracer pharmaceuticals in Hanoi, Vietnam. Sci. Total Environ. 506–507, 287–298.

Kuzmanovic, D.A., Elashvili, I., Wick, C., O'Connell, C., Krueger, S., 2003. Bacteriophage MS2: Molecular Weight and Spatial Distribution of the Protein and RNA Components by Small-Angle Neutron Scattering and Virus Counting. Structure 11, 1339–1348.

La Rosa, G., Della Libera, S., Iaconelli, M., Proroga, Y.T.R., de Medici, D., Martella, V., Suffredini, E., 2017. Detection of Norovirus GII.17 Kawasaki 2014 in Shellfish, Marine Water and Underwater Sewage Discharges in Italy. Food Environ. Virol. 9, 326–333.

La Rosa, G., Iaconelli, M., Pourshaban, M., Muscillo, M., 2010. Detection and molecular characterization of noroviruses from five sewage treatment plants in central Italy. Water Res. 44, 1777–1784.

Layton, B.A., Cao, Y., Ebentier, D.L., Hanley, K., Ballesté, E., Brandão, J., Byappanahalli, M., Converse, R., Farnleitner, A.H., Gentry-Shields, J., Gidley, M.L., Gourmelon, M., Lee, C.S., Lee, J., Lozach, S., Madi, T., Meijer, W.G., Noble, R., Peed, L., Reischer, G.H., Rodrigues, R., Rose, J.B., Schriewer, A., Sinigalliano, C., Srinivasan, S., Stewart, J., Van De Werfhorst, L.C., Wang, D., Whitman, R., Wuertz, S., Jay, J., Holden, P.A., Boehm, A.B., Shanks, O., Griffith, J.F., 2013. Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. Water Res. 47, 6897–6908.

Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E., Pommepuy, M., 2000. Three-Year Study To Assess Human Enteric Viruses in Shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3241–3248.

Le Guyader, F.S., Atmar, R.L., Le Pendu, J., 2012. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. Curr. Opin. Virol. 2, 103–110.

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., Pommepuy, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., 2006a. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. J. Clin. Microbiol. 44, 3878–3882.

Le Guyader, F.S., Krol, J., Ambert-Balay, K., Ruvoen-Clouet, N., Desaubliaux, B., Parnaudeau, S., Le Saux, J.C., Ponge, A., Pothier, P., Atmar, R.L., Le Pendu, J., 2010. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. J. Clin. Microbiol. 48, 915–920.

Le Guyader, F.S., Le Saux, J.-C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., Atmar, R.L., 2008. Aichi Virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus Involved in Clinical Cases from a French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak. J. Clin. Microbiol. 46, 4011–4017.

Le Guyader, F.S., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoën-Clouet, N., Pommepuy, M., Le Pendu, J., 2006b. Norwalk Virus–specific Binding to Oyster Digestive Tissues. Emerg. Infect. Dis. 12, 931–936.

Le Guyader, F.S., Mittelholzer, C., Haugarreau, L., Hedlund, K.O., Alsterlund, R., Pommepuy, M., Svensson, L., 2004. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. Int. J. Food Microbiol. 97, 179–186.

Le Guyader, F.S., Neill, F.H., Dubois, E., Bon, F., Loisy, F., Kohli, E., Pommepuy, M., Atmar, R.L., 2003. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. Int. J. Food Microbiol. 87, 107–112.

Le Guyader, S., Atmar, R.L., 2007. Viruses in shellfish, in: Bosch, A. (Ed.), Human Virus in Water : Perspectives in Medical Virology. Elsevier, pp. 205–226.

Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Rumebe, M., Le Saux, J.-C., Piquet, J.-C., Le Guyader, S.F., 2017. Follow-Up of Norovirus Contamination in an Oyster Production Area Linked to Repeated Outbreaks. Food Environ. Virol. 9, 54–61.

Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., Delattre, J.M., 2000. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. J. Appl. Microbiol. 88, 5–21.

Lee, J.E., Ko, G., 2013. Norovirus and MS2 inactivation kinetics of UV-A and UV-B with and without TiO2. Water Res. 47, 5607–5613.

Lee, J.E., Lee, H., Cho, Y.-H., Hur, H.-G., Ko, G., 2011. F+ RNA coliphage-based microbial source tracking in water resources of South Korea. Sci. Total Environ. 412–413, 127–131.

Lee, J.E., Lim, M.Y., Kim, S.Y., Lee, S., Lee, H., Oh, H.M., Hur, H.G., Ko, G., 2009. Molecular characterization of bacteriophages for microbial source tracking in Korea. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7107–7114.

Lee, R.M., Lessler, J., Lee, R.A., Rudolph, K.E., Reich, N.G., Perl, T.M., Cummings, D.A., 2013. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. BMC Infect. Dis. 13, 446.

Lee, S.J., Si, J., Yun, H.S., Ko, G.P., 2015. Effect of temperature and relative humidity on the survival of foodborne viruses during food storage. Appl. Environ. Microbiol. 81, 2075–2081.

Lee, J. V., Dawson, S.R., Ward, S., Surman, S.B., Neal, K.R., 1997. Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river. Water Sci. Technol. 35, 165–170.

Lees, D., 2010. International standardisation of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish. Food Environ. Virol. 2, 146–155.

Lees, D., 2000. Viruses and bivalve shellfish. Int. J. Food Microbiol. 59, 81–116.

Leknoi, Y., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2017. Assessment of swine-specific bacteriophages of Bacteroides fragilis in swine farms with different antibiotic practices. J. Water Health 15, 251–261.

Leung, K.T., Mackereth, R., Tien, Y.C., Topp, E., 2004. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating Escherichia coli from cattle, pig and human sources. FEMS Microbiol. Ecol. 47, 111–119.

Lévesque, B., Gauvin, D., 2007. Microbiological guideline values for recreational bathing in Canada: Time for change? Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 18, 153–157.

Li, D., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2011. Critical studies on binding-based RT-PCR detection of infectious Noroviruses. J. Virol. Methods 177, 153–159.

Li, X., Huang, R., Chen, H., 2017. Evaluation of Assays to Quantify Infectious Human Norovirus for Heat and High-Pressure Inactivation Studies Using Tulane Virus. Food Environ. Virol. 9, 314–325.

Lin, J., Ganesh, A., 2013. Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses. Int. J. Environ. Health Res. 23, 484–506.

Linden, R., Antunes, M., Heinzelmann, L., Fleck, J., Staggemeier, R., Fabres, R., Vecchia, A., Nascimento, C., Spilki, F., 2015. Caffeine as an indicator of human fecal contamination in the Sinos River: a preliminary study. Brazilian J. Biol. 75, 81–84.

Lodder, W.J., van den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S.A., de Roda Husman, A.M., 2010. Presence of Enteric Viruses in Source Waters for Drinking Water Production in the Netherlands. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5965–5971.

Loeb, T., 1960. Isolation of a bacteriophage specific fot the F+ and Hfr mating types of Escherichia coli K12. Science 131, 932–933.

Loeb, T., Zinder, N.D., 1961. A bacteriophage containing RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 282–289.

Loisy, F., Atmar, R.L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S., 2005a. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. J. Virol. Methods 123, 1–7.

Loisy, F., Atmar, R.L., Le Saux, J.C., Cohen, J., Caprais, M.P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S., 2005b. Use of rotavirus virus-like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6049–6053.

Long, S.C., El-khoury, S.S., Oudejans, S.J.G., Sobsey, M.D., Vinjé, J., Hall, M., 2005. Assessment of Sources and Diversity of Male-Specific Coliphages for Source Tracking. Environ. Eng. Sci. 22, 367–377.

Long, S.C., Sobsey, M.D., 2004. A comparison of the survival of F+RNA and F+DNA coliphages in lake water microcosms. J. Water Health 2, 15–22.

Lopman, B., Reacher, M., van Duijnhoven, Y., Hanon, F.-X., Brown, D., Koopmans, M., 2003. Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995–2000. Emerg. Infect. Dis. 9, 90–96.

Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Gray, J., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K.-O., Torvén, M., von Bonsdorff, C.-H., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szücs, G., Melegh, B., Svennson, L., van Duijnhoven, Y., Koopmans, M., Reacher, M., Brown, D., Iturriza, M., 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. Lancet 363, 682–688.

Loutreul, J., Cazeaux, C., Levert, D., Nicolas, A., Vautier, S., Le Sauvage, A.L., Perelle, S., Morin, T., 2014. Prevalence of Human Noroviruses in Frozen Marketed Shellfish, Red Fruits and Fresh Vegetables. Food Environ. Virol. 6, 157–168.

Love, D.C., Sobsey, M.D., 2007. Simple and Rapid F+ Coliphage Culture, Latex Agglutination, and Typing Assay To Detect and Source Track Fecal Contamination. Appl. Environ. Microbiol. 73, 4110–4118.

Lowther, J.A., Avant, J.M., Gizynski, K., Rangdale, R.E., Lees, D.N., 2010. Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. J. Food Prot. 73, 305–311.

Lowther, J.A., Gustar, N.E., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012a. Comparison of Norovirus RNA Levels in Outbreak-Related Oysters with Background Environmental Levels. J. Food Prot. 75, 389–393.

Lowther, J.A., Gustar, N.E., Powell, A.L., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012b. Two-Year Systematic Study To Assess Norovirus Contamination in Oysters from Commercial Harvesting Areas in the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5812–5817.

Lowther, J.A., Henshilwood, K., Lees, D.N., 2008. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. J. Food Prot. 71, 1427–1433.

Lu, J., Sun, L., Fang, L., Yang, F., Mo, Y., Lao, J., Zheng, H., Tan, X., Lin, H., Rutherford, S., Guo, L., Ke, C., Hui, L., 2015. Gastroenteritis outbreaks caused by norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014–2015. Emerg. Infect. Dis. 21, 1240–1242.

Lucena, F., Lasobras, J., McIntosh, D., Forcadell, M., Jofre, J., 1994. Effect of distance from the polluting focus on relative concentrations of Bacteroides fragilis phages and coliphages in mussels. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2272–2277.

Lucena, F., Méndez, X., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Guerrero, A., Cárdenas, M., Gantzer, C., Shwartzbrood, L., Skraber, S., Jofre, J., 2003. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. J. Appl. Microbiol. 94, 808–815.

Lucena, F., Ribas, F., Duran, A.E., Skraber, S., Gantzer, C., Campos, C., Morón, A., Calderón, E., Jofre, J., 2006. Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. J. Appl. Microbiol. 101, 96–102.

Ma, L., Su, L., Liu, H., Zhao, F., Zhou, D., Duan, D., 2017. Norovirus contamination and the glycosphingolipid biosynthesis pathway in Pacific oyster: A transcriptomics study. Fish Shellfish Immunol. 66, 26–34.

Maalouf, H., Schaeffer, J., Parnaudeau, S., Le Pendu, J., Atmar, R.L., Crawford, S.E., Le Guyader, F.S., 2011. Strain-dependent norovirus bioaccumulation in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 77, 3189–3196.

Maalouf, H., Zakhour, M., Le Pendu, J., Le Saux, J.-C., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2010. Distribution in Tissue and Seasonal Variation of Norovirus Genogroup I and II Ligands in Oysters. Appl. Environ. Microbiol. 76, 5621–5630.

Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R., 2013. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. Food Environ. Virol. 5, 162–168.

Malek, M., Barzilay, E., Kramer, A., Camp, B., Jaykus, L.-A., Escudero-Abarca, B., Derrick, G., White, P., Gerba, C., Higgins, C., Vinje, J., Glass, R., Lynch, M., Widdowson, M.-A., 2009. Outbreak of norovirus infection among river rafters associated with packaged delicatessen meat, Grand Canyon, 2005. Clin. Infect. Dis. 48, 31–37.

Mandilara, G.D., Smeti, E.M., Mavridou, A.T., Lambiri, M.P., Vatopoulos, A.C., Rigas, F.P., 2006. Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. FEMS Microbiol. Lett. 263, 119–26.

Marks, P., Vipond, I., Carlisle, D., Deakin, D., Fey, R., Caul, E., 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. Epidemiol. Infect. 124, 481–487.

Marti, E., Monclús, H., Jofre, J., Rodriguez-Roda, I., Comas, J., Balcázar, J.L., 2011. Removal of microbial indicators from municipal wastewater by a membrane bioreactor (MBR). Bioresour. Technol. 102, 5004–5009.

Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K., Herman, L., van Coillie, E., Uyttendaele, M., Thiry, E., 2012. A Review of Known and Hypothetical Transmission Routes for Noroviruses. Food Environ. Virol. 4, 131–152.

Matsushima, Y., Ishikawa, M., Shimizu, T., Komane, A., Kasuo, S., Shinohara, M., Nagasawa, K., Kimura, H., Ryo, A., Okabe, N., Haga, K., Doan, Y.H., Katayama, K., Shimizu, H., 2015. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from december 2014 to march 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. Euro Surveill. 20, pii=21173.

Mattle, M., Vione, D., Kohn, T., 2015. model and experimental framework to determine the contributions of direct and indirect photoreactions to the solar disinfection of MS2, phiX174 and adenovirus. Environ. Sci. Technol. 334–342.

Mauffret, A., Caprais, M.P., Gourmelon, M.M., 2012. Relevance of Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophages for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5143–5152.

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. Euro Surveill. 14, pii=17435.

McIntyre, L., Galanis, E., Mattison, K., Mykytczuk, O., Buenaventura, E., Wong, J., Prystajecky, N., Ritson, M., Stone, J., Moreau, D., Youssef, A., 2012. Multiple Clusters of Norovirus among Shellfish Consumers Linked to Symptomatic Oyster Harvesters. J. Food Prot. 75, 1715–1720.

McLellan, N.L., Lee, H., Habash, M.B., 2016. Evaluation of propidium monoazide and long-amplicon qPCR as an infectivity assay for coliphage. J. Virol. Methods 238, 48–55.

Mclellan, S.L., Daniels, A.D., Alissa, K., Salmore, A.K., 2003. Genetic Characterization of Escherichia coli Populations from Host Sources of Fecal Pollution by Using DNA Fingerprinting. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2587–2594.

McMinn, B.R., Ashbolt, N.J., Korajkic, A., 2017. Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal. Lett. Appl. Microbiol. 65, 11–26.

McMinn, B.R., Korajkic, A., Ashbolt, N.J., 2014. Evaluation of Bacteroides fragilis GB-124 bacteriophages as novel human-associated faecal indicators in the United States. Lett. Appl. Microbiol. 59, 115–121.

Mcquaig, S., Griffith, J., Harwood, V.J., 2012. Association of fecal indicator bacteria with human viruses and microbial source tracking markers at coastal beaches impacted by nonpoint source pollution. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6423–6432.

McQuaig, S., Noble, R.T., 2011. Viruses as tracers of fecal contamination, in: Hagedorn, C., Blanch, A.R., Harwood, V.J. (Eds.), Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies. pp. 113–135.

Medema, G.J., van Asperen, I.A., Klokman-Houweling, J.M., Nooitgedagt, A., van de Laar, M.J.W., Havelaar, A.H., 1995. The relationships between health effects in triathletes and microbiological quality of freshwater. Water Sci. Technol. 31, 19–26.

Medici, M.C., Tummolo, F., Calderaro, A., Chironna, M., Giammanco, G.M., De Grazia, S., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Chezzi, C., Martella, V., 2015. Identification of the novel Kawasaki 2014 GII.17 human norovirus strain in Italy, 2015. Euro Surveill. 20, pii=30010.

Metcalf, T.G., 1979. Indication of viruses in shellfish growing waters. Am. J. Public Health 69, 1093–1094.

Mieszkin, S., Caprais, M.P., Le Mennec, C., Le Goff, M., Edge, T.A., Gourmelon, M., 2013. Identification of the origin of faecal contamination in estuarine oysters using Bacteroidales and F-specific RNA bacteriophage markers. J. Appl. Microbiol. 115, 897–907.

Miller, A.J., Eblen, B.S., Oser, A., Burkhardt, W., 1998. Application and evaluation of male-specific bacteriophage as a process integrity or faecal contamination indicator in a pork slaughterhouse environment. J. Appl. Microbiol. 85, 898–904.

Ministère de la santé et des solidarités, 2007. Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique. J. Off. République Française. 31, 2180.

Ministère de la santé et des solidarités, 2005. Décret n° 2005-1395 du 10 novembre 2005 modifiant la liste des maladies faisant l'objet d'une transmission obligatoire de données individuelles à l'autorité sanitaire. J. Off. République Française. 263, 17704.

Miyake, T., Haruna, I., Shiba, T., Ito, Y.H., Yamane, K., Watanabe, I., 1971. Grouping of RNA phages based on the template specificity of their RNA replicases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2022–2024.

Miyake, T., Shiba, T., Sakurai, T., Watanabe, I., 1969. Isolation and Properties of Two New RNA Phages SP and FI. Japan J. Microbiol. 13, 375–382.

Mocé-llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-vale, H., Lucena, F., Jofre, J., 2003. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1452–1456.

Montemayor, M., Costan, A., Lucena, F., Jofre, J., Muñoz, J., Dalmau, E., Mujeriego, R., Sala, L., 2008. The combined performance of UV light and chlorine during reclaimed water disinfection. Water Sci. Technol. 57, 935–940.

Moore, D.F., Harwood, V.J., Ferguson, D.M., Lukasik, J., Hannah, P., Getrich, M., Brownell, M., 2005. Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for identification of faecal pollution sources in an urban watershed. J. Appl. Microbiol. 99, 618–628.

Moreno, L., Aznar, R., Sánchez, G., 2015. Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. Int. J. Food Microbiol. 201, 1–6.

Morin, T., Martin, H., Soumet, C., Fresnel, R., Lamaudière, S., Le Sauvage, A.L., Deleurme, K., Maris, P., 2015. Comparison of the virucidal efficacy of peracetic acid, potassium monopersulphate and sodium hypochlorite on bacteriophages P001 and MS2. J. Appl. Microbiol. 119, 655–665.

Mossel, D.A.A., 1983. Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration. Antonie Van Leeuwenhoek 48, 609–611.

Mott, J., Smith, A., 2011. Librairy-dependent source tracking methods, in: Hagedorn, C., Blanch, A.R., Harwood, V.J. (Eds.), Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies. pp. 31–60.

Mounts, A.W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J.S., Noel, J., Glass, R.I., 2000. Cold Weather Seasonality of Gastroenteritis Associated with Norwalk-like Viruses. J. Infect. Dis. 181, S284–S287.

Müller, L., Rasmussen, L.D., Jensen, T., Schultz, A.C., Kjelsø, C., Barnadas, C., Sigsgaard, K., Larsen, A.R., Jensen, C.W., Jeppsen, S., Uhrbrand, K., Hove, N., Mølbak, K., Ethelberg, S., 2016. Series of Norovirus Outbreaks Caused by Consumption of Green Coral Lettuce, Denmark, April 2016. PLoS Curr. 8, 1–15.

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., Ethelberg, S., 2015. Separate norovirus outbreaks linked to one source of imported frozen raspberries by molecular analysis, Denmark, 2010–2011. Epidemiol. Infect. 143, 2299–2307.

Muniain-Mujika, I., Calvo, M., Lucena, F., Girones, R., 2003. Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. Int. J. Food Microbiol. 83, 75–85.

Muniain-Mujika, I., Girones, R., Tofio-Quesada, G., Calvo, M., Lucena, F., 2002. Depuration dynamics of viruses in shellfish. Int. J. Food Microbiol. 77, 125–133.

Muniesa, M., Payan, A., Moce-Llivina, L., Blanch, A.R., Jofre, J., 2009. Differential persistence of F-specific RNA phage subgroups hinders their use as single tracers for faecal source tracking in surface water. Water Res. 43, 1559–1564.

Murata, T., Katsushima, N., Mizuta, K., Muraki, Y., Hongo, S., Matsuzaki, Y., 2007. Prolonged Norovirus Shedding in Infants < 6 Months of Age With Gastroenteritis. Pediatr. Infect. Dis. J. 26, 46–49.

Mushi, D., Byamukama, D., Kivaisi, A.K., 2010. Sorbitol-fermenting Bifidobacteria are indicators of very recent human faecal pollution in streams and groundwater habitats in urban tropical lowlands 8, 466–478.

Myrmel, M., Berg, E.M.M., Rimstad, E., Grinde, B., 2004. Detection of Enteric Viruses in Shellfish from the Norwegian Coast. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2678–2684.

Neish, A., 2013. Investigative trials on the purification of oysters to identify ways of reducing norovirus, Cefas contract report C5224.

Nenonen, N.P., Hannoun, C., Olsson, M.B., Bergström, T., 2009. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. J. Clin. Virol. 45, 105–108.

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., Goh, K.T., 2005. Oyster-associated outbreaks of Norovirus gastroenteritis in Singapore. J. Infect. 51, 413–418.

Noble, R.T., Allen, S.M., Blackwood, A.D., Chu, W., Jiang, S.C., Lovelace, G.L., Sobsey, M.D., Stewart, J.R., Wait, D.A., 2003. Use of viral pathogens and indicators to differentiate between human and non-human fecal contamination in a microbial source tracking comparison study. J. Water Health 1, 195–207.

Nshimyimana, J.P., Cruz, M.C., Thompson, R.J., Wuertz, S., 2017. Bacteroidales markers for microbial source tracking in Southeast Asia. Water Res. 118, 239–248.

Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. J. Virol. Methods 104, 217–225.

Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C., 2010. Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater. Appl. Environ. Microbiol. 76, 8019–8025.

Ogorzaly, L., Gantzer, C., 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: Application to urban raw wastewater. J. Virol. Methods 138, 131–139.

Ogorzaly, L., Tissier, A., Bertrand, I., Maul, A., Gantzer, C., 2009. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. Water Res. 43, 1257–1264.

Oladeinde, A., Bohrmann, T., Wong, K., Purucker, S.T., Bradshaw, K., Brown, R., Snyder, B., Molina, M., 2014. Decay of Fecal Indicator Bacterial Populations and Bovine-Associated Source-Tracking Markers in Freshly Deposited Cow Pats. Appl. Environ. Microbiol. 80, 110–118.

Olalemi, A., Baker-Austin, C., Ebdon, J., Taylor, H., 2016. Bioaccumulation and persistence of faecal bacterial and viral indicators in Mytilus edulis and Crassostrea gigas. Int. J. Hyg. Environ. Health 219, 592–598.

Oogane, T., Hirata, A., Funatogawa, K., Kobayashi, K., Sato, T., Kimura, H., 2008. Food poisoning outbreak caused by norovirus GII/4 in school lunch, Tochigi prefecture, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 61, 423–4.

Osawa, S., Furuse, K., Watanabe, I., 1981. Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. Appl. Environ. Microbiol. 41, 164–168.

Ottoson, J., Hansen, A., Björlenius, B., Norder, H., Stenström, T.A., 2006. Removal of viruses, parasitic protozoa and microbial indicators in conventional and membrane processes in a wastewater pilot plant. Water Res. 40, 1449–1457.

Pan, H., Buenconseja, M., Reineke, K.F., Shieh, Y.C., 2016. Effect of Process Temperature on Virus Inactivation during High Hydrostatic Pressure Processing of Contaminated Fruit Puree and Juice. J. Food Prot. 79, 1517–1526.

Park, J.-A., Kim, S.-B., Lee, C.-G., Lee, S.-H., Choi, J.-W., 2014. Adsorption of bacteriophage MS2 to magnetic iron oxide nanoparticles in aqueous solutions. J. Environ. Sci. Heal. Part A 49, 1116–1124.

Parlement Européen, 2005. Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. J. Off. l'Union Eur. L338, 1–34.

Parlement Européen, 2004. Règlement (CE) n° 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. J. Off. l'Union Eur. L226, 83–127.

Parra, G.I., Green, K.Y., 2015. Genome of Emerging Norovirus GII.17, United States, 2014. Emerg. Infect. Dis. 21, 1477–1479.

Parshionikar, S., Laseke, I., Fout, G.S., 2010. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. Appl. Environ. Microbiol. 76, 4318–4326.

Parshionikar, S.U., Willian-True, S., Fout, G.S., Robbins, D.E., Seys, S.A., Cassady, J.D., Harris, R., 2003. Waterborne Outbreak of Gastroenteritis Associated with a Norovirus. Appl. Environ. Microbiol. 69, 5263–5268.

Parveen, S., Hodge, N.C., Stall, R.E., Farrah, S.R., Tamplin, M.L., 2001. Phenotypic and genotypic characterization of human and nonhuman Escherichia coli. Water Res. 35, 379–386.

Patel, M.M., Hall, A.J., Vinjé, J., Parashar, U.D., 2009. Noroviruses: A comprehensive review. J. Clin. Virol. 44, 1–8.

Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G.T., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J., Muniesa, M., 2005. Method for Isolation of Bacteroides Bacteriophage Host Strains Suitable for Tracking Sources of Fecal Pollution in Water. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5659–5662.

Payment, P., Locas, A., 2011. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. Ground Water 49, 4–11.

Pecson, B.M., Ackermann, M., Kohn, T., 2011. Framework for using quantitative PCR as a nonculture based method to estimate virus infectivity. Environ. Sci. Technol. 45, 2257–2263.

Perkins, T.L., Clements, K., Baas, J.H., Jago, C.F., Jones, D.L., Malham, S.K., McDonald, J.E., 2014. Sediment Composition Influences Spatial Variation in the Abundance of Human Pathogen Indicator Bacteria within an Estuarine Environment. PLoS One 9, e112951.

Pinto, R.M., Costafreda, M.I., Bosch, A., 2009. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7350–7355.

Polo, D., Schaeffer, J., Fournet, N., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., McLeod, C., Le Guyader, F.S., 2016. Digital PCR for Quantifying Norovirus in Oysters Implicated in Outbreaks, France. Emerg. Infect. Dis. 22, 2189–2191.

Polo, D., Varela, M.F., Romalde, J.L., 2015. Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. Int. J. Food Microbiol. 193, 43–50.

Pommepuy, M., Caprais, M.-P., Le Saux, J.-C., Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Madec, Y., Monier, M., Brest, G., Le Guyader, F., 2003. Evaluation of viral shellfish depuration in a semi-professional tank, in: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J.L., Beiras, R. (Eds.), Molluscan Shellfish Safety - Conselleria de Pesca E Assuntos Maritimos Da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela (Spain). pp. 485–499.

Pouillot, R., Van Doren, J.M., Woods, J., Plante, D., Smith, M., Goblick, G., Roberts, C., Locas, A., Hajen, W., Stobo, J., White, J., Holtzman, J., Buenaventura, E., Burkhardt, W., Catford, A., Edwards, R., DePaola, A., Calci, K.R., 2015. Meta-Analysis of the Reduction of Norovirus and Male-Specific Coliphage Concentrations in Wastewater Treatment Plants. Appl. Environ. Microbiol. 81, 4669–4681.

Power, U.F., Collins, J.K., 1990. Elimination of coliphages and Escherichia coli from mussels during depuration under varying conditions of temperature, salinity, and food availability. J. Food Prot. 53, 208–212.

Prato, R., Lopalco, P.L., Chironna, M., Barbuti, G., Germinario, C., Quarto, M., 2004. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. BMC Infect. Dis. 4, 37.

Prodělalová, J., 2012. The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011. Infect. Genet. Evol. 12, 1447–1451.

Pu, J., Kazama, S., Miura, T., Azraini, N.D., Konta, Y., Ito, H., Ueki, Y., Cahyaningrum, E.E., Omura, T., Watanabe, T., 2016. Pyrosequencing Analysis of Norovirus Genogroup II Distribution in Sewage and Oysters: First Detection of GII.17 Kawasaki 2014 in Oysters. Food Environ. Virol. 8, 310–312.

Puig, A., Queralt, N., Jofre, J., Araujo, R., 1999. Diversity of Bacteroides fragilis Strains in Their Capacity To Recover Phages from Human and Animal Wastes and from Fecally Polluted Wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1772–1776.

Qiu, Y., Lee, B.E., Neumann, N., Ashbolt, N., Craik, S., Maal-Bared, R., Pang, X.L., 2015. Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada. J. Appl. Microbiol. 119, 1729–1739.

Queralt, N., Jofre, J., Araujo, R., Muniesa, M., 2003. Homogeneity of the morphological groups of bacteriophages infecting Bacteroides fragilis strain HSP40 and strain RYC2056. Curr. Microbiol. 46, 163–168.

Rachmadi, A.T., Torrey, J.R., Kitajima, M., 2016. Human polyomavirus: Advantages and limitations as a human-specific viral marker in aquatic environments. Water Res. 105, 456–469.

Rački, N., Morisset, D., Gutierrez-Aguirre, I., Ravnikar, M., 2014. One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses. Anal. Bioanal. Chem. 406, 661–667.

Raji, M.I.O., Ibrahim, Y.K.E., Tytler, B.A., Ehinmidu, J.O., 2015. Faecal Coliforms (FC) and Faecal Streptococci (FS) Ratio as Tool for Assessment of Water Contamination: A Case Study of River Sokoto, Northwestern Nigeria. Asia J. Appl. Microbiol. 2, 27–34.

Rajko-Nenow, P., Keaveney, S., Flannery, J., O'Flaherty, V., Doré, W., 2012. Characterisation of norovirus contamination in an Irish shellfishery using real-time RT-qPCR and sequencing analysis. Int. J. Food Microbiol. 160, 105–112.

Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., Macdonald, J., 2016. Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. Water Res. 96, 308–326.

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. Int. J. Food Microbiol. 229, 1–6.

Ravva, S. V, Sarreal, C.Z., 2016. Persistence of F-Specific RNA Coliphages in Surface Waters from a Produce Production Region along the Central Coast of California. PLoS One 11, e0146623.

Ravva, S. V, Sarreal, C.Z., Cooley, M.B., 2015. Male-specific coliphages for source tracking fecal contamination in surface waters and prevalence of Shiga-toxigenic Escherichia coli in a major produce production region of central coast of California. Environ. Sci. Process. Impacts 17, 1249–1256.

Rezaeinejad, S., Vergara, G.G.R. V, Woo, C.H., Lim, T.T., Sobsey, M.D., Gin, K.Y.H., 2014. Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. Water Res. 58, 122–131.

Richards, G.P., 1988. Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. J. Food Prot. 51, 218–251.

Richards, G.P., McLeod, C., Le Guyader, F.S., 2010. Processing Strategies to Inactivate Enteric Viruses in Shellfish. Food Environ. Virol. 2, 183–193.

Rockx, B., de Wit, M., Vennema, H., Vinjé, J., de Bruin, E., van Duynhoven, Y., Koopmans, M., 2002. Natural History of Human Calicivirus Infection: A Prospective Cohort Study. Clin. Infect. Dis. 35, 246–253.

Rodriguez, R.A., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2009. Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples. Appl. Environ. Microbiol. 75, 297–307.

Rönnqvist, M., Aho, E., Mikkelä, A., Ranta, J., Tuominen, P., Rättö, M., Maunula, L., 2014. Norovirus transmission between hands, gloves, utensils, and fresh produce during simulated food handling. Appl. Environ. Microbiol. 80, 5403–5410.

Rosario, K., Symonds, E.M., Sinigalliano, C., Stewart, J., Breitbart, M., 2009. Pepper Mild Mottle Virus as an Indicator of Fecal Pollution. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7261–7267.

Rumnieks, J., Tars, K., 2017. Crystal Structure of the Maturation Protein from Bacteriophage Q?? J. Mol. Biol. 429, 688–696.

Rusiñol, M., Fernandez-Cassi, X., Hundesa, A., Vieira, C., Kern, A., Eriksson, I., Ziros, P., Kay, D., Miagostovich, M., Vargha, M., Allard, A., Vantarakis, A., Wyn-Jones, P., Bofill-Mas, S., Girones, R., 2014. Application of human and animal viral microbial source tracking tools in fresh and marine waters from five different geographical areas. Water Res. 59, 119–129.

Sakurai, T., Miyake, T., Shiba, T., Watanabe, I., 1968. Isolation of a possible fourth group of RNA phage. Jpn. J. Microbiol. 12, 544–546.

Salter, R.S., Durbin, G.W., Conklin, E., Rosen, J., Clancy, J., 2010. Proposed modifications of environmental protection agency method 1601 for detection of coliphages in drinking water, with same-day fluorescence-based detection and evaluation by the performance-based measurement system and alternative test protocol validation approaches. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7803–7810.

Salyers, A.A., 1984. Bacteroides of the Human Lower Intestinal Tract. Annu. Rev. Microbiol. 38, 293–313.

Sánchez-Nazario, E.E., Santiago-Rodriguez, T.M., Toranzos, G.A., 2014. Prospective epidemiological pilot study on the morbidity of bathers exposed to tropical recreational waters and sand. J. Water Health 12, 220–229.

Sánchez, G., Pinto, R.M., Vanaclocha, H., Bosch, A., Sanchez, G., Pinto, R.M., Vanaclocha, H., Bosch, A., 2002. Molecular Characterization of Hepatitis A Virus Isolates from a Transcontinental Shellfish-Borne Outbreak. J. Clin. Microbiol. 40, 4148–4155.

Sano, D., Ohta, T., Nakamura, A., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Okabe, S., 2015. Culture-independent evaluation of nonenveloped-virus infectivity reduced by free-chlorine disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 81, 2819–2826.

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. Environ. Sci. Technol. 44, 808–812.

Santo Domingo, J.W., Bambic, D.G., Edge, T.A., Wuertz, S., 2007. Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. Water Res. 41, 3539–3552.

Savill, M.G., Murray, S.R., Scholes, P., Maas, E.W., McCormick, R.E., Moore, E.B., Gilpin, B.J., 2001. Application of polymerase chain reaction (PCR) and TaqMan PCR techniques to the detection and identification of Rhodococcus coprophilus in faecal samples. J. Microbiol. Methods 47, 355–368.

Savini, G., Casaccia, C., Barile, N.B., Paoletti, M., Pinoni, C., 2009. Norovirus in bivalve molluscs: a study of the efficacy of the depuration system. Vet. Ital. 45, 535–539.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne Illness Acquired in the United States - Major Pathogens. Emerg. Infect. Dis. 17, 7–15.

Schaeffer, J., Le Saux, J.-C., Lora, M., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2013. Norovirus contamination on French marketed oysters. Int. J. Food Microbiol. 166, 244–248.

Schaper, M., Duran, A.E., Jofre, J., 2002a. Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3702–3707.

Schaper, M., Jofre, J., Uys, M., Grabow, W.O.K., 2002b. Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. J. Appl. Microbiol. 92, 657–667.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J. Appl. Microbiol. 113, 1014–1026.

Schriewer, A., Wehlmann, A., Wuertz, S., 2011. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. J. Microbiol. Methods 85, 16–21.

Schwab, K.J., Neill, F.H., Estes, M.K., Metcalf, T.G., Atmar, R.L., 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. J. Food Prot. 61, 1674–1680.

Schwartz, S., Vergoulidou, M., Schreier, E., Loddenkemper, C., Reinwald, M., Schmidt-Hieber, M., Flegel, W.A., Thiel, E., Schneider, T., 2011. Norovirus gastroenteritis causes severe and lethal complications after chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. Blood 117, 5850–5856.

Schwartzbrod, L., 2000. Virus humains et santé publique : Conséquences de l'utilisation des eaux usées et des boues en agriculture et conchyliculture.

Scott, T.M., Jenkins, T.M., Lukasik, J., Rose, J.B., Keys, F., 2005. Potential Use of a Host Associated Molecular Marker in Enterococcus faecium as an Index of Human Fecal Pollution. Environ. Sci. Technol. 39, 283–287.

Scott, T.M., Parveen, S., Portier, K.M., Rose, J.B., Tamplin, M.L., Farrah, S.R., Koo, A., Lukasik, J., 2003. Geographical Variation in Ribotype Profiles of Escherichia coli Isolates from Humans, Swine, Poultry, Beef, and Dairy Cattle in Florida. Appl. Environ. Microbiol. 69, 1089–1092.

Scott, T.M., Rose, J.B., Jenkins, T.M., Farrah, S.R., Lukasik, J., 2002. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5796–5803.

Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L., 2011. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. Appl. Environ. Microbiol. 77, 6884–6888.

Severi, E., Verhoef, L., Thornton, L., Guzman-Herrador, B., Faber, M., Sundqvist, L., Rimhanen-Finne, R., Roque-Afonso, A., Ngui, S., Allerberger, F., Baumann-Popczyk, A., Muller, L., Parmakova, K., Alfonsi, V., Tavoschi, L., Vennema, H., Fitzgerald, M., Myrmel, M., Gertler, M., Ederth, J., Kontio, M., Vanbockstael, C., Mandal, S., Sadkowska-Todys, M., Tosti, M., Schimmer, B., O'Gorman, J., Stene-Johansen, K., Wenzel, J., Jones, G., Balogun, K., Ciccaglione, A., O'Connor, L., Vold, L., Takkinen, J., Rizzo, C., 2015. Large and prolonged food-borne multistate hepatitis A outbreak in Europe associated with consumption of frozen berries, 2013 to 2014. Euro Surveill. 20, pii=21192.

Shahrampour, D., Yavarmanesh, M., Habibi Najafi, M.B., Mohebbi, M., 2015. Application of F+RNA Coliphages as Source Tracking Enteric Viruses on Parsley and Leek Using RT-PCR. Food Environ. Virol. 7, 381–389.

Shanks, O.C., Kelty, C.A., Oshiro, R., Haugland, R.A., Madi, T., Brooks, L., Field, K.G., Sivaganesan, M., 2016. Data Acceptance Criteria for Standardized Human-Associated Fecal Source Identification Quantitative Real-Time PCR Methods. Appl. Environ. Microbiol. 82, 2773–2782.

Shieh, Y. -S. C., Monroe, S.S., Fankhauser, R.L., Langlois, G.W., Burkhardt, W., Baric, R.S., 2000. Detection of Norwalk-like Virus in Shellfish Implicated in Illness. J. Infect. Dis. 181, S360–S366.

Shieh, Y.C., Khudyakov, Y.E., Xia, G., Ganova-Raeva, L.M., Khambaty, F.M., Woods, J.W., Veazey, J.E., Motes, M.L., Glatzer, M.B., Bialek, S.R., Fiore, A.E., 2007. Molecular confirmation of oysters as the vector for hepatitis A in a 2005 multistate outbreak. J. Food Prot. 70, 145–150.

Shin, G., Sobsey, M.D., 1998. Reduction Of Norwalk Virus , Poliovirus 1 And Coliphage MS2 By Monochloramine Disinfection Of Water. Water Sci. Technol. 38, 151–154.

Shin, G., Sobsey, M.D., Hill, C., Carolina, N., 2003. Reduction of Norwalk Virus , Poliovirus 1 , and Bacteriophage MS2 by Ozone Disinfection of Water 69, 3975–3978.

Sidhu, J.P.S., Ahmed, W., Gernjak, W., Aryal, R., McCarthy, D., Palmer, A., Kolotelo, P., Toze, S., 2013. Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. Sci. Total Environ. 463–464, 488–496.

Sigler, V., Pasutti, L., 2006. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate Escherichia coli populations in secondary environments. Environ. Microbiol. 8, 1703–1711.

Simonet, J., 2007. Inactivation et dégradation du génome des bactériophages ARN F-spécifiques et du Poliovirus 1 par le rayonnement ultraviolet (Thèse Universitaire).

Simonet, J., Gantzer, C., 2006. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7671–7677.

Skraber, S., Gantzer, C., Maul, A., Schwartzbrod, L., 2002. Fates of bacteriophages and bacterial indicators in the Moselle river (France). Water Res. 36, 3629–3637.

Skraber, S., Gassilloud, B., Gantzer, C., 2004. Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3644–3649.

Smith, K.C., Inns, T., Decraene, V., Fox, A., Allen, D.J., Shah, A., 2017. An outbreak of norovirus GI-6 infection following a wedding in North West England. Epidemiol. Infect. 145, 1239–1245.

Snow, J., 1855. On the mode of communication of cholera - Second Edition. John Churchill, New Burlington Street, London.

Soller, J.A., Eftim, S., Wade, T.J., Ichida, A.M., Clancy, J.L., Johnson, T.B., Schwab, K., Ramirez-Toro, G., Nappier, S., Ravenscroft, J.E., 2016. Use of quantitative microbial risk assessment to improve interpretation of a recreational water epidemiological study. Microb. Risk Anal. 1, 2–11.

Soller, J.A., Schoen, M.E., Bartrand, T., Ravenscroft, J.E., Ashbolt, N.J., 2010. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. Water Res. 44, 4674–4691.

Springthorpe, S., Sattar, S.A., 2007. Virus Removal During Drinking Water Treatment, in: Bosch, A. (Ed.), Human Virus in Water : Perspectives in Medical Virology. Elsevier, pp. 109–126.

Stewart-Pullaro, J., Daugomah, J.W., Chestnut, D.E., Graves, D.A., Sobsey, M.D., Scott, G.I., 2006. F+ RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters. J. Appl. Microbiol. 101, 1015–1026.

Stoeckel, D.M., Harwood, V.J., 2007. Performance, Design, and Analysis in Microbial Source Tracking Studies. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2405–2415.

Straub, T.M., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Valentine, N.B., Dohnalkova, A., Ozanich, R.M., Bruckner-Lea, C.J., Call, D.R., 2011. Human Norovirus Infection of Caco-2 Cells Grown as a 3-Dimensional Tissue Structure. J. Water Health 9, 225–240.

Straub, T.M., Hutchison, J.R., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Valentine, N.B., Dohnalkova, A., Ozanich, R.M., Bruckner-Lea, C.J., 2013. Defining cell culture conditions to improve human norovirus infectivity assays. Water Sci. Technol. 67, 863–868.

Suffredini, E., Lanni, L., Arcangeli, G., Pepe, T., Mazzette, R., Ciccaglioni, G., Croci, L., 2014. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy. Int. J. Food Microbiol. 184, 21–26.

Sun, P., Tyree, C., Huang, C.H., 2016. Inactivation of Escherichia coli, Bacteriophage MS2, and Bacillus Spores under UV/H2O2 and UV/Peroxydisulfate Advanced Disinfection Conditions. Environ. Sci. Technol. 50, 4448–4458.

Sundram, A., Donnelly, L., Ehlers, M.M., Vrey, A., Grabow, W.O.K., W, B.I., 2002. Evaluation of F-RNA coliphages as indicators of viruses and the source of faecal pollution. Water SA Spec Ed WISA Proc, 86–91.

Suttle, C.A., 2005. Viruses in the sea. Nature 437, 356–361.

Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., De Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteijn, B., Koopmans, M., 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. J. Clin. Microbiol. 45, 1389–1394.

Symonds, E.M., Young, S., Verbyla, M.E., McQuaig-Ulrich, S.M., Ross, E., Jiménez, J.A., Harwood, V.J., Breitbart, M., 2017. Microbial source tracking in shellfish harvesting waters in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. Water Res. 111, 177–184.

Syngouna, V.I., Chrysikopoulos, C. V., 2017. Inactivation of MS2 bacteriophage by titanium dioxide nanoparticles in the presence of quartz sand with and without ambient light. J. Colloid Interface Sci. 497, 117–125.

Takanashi, S., Saif, L.J., Hughes, J.H., Meulia, T., Jung, K., Scheuer, K.A., Wang, Q., 2014. Failure of propagation of human norovirus in intestinal epithelial cells with microvilli grown in three-dimensional cultures. Arch. Virol. 159, 257–266.

Tallon, P., Magajna, B., Lofranco, C., Leung, K.T., 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water : A current perspective. Water. Air. Soil Pollut. 166, 139–166.

Tartera, C., Jofre, J., 1987. Bacteriophages active against Bacteroides fragilis in sewage-polluted waters. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1632–1637.

Tartera, C., Lucena, F., Jofre, J., 1989. Human Origin of Bacteroides fragilis Bacteriophages Present in the Environment. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2696–2701.

Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: How infectious is it? J. Med. Virol. 80, 1468–1476.

Tian, P., Bates, A.H., Jensen, H.M., Mandrell, R.E., 2006. Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. Lett. Appl. Microbiol. 43, 645–651.

Tian, P., Engelbrektson, A.L., Jiang, X., Zhong, W., Mandrell, R.E., 2007. Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. J. Food Prot. 70, 2140–2147.

Toropova, K., Basnak, G., Twarock, R., Stockley, P.G., Ranson, N.A., 2008. The three-dimensional structure of genomic RNA in bacteriophage MS2: implications for assembly. J. Mol. Biol. 375, 824–36.

Tree, J.A., Adams, M.R., Lees, D.N., 2003. Chlorination of Indicator Bacteria and Viruses in Primary Sewage Effluent Chlorination of Indicator Bacteria and Viruses in Primary Sewage Effluent. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2038–2043.

Tung-Thompson, G., Libera, D.A., Koch, K.L., de los Reyes, F.L., Jaykus, L.-A., 2015. Aerosolization of a Human Norovirus Surrogate, Bacteriophage MS2, during Simulated Vomiting. PLoS One 10, e0134277.

Twort, F.W., 1915. An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses. Lancet 186, 1241–1243.

Ueki, Y., Shoji, M., Suto, A., Tanabe, T., Okimura, Y., Kikuchi, Y., Saito, N., Sano, D., Omura, T., 2007. Persistence of caliciviruses in artificially contaminated oysters during depuration. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5698–5701.

United Nations, 2015. Resolution adopted by the General Assembly on 25 September 2015 - Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development.

US EPA, 2016. 2016 Coliphage Experts Workshop: Discussion Topics and Findings. Office of Water. EPA 823-F-16F001 2016–2017.

US EPA, 2015. Review of Coliphages As Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality - 820-R-15-098.

US EPA, 2006. National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule. EPA-HQ-OW-2002-0061.

US EPA, 2005. Microbial Source Tracking Guide Document. U. S. Environ. Prot. Agency EPA/600/R-05/064.

US EPA, 2001a. Method 1601 : Detection of Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-Step Enrichment Procedure. Washington, D.C., USA.

US EPA, 2001b. Method 1602 : Male-specific (F +) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure. Washington, D.C., USA.

Valegård, K., Liljas, L., Fridborg, K., Unge, T., 1990. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. Nature 345, 36–41.

Valentine, R., Strand, M., 1965. Complexes of F-pili and RNA bacteriophage. Science 148, 511–513.

van Asperen, I.A., Medema, G., Borgdorff, M.W., Sprenger, M.J.W., Havelaar, A.H., 1998. Risk of gastroenteritis among triathletes in relation to faecal pollution of fresh waters. Int. J. Epidemiol. 27, 309–315.

van den Berg, H., Lodder, W., van der Poel, W., Vennema, H., De Roda Husman, A.M., 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. Res. Microbiol. 156, 532–540.

Vantarakis, A., Papapetropoulou, M., 1999. Detection of enteroviruses, adenoviruses and hepatitis A viruses in raw sewage and treated effluents by nested-PCR. Water. Air. Soil Pollut. 114, 85–93.

Vaughn, J.M., Metcalf, T.G., 1975. Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising estuarine waters. Water Res. 9, 613–616.

Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Shirley, S.H., Lee, D., Vinjé, J., 2014. Genotypic and Epidemiologic Trends of Norovirus Outbreaks in the United States, 2009 to 2013. J. Clin. Microbiol. 52, 147–155.

Venegas, C., Diez, H., Blanch, A.R., Jofre, J., Campos, C., 2015. Microbial source markers assessment in the Bogota River basin (Colombia). J. Water Health 13, 801–810.

Verbyla, M.E., Mihelcic, J.R., 2014. A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. Water Res. 71, 107–124.

Vergara, G.G.R.V., Goh, S.G., Rezaeinejad, S., Chang, S.Y., Sobsey, M.D., Gin, K.Y.H., 2015. Evaluation of FRNA coliphages as indicators of human enteric viruses in a tropical urban freshwater catchment. Water Res. 79, 39–47.

Viancelli, A., Garcia, L.A.T., Kunz, A., Steinmetz, R., Esteves, P.A., Barardi, C.R.M., 2012. Detection of circoviruses and porcine adenoviruses in water samples collected from swine manure treatment systems. Res. Vet. Sci. 93, 538–543.

Vinje, J., Oudejans, S.J.G., Stewart, J.R., Sobsey, M.D., Long, S.C., 2004. Molecular Detection and Genotyping of Male-Specific Coliphages by Reverse Transcription-PCR and Reverse Line Blot Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 70, 5996–6004.

von Schirnding, Y.E.R., Kfir, R., Cabelli, V., Franklin, L., Joubert, G., 1992. Morbidity among bathers exposed to polluted seawater. South African Med. J. 81, 543–546.

Wade, T.J., Sams, E., Brenner, K.P., Haugland, R., Chern, E., Beach, M., Wymer, L., Rankin, C.C., Love, D., Li, Q., Noble, R., Dufour, A.P., 2010. Rapidly measured indicators of recreational water quality and swimming-associated illness at marine beaches: a prospective cohort study. Environ. Heal. 9, 66.

Watanabe, I., Miyake, T., Sakurai, T., SHIBA, T., OHNO, T., 1967. Isolation and grouping of RNA phages. Proc. Jpn. Acad. 43, 204–209.

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., Hall, G., 2007. Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia. Clin. Infect. Dis. 44, 1026–1031.

Wengert, S.L., Aw, T.G., Ryser, E.T., Rose, J.B., 2017. Postharvest Reduction of Coliphage MS2 from Romaine Lettuce during Simulated Commercial Processing with and without a Chlorine-Based Sanitizer. J. Food Prot. 80, 220–224.

Wexler, H.M., 2007. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. Clin. Microbiol. Rev. 20, 593–621.

White, P.A., 2014. Evolution of norovirus. Clin. Microbiol. Infect. 20, 741–745.

WHO, 2004. Water, Sanitation and Hygiene Links to Health - Facts and Figures. Geneva.

WHO, 1979. Human viruses in water, wastewater and soil, World Health Organization - Technical Report Series.

WHO, FAO, 2008. Viruses in food : scientific advice to support risk management activities - Meeting report.

WHO, OECD, 2003. World Health Organization & Organisation for Economic Co-operation and Development - Assessing Microbial Safety of Drinking Water. OECD Publishing.

Wicki, M., Auckenthaler, A., Felleisen, R., Karabulut, F., Niederhauser, I., Tanner, M., Baumgartner, A., 2015. Assessment of source tracking methods for application in spring water. J. Water Health 13, 473–488.

Wicki, M., Auckenthaler, A., Felleisen, R., Liniger, M., Loutre, C., Niederhauser, I., Tanner, M., Baumgartner, A., 2012. Improved detection of Rhodococcus coprophilus with a new quantitative PCR assay. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 2161–2169.

Widdowson, M.-A., Sulka, A., Bulens, S.N., Beard, R.S., Chaves, S.S., Hammond, R., Salehi, E.D.P., Swanson, E., Totaro, J., Woron, R., Mead, P.S., Bresee, J.S., Monroe, S.S., Glass, R.I., 2005. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. Emerg. Infect. Dis. 11, 95–102.

Wiggins, B.A., Alexander, M., 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 49, 19–23.

Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., Kohn, T., 2012. Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. Environ. Sci. Technol. 46, 12069–12078.

Wilkes, G., Edge, T., Gannon, V., Jokinen, C., Lyautey, E., Medeiros, D., Neumann, N., Ruecker, N., Topp, E., Lapen, D.R., 2009. Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, Cryptosporidium oocysts, Giardia cysts, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape. Water Res. 43, 2209–2223.

Winter, R.B., Gold, L., 1983. Overproduction of bacteriophage Qβ maturation (A2) protein leads to cell lysis. Cell 33, 877–885.

Wolf, S., Hewitt, J., Greening, G.E., 2010. Viral Multiplex Quantitative PCR Assays for Tracking Sources of Fecal Contamination. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1388–1394.

Wolf, S., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., Greening, G.E., 2008. Detection and characterization of F+ RNA bacteriophages in water and shellfish: application of a multiplex real-time reverse transcription PCR. J. Virol. Methods 149, 123–128.

Wong, K., Fong, T.-T., Bibby, K., Molina, M., 2012. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. Environ. Int. 45, 151–64.

Woods, J.W., Calci, K.R., Marchant-Tambone, J.G., Burkhardt, W., 2016. Detection and molecular characterization of norovirus from oysters implicated in outbreaks in the US. Food Microbiol. 59, 76–84.

Woody, M. a, Cliver, D.O., 1997. Replication of coliphage Q beta as affected by host cell number, nutrition, competition from insusceptible cells and non-FRNA coliphages. J. Appl. Microbiol. 82, 431–40.

Woody, M. a, Cliver, D.O., 1995. Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q beta. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1520–6.

Wu, J., Cao, Y., Young, B., Yuen, Y., Jiang, S., Melendez, D., Gri, J.F., Stewart, J.R., 2016. Decay of Coliphages in Sewage-Contaminated Freshwater: Uncertainty and Seasonal E ff ects.

Wu, J., Long, S.C., Das, D., Dorner, S.M., 2011. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. J. Water Health 9, 265.

Wyer, M.D., Wyn-jones, A.P., Kay, D., Au-yeung, H.C., Maria, A., Husman, D.R., Rutjes, S., Lo, J., Schneider, O., 2012. Relationships between human adenoviruses and faecal indicator organisms in European recreational waters 6.

Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R., Höller, C., de Roda Husman, A.M., Kay, D., Kozyra, I., López-Pila, J., Muscillo, M., José Nascimento, M.S., Papageorgiou, G., Rutjes, S., Sellwood, J., Szewzyk, R., Wyer, M., 2011. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. Water Res. 45, 1025–1038.

Yahya, M., Hmaied, F., Jebri, S., Jofre, J., Hamdi, M., 2015. Bacteriophages as indicators of human and animal fecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. J. Appl. Microbiol. 118, 1217–1225.

Yang, Y., Griffiths, M.W., 2013. Comparative persistence of subgroups of F-specific RNA phages in river water. Appl. Environ. Microbiol. 79, 4564–4567.

Yates, M. V, 2007. Classical Indicators in the 21st Century—Far and Beyond the Coliform. Water Environ. Res. 79, 279–286.

Yazdi, M., Yavarmanesh, M., Bahreini, M., Mohebbi, M., 2017. Preliminary Source Tracking of Male-Specific (F+) RNA Coliphage on Lettuce as a Surrogate of Enteric Viruses Using Reverse Transcription-PCR. Food Environ. Virol. 9, 103–113.

Yezli, S., Otter, J.A., 2011. Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. Food Environ. Virol. 3, 1–30.

Yu, Y., Cai, H., Hu, L., Lei, R., Pan, Y., Yan, S., Wang, Y., 2015. Molecular epidemiology of oyster-related human noroviruses and their global genetic diversity and temporal-geographical distribution from 1983 to 2014. Appl. Environ. Microbiol. 81, 7615–7624.

Zanetti, F., De Luca, G., Sacchetti, R., Stampi, S., 2007. Disinfection efficiency of peracetic acid (PAA): inactivation of coliphages and bacterial indicators in a municipal wastewater plant. Environ. Technol. 28, 1265–71.

Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.-Q., Wei, C.L., Soh, S.W.L., Hibberd, M.L., Liu, E.T., Rohwer, F., Ruan, Y., 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. PLoS Biol. 4, e3.

Zinder, N.D., Valentine, R.C., Roger, M., Stoeckenius, W., 1963. f1, a Rod-shaped male-specific bacteriophage that contains DNA. Virology 20, 638–640.

Zomer, T.P., De Jong, B., Kühlmann-Berenzon, S., Nyrén, O., Svenungsson, B., Hedlund, K.O., Ancker, C., Wahl, T., Andersson, Y., 2010. A foodborne norovirus outbreak at a manufacturing company. Epidemiol. Infect. 138, 501–506.

LISTE DES PUBLICATIONS

Hartard C., Leclerc M., Rivet R., Maul A., Loutreul J., Banas S., Boudaud N., Gantzer C., F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as indicators for the evaluation of the virological quality of oysters. (*in press Appl. Environ. Microbiol.*)

Hartard C., Banas S., Rivet R., Boudaud N., Gantzer C., 2017. Rapid and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: Application to marketed products. **Food Micro** 63 : 248-254.

Hartard C., Banas S., Loutreul J., Rincé A., Benoit F., Boudaud N., Gantzer C., 2016. Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters. **Appl Environ Microbiol** 82 : 5709-5719.

Hartard C., Rivet R., Banas S., Gantzer C., 2015. Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins. **Appl Environ Microbiol** 81 : 6505-6515.

LISTE DES COMMUNICATIONS ([1]ORALES ET [2]AFFICHEES)

[1] **Hartard C., 2016**. The use of bacteriophages as viral pollution indicators in the environment. **3rd International Congress Microbial Biotechnology for Development MICROBIOD3**, Mohammedia, Morocco. Dépot légal 2016MO3962, ISBN 978-9954-38-547-0.

[1] **Hartard C., Banas S., Loutreul J., Rivet R., Boudaud N., Gantzer C., 2016**. F-Specific RNA Bacteriophages as Tools to Assess Norovirus Hazard in Water and Shellfish : A Case Study. **5th Food and Environmental Virology Conference**, Kusatzu, Japan.

[2] **Hartard C., Rivet R., Banas S., Gantzer C., 2016**. Diversités génétiques des bactériophages ARN F-spécifiques : Application pour discriminer l'origine d'une pollution fécale. **Ateliers scientifiques de l'Institut Carnot Energie et Environnement en Lorraine** (ICEEL), Nancy, France.

[1] **Hartard C., Banas S., Gantzer C., 2016**. Devenir des bactériophages ARN F-spécifiques durant le traitement des eaux usées urbaines et leur potentiel comme indicateurs de pollution virale dans l'environnement. **Journées scientifiques de la Zone Atelier du Bassin de la Moselle** (ZAM), Nancy, France.

[2] **Hartard C., Rivet R., Banas S., Bellanger X., Gantzer C., 2015**. Genetic diversity of F-Specific RNA Bacteriophages isolated from urban and animal waste as a tool for tracking the origin of fecal pollution. **Colloque Interactions Phages-bactéries**, Montpellier, France.

[1] **Hartard C., Rivet R., Banas S., Gantzer C., 2014**. Tracking the origin of fecal pollution using F-specific RNA phages genotyping. **17th Saar-Lor-Lux Virus Workshop**, Nancy, France.

RESUME

Les virus entériques sont à l'origine de pathologies liées au péril fécal et dans l'état actuel des connaissances, la recherche des indicateurs de pollution fécale conventionnels (*i.e. Escherichia coli*, entérocoques) peut s'avérer inefficace pour évaluer le danger viral. La définition d'autres indicateurs pour gérer le danger lié à la présence des virus entériques dans les matrices hydriques et alimentaires est aujourd'hui nécessaire. Parmi eux, les bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH) présentent plusieurs intérêts. Ces virus d'origine entérique sont présents en quantité importante dans les eaux usées. Très proches des virus entériques en termes de structure, ces microorganismes présentent l'avantage d'être facilement cultivables. Ils sont enfin souvent étudiés pour déterminer l'origine d'une pollution fécale (*i.e.* humaine ou animale). Certaines limites leur sont cependant fréquemment associées, que ce soit en termes de corrélation avec les pathogènes entériques ou concernant leur potentiel pour discriminer l'origine d'une pollution. Dans ce contexte, l'objectif du travail présenté ici était de préciser l'intérêt des FRNAPH en tant qu'indicateurs de pollution fécale mais aussi en tant qu'indicateurs de pollution virale dans l'environnement et les coquillages. Ces travaux ont permis dans un premier temps d'améliorer la capacité des FRNAPH à identifier les contaminations d'origine humaine. Nos résultats soulignent par ailleurs la plus-value apportée par la recherche des FRNAPH en cas de pollution fécale massive, en particulier si on s'intéresse à la contamination des coquillages. En effet, contrairement aux indicateurs bactériens, l'accumulation des FRNAPH ainsi que leur persistance dans ces aliments est très comparable à celles des virus entériques (*i.e.* norovirus). Enfin, en utilisant des méthodes de détection comparables, une forte corrélation entre la présence des FRNAPH d'origine humaine et celle des norovirus a été observée dans les coquillages. Compte tenu de ces résultats, une méthode de détection assurant la détection sensible des FRNAPH infectieux d'origine humaine dans différents types de matrices hydriques ou alimentaires (*e.g.* eaux de surface, fruits de mer, fruits rouges, salades) est proposée pour améliorer la gestion du danger viral.

MOTS CLES : Bactériophages ARN F-spécifiques, pollution virale, suivi des sources de pollution, qualité de l'eau, sécurité alimentaire.

ABSTRACT

Enteric viruses are a leading cause of fecal-oral route transmitted diseases and currently, conventional fecal indicator bacteria (*i.e. Escherichia coli*, enterococcus) fail to assess this kind of hazard. In this context, the use of more efficient indicators to assess the hazard linked to viruses in water or foodstuff is required. F-specific RNA bacteriophages (FRNAPH) present numerous benefits for this purpose. Of enteric origin, these viruses are found in high concentrations in wastewater. Sharing many structural similarities with pathogenic enteric viruses, FRNAPH are easily cultivable and their potential to track the origin of the pollution is also often investigated. However, some limits are still associated with these indicators, regarding to their ability to track the origin of the pollution or concerning the lack of correlation with pathogens. In this context, the aim of this work was to make clear the potential of FRNAPH as fecal and as viral indicators in environmental waters and shellfish. As a first step, their ability to track human pollution was optimized. In addition, our results underlined the gains bringing by FRNAPH detection, especially when focusing on shellfish microbiological quality management. Indeed, unlike fecal indicator bacteria, the accumulation of FRNAPH and their persistence in shellfish have been found to be close to that of enteric viruses (*i.e.* norovirus). Furthermore, when using comparable methods for their detection, high correlation was observed between human FRNAPH and norovirus in shellfish. Taking into account these observations, a sensitive method allowing the detection of infectious FRNAPH of human origin was developed to improve viral hazard management in water and food commodities (*e.g.* environmental waters, shellfish, soft fruits, leaf).

KEYWORDS : F-specific RNA bacteriophages, fecal pollution, viral pollution, microbial source tracking, water quality, food safety.