HAL open science

Conséquences des interactions entre les virus entériques humains et la matière organique sur la persistance virale, l'efficacité de traitements de désinfection et l'évolution des populations virales

Prunelle Waldman

To cite this version:

Prunelle Waldman. Conséquences des interactions entre les virus entériques humains et la matière organique sur la persistance virale, l'efficacité de traitements de désinfection et l'évolution des populations virales. Biodiversité et Ecologie. Université Paris-Est, 2019. Français. NNT : 2019PESC0096 . tel-03467933

HAL Id: tel-03467933

https://theses.hal.science/tel-03467933v1

Submitted on 6 Dec 2021

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 PARIS-EST

École doctorale : Science, Ingénierie et Environnement

Thèse de doctorat

Mention Sciences et Techniques de l'Environnement

Conséquences des interactions entre les virus entériques humains et la matière organique sur la persistance virale, l'efficacité de traitements de désinfection et l'évolution des populations virales

Prunelle WALDMAN

Directrice	:	Françoise LUCAS	(Université Paris-Est Créteil)
Co-directrice	:	Patricia ALBANESE	(Université Paris-Est Créteil)
Encadrants	:	Laurent MOULIN	(Eau de Paris)
		Sébastien WURTZER	(Eau de Paris)

Date de soutenance : 25 Novembre 2019

Rapporteurs : **Docteur Gaël BELLIOT (Centre National de Référence des virus des gastro-entérites)**

Professeur Pierre LE CANN (École des Hautes Études en Santé Publique)

Examinateurs : **Docteur Valérie CARO (Institut Pasteur)**

Professeur Tamar KOHN (École Polytechnique Fédérale de Lausanne)

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du département de Recherche et Développement de la Direction de la Recherche, du Développement et de la Qualité de l'Eau d'Eau de Paris, en association avec le Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains (UMR MA 102), dont je tiens à remercier les directeurs respectifs, Alban Robin et Régis Moilleron.

J'adresse mes remerciements à Gaël Belliot, Ingénieur de recherche au Centre National de Référence des virus des gastro-entérites, ainsi qu'à Pierre Le Cann, Professeur de l'École des Hautes Études en Santé Publique, qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également, Valérie Caro, Responsable du Pôle de Génotypage des Pathogènes de l'Institut Pasteur, et Tamar Kohn, Professeur associée à l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne, qui ont aussi accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Michael Dubow et Gilles Varrault. Je remercie spécialement Gilles qui a rendu possible toute une partie de ce travail sur la matière organique. Je remercie également Christophe Rodriguez du CHU Henri Mondor, ainsi que Valérie Caro et Véronique Hourdel de l'Institut Pasteur pour leurs conseils concernant le séquençage.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Françoise Lucas pour ses conseils et sa disponibilité. Merci, Françoise, de m'avoir proposé de travailler sur ce sujet de thèse il y a trois ans. Je remercie également ma co-directrice de thèse, Patricia Albanese.

Laurent, je te remercie profondément de ta confiance et de l'accueil que tu m'as réservé dans ton équipe. Merci d'avoir été si disponible et accessible malgré un emploi du temps souvent dense. Merci aussi d'avoir été toujours prompt à partager tes connaissances. Faire partie de la R&D biologie a été une grande chance pour moi, et une expérience privilégiée pour découvrir de l'intérieur l'univers de l'eau potable dont les enjeux sont si importants.

Sébastien, si je devais être exhaustive dans mes remerciements ce manuscrit serait beaucoup trop épais. Sans toi ce travail n'aurait pu voir le jour, ni aboutir, j'en suis convaincue. Merci de m'avoir consacré tant d'heures pour partager tes connaissances et tes idées, m'orienter et m'aider, avec un désir de transmettre et une patience résistant à toute épreuve. Au-delà de la sphère scientifique et professionnelle, je souhaite me souvenir longtemps de tes conseils, ta bienveillance et ton humour.

Merci Élise pour ton optimisme, tes conseils, ainsi que pour toutes les discussions plus ou moins sérieuses que nous avons pu avoir. Merci aussi pour les centaines de kilomètres que nous avons parcourus ensemble le midi, qui ont fortement contribué à maintenir un certain équilibre physique et moral ! Cela a été une chance de rencontrer une personne courageuse, persévérante et droite telle que toi. Je te souhaite de belles réussites pour la fin de ta thèse.

Je remercie les autres membres de la R&D biologie. Merci, Sophie, pour tes encouragements. Merci, Marion, pour toute ton aide et ta gentillesse. Merci, Heberte, pour ta capacité à voir toujours la vie du bon côté. J'ai grandement apprécié travailler à vos côtés.

Je remercie aussi tous membres de la R&D Process Chimie. Merci de ton soutien, Guillaume, et d'avoir partagé ta passion de la course. Jacques, merci de ton aide sur les spectres de fluorescence. Merci, Xavier, de ta bonne humeur expressive. Merci aussi à Guillaume et Patrick, du 4ème. Nolwenn, je te souhaite une très bonne continuation pour la poursuite de ta thèse.

J'aimerais également remercier Carole pour sa gentillesse inaltérable et pour son aide précieuse concernant bien des aspects administratifs.

Enfin, je n'ai pas de mot pour remercier suffisamment profondément mes parents, mon frère et mon futur mari de leur soutien inconditionnel.

Table des matières

Liste des figures I
Liste des tableaux III
Liste des abréviations IV

Introduction 1
1. Les virus entériques humains à transmission hydrique 3
1.1. Les virus entériques 3
1.1.1. Généralités 3
1.1.2. Manifestations cliniques et épidémiologie des principaux virus entériques 5
1.1.3. Structure des virus entériques 7
1.2. Les épidémies de gastro-entérites virales d'origine hydrique 11
1.2.1. Généralités 11
1.2.2. Importance de la voie hydrique comme mode de transmission 12
1.2.3. Epidémies de gastro-entérites virales liées à l'eau de distribution 12
1.3. Contamination des ressources 18
1.3.1. Origines de la contamination 18
1.3.2. Ressources superficielles et contamination virale 20
1.3.3. Ressources souterraines et contamination virale 24
1.4. Le risque sanitaire lié à la présence de virus entériques dans l'eau de consommation 26
1.4.1. Généralités 26
1.4.2. Cadre règlementaire 26
1.4.3. L'évaluation quantitative du risque sanitaire 27
1.4.4. Mesure de l'effet sanitaire 30
1.4.5. Limites actuelles d'évaluation du risque sanitaire 31
1.5. Conclusion 32
2. Inactivation des virus entériques humains dans les milieux hydriques 33
2.1. Généralités 33
2.2. Modèles viraux de substitution 34
2.3. Persistance dans les environnements hydriques 36
2.3.1. Eau souterraine 36
2.3.2. Eau de surface 38
2.3.3. Facteurs environnementaux affectant l'inactivation virale dans les ressources en eau 38

2.4. Traitements d'inactivation 41
2.4.1. Généralités 41
2.4.2. Méthodes d'étude des mécanismes d'inactivation 43
2.4.3. Inactivation thermique 45
2.4.4. Rayons ultra-violets 52
2.4.5. Chlore 57
2.4.6. Dioxyde de chlore 62
2.4.7. Ozone 64
2.4.8. Conclusion sur les méthodes d'inactivation 68
2.5. Phénomènes impactant l'efficacité des traitements 69
2.5.1. Effets synergiques 69
2.5.2. Déviation par rapport au modèle d'inactivation log-linéaire 69
2.5.3. Adaptation des virus aux traitements 71
2.6. Conclusion 73
3. Interactions des virus entériques humains dans leurs environnements 74
3.1. Généralités 74
3.2. Interactions avec le microbiote intestinal et pathogénèse 74
3.2.1. Types d'interactions 74
3.2.2. Entérovirus 76
3.2.3. Norovirus 78
3.2.4. Réovirus 79
3.2.5. Autres virus entériques 80
3.2.6. Effet stabilisateur des interactions virus -microbiote *in vitro* 80
3.3. Interactions dans les milieux hydriques 82
3.3.1. Généralités 82
3.3.2. Les virus entériques en milieu hydrique 82
3.3.3. Concept de double couche électrique 83
3.3.4. Agrégation 84
3.3.5. Adsorption aux particules 88
3.3.6. Interactions avec d'autres micro-organismes 92
3.4. Impact des interactions sur le transport, la persistance et l'élimination des virus 93
3.4.1. Transport 93
3.4.2. Persistance dans l'environnement 94
3.4.3. Élimination 95
3.5. Conclusion 97

Objectifs de la thèse 99
Matériel et méthodes 101
1. Cellules, virus et quantification du titre viral 101
2. Pré-incubation avec des composés organiques 102
3. Traitements d'inactivation 106
4. Particle stability thermal release assay (PASTRY) 108
5. Microscopie électronique à transmission 108
6. Expérience d'évolution par sélection thermique 109
Chapitre 1 : Conséquences des interactions entre des entérovirus et des composés microbiens sur l'efficacité des traitements d'inactivation.....115
Chapitre 2 : Effet de la matière organique dissoute sur la persistance virale.....137
Chapitre 3 : Conséquences des interactions virus-matière organique sur l'adaptation d'un entérovirus à un stress thermique 167
Discussion générale et conclusion 188
Références.....197

Liste des figures

Figure 1 : Quelques virus entériques observés par microscopie électronique à transmission. Rotavirus (Glass *et al.*, 2009), Norovirus (Kapikian *et al.*, 1972), Poliovirus (Goldsmith and Miller, 2009), VHE (CDC/PHIL #5605), Adénovirus (Valentine and Pereira, 1965), Aichivirus (Yamashita *et al.*, 1991), Astrovirus (Bosch *et al.*, 2014) 8

Figure 2 : Structure d'un entérovirus (ici le PV). (A) Schéma de l'agencement des protéines VP1, VP2 et VP3 et des axes de symétrie (2, 3 et 5). (B) Modélisation de la surface de la capside. Issu de Jiang *et al.*(2014).....9

Figure 3 : Organisation du génome des entérovirus et maturation de la polyprotéine. Issu de Jiang *et al.*2014. 10

Figure 4 : Cycle de transmission des virus entériques dans l'environnement hydrique. Les flèches pointillées symbolisent les transferts accidentels. Adapté de Schwartzbrod (1991) et Faou (2012). 11

Figure 5 : Origine de la contamination dans les cas d'épidémies liées à l'eau de distribution depuis 2000 reportés ci-dessous (n = 49 208 cas). 13

Figure 6 : Facteurs influençant la migration et la persistance des virus dans le sol et l'eau souterraine. Issue de Azadpour-Keeley *et al.* (2003).....24

Figure 7 : Objectifs de performance de traitement pour le rotavirus en fonction du niveau de revenu et de la qualité de l'eau brute (d'après (OMS, 2017)).....31

Figure 8 : Abattement journalier de virus entériques humains (●) et modèles (○) dans des eaux souterraines incubées en laboratoire à différentes températures. 37

Figure 9 : Filière de production d'eau potable à partir d'eau de surface : exemple de l'usine d'Orly (d'après une communication interne, Eau de Paris) 42

Figure 10 : Avantage d'une désinfection multi-barrières : doses de chlore et d'UV permettant des abattements respectifs de 3 log et 4 log de micro-organismes pathogènes, et spectre d'efficacité aux doses recommandées par l'OMS (issu de Ireland *et al.*(2011)). 43

Figure 11 : Abattement de quelques virus entériques ou modèles, inactivé pendant 10 min à 45 °C, 55 °C ou 65 °C dans du PBS (d'après Leifels *et al.*(2015)). 48

Figure 12 : Abattement de virus entériques ou modèles à différentes températures et en fonction du temps, dans de l'eau ou un tampon salin (données issues du Tableau 9) 48

Figure 13 : Diagramme de distribution des espèces du chlore en fonction du pH à 25 °C (Ghernaout, 2018) 58

Figure 14 : Types de courbes de désinfection. La courbe linéaire correspond au modèle de Chick-Watson (issu de Jensen *et al.*(2010)).....70

Figure 15 : Sélection naturelle des virus entériques due à la désinfection de l'eau (adapté de Rachmadi *et al.*(2018a)).....73

Figure 16 : Le LPS favorise la fixation du poliovirus aux cellules cibles en augmentant l'affinité du poliovirus pour son récepteur PVR. D'après Karst *et al.*(2016) et Robinson *et al.*(2014a).....77

Figure 17 : Influence du microbiote intestinal sur le processus infectieux du norovirus (d'après (Sullender and Baldridge, 2018)).....79

Figure 18 : Stabilisation du poliovirus par le LPS. Le LPS augmente la thermostabilité et la résistance au chlore du poliovirus en favorisant la stabilité et l'intégrité de la capside (d'après Karst (2016)).....81

Figure 19 : Schéma de la double couche électrique au voisinage des virus et autres colloïdes électronégatifs......84

Figure 20 : Observation par microscopie électronique de particules de PV après dilution dans du PBS (a ; x 24 800) ou de l'eau distillée (b ; x 29 000). Issu de (Floyd and Sharp, 1979).....85

Figure 21 : Principe de la séparation des particules individualisées et agrégées par ultracentrifugation (*single particle approximation test*) réalisée par Young et Sharp (1977)......87

Figure 22 : Schéma général du principe de DLS (A) et étapes de l'analyse des mesures (B). Issu de Mainard et Jacob (2016)......87

Figure 23 : Effets de la matière organique dissoute sur l'adsorption des virus à une surface. 91

Figure 24 : Inactivation d'une suspension de PV1 contenant des agrégats par un désinfectant chimique. D'après les observations de Young et Sharp (1977) schématisées par Gerba et Betancourt (2017)**.**.....96

Figure 25 : Exemple d'interactions pouvant affecter le transport, la persistance et l'inactivation des virus entériques dans les milieux hydriques.....98

Figure 26 : Protocole de purification et de fractionnement de la matière organique dissoute présente dans les échantillons d'eau de rivière. Issue de Pernet-Coudrier *et al. (*2011)......105

Figure 27 : Populations virales issues de la sélection thermique 109

Figure 28 : Étapes de la stratégie de séquençage 112

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux virus entériques humains susceptibles d'être transmis par voie hydrique.....4
Tableau 2 : Épidémies impliquant des virus entériques liées à une contamination des ressources.....14
Tableau 3 : Épidémies impliquant des virus entériques liées à un dysfonctionnement de traitement.15
Tableau 4 : Épidémie impliquant des virus entériques liées à une anomalie du système de distribution 16
Tableau 5 : Fréquence de détection et concentration des virus entériques dans les eaux de surface. 22
Tableau 6 : Limites et références de qualité (paramètres microbiologiques) décrites dans l'arrêté du 11 janvier 2007 27
Tableau 7 : Doses infectieuses minimales de quelques virus entériques.....29
Tableau 8 : Exemples de méthodes utilisées pour l'étude des mécanismes moléculaires d'inactivation virale 44
Tableau 9 : Inactivation des virus entériques et de virus modèles par traitement thermique, mesurée par culture.....47
Tableau 10 : Doses de rayons UV requises pour une inactivation (mesurée par culture) de 1 log (90 %) à 4 log (99,99 %) de virus entériques et modèles au moyen de lampes monochromatiques (254 nm) dans de l'eau ou un tampon salin.....54
Tableau 11 : Doses de chlore (CT) nécessaires pour un abattement d'infectivité de 2 log (99 %) et 4 log (99,99 %) de virus entériques et modèles, dans de l'eau ou un tampon salin.....59
Tableau 12 : Doses de dioxyde de chlore (CT) nécessaires pour un abattement d'infectivité de 2 log (99 %) de virus entériques et modèles 63
Tableau 13 : Doses d'ozone (CT) nécessaires pour un abattement d'infectivité de 2 log (99 %) de virus entériques et modèles.....66
Tableau 14 : Récapitulatif des mécanismes de différentes méthodes d'inactivation sur un modèle de phage (MS2) et un modèle de virus humain (PV1), et doses approximatives permettant un abattement de 2 log d'infectivité du PV 68
Tableau 15 : Interactions directes entre des virus entériques et des bactéries du système digestif....75
Tableau 16 : Points isoélectriques estimés de quelques virus entériques.....83
Tableau 17 : Principales méthodes ayant été utilisées pour étudier l'agrégation virale.....86
Tableau 18 : Composés organiques commerciaux 103
Tableau 19 : Origine et composition des échantillons d'eau de rivière.....105
Tableau 20 : Amorces et sondes de RT-qPCR pour la quantification des entérovirus.....111

Tableau 21 : Principaux outils utilisés sur Galaxy 114

Liste des abréviations

ADN	:	Acide désoxiribonucléique
ARN	:	Acide ribonucléique
CV-B5	:	Coxsackievirus B5
db	:	Double brin
DIM	:	Dose infectieuse minimale
DLS	:	Diffusion dynamique de la lumière
DNOM	:	Matière organique naturelle dissoute
FCV	:	Calicivirus félin
FRNAPH	:	Bactériophage ARN F-spécifique
GEA	:	Gastroentérite aiguë
HAdV	:	Adénovirus humain
HAstV	:	Astrovirus humain
HBGA	:	Antigènes de groupes sanguins tissulaires
LPS	:	Lipopolysaccharide
MNV	:	Norovirus murin
MO	:	Matière organique
MOD	:	Matière organique dissoute
MPN	:	Nombre de plus probable
NGS	:	Séquençage nouvelle génération
NoV	:	Norovirus
PBS	:	Tampon phosphate salin
PCR	:	Réaction de polymérisation en chaîne
PFU	:	Unité formant plaque
PG	:	Peptidoglycane
pHi	:	Point isoélectrique
PMMOV	:	Virus de la marbrure bénigne du piment
PV	:	Poliovirus
PVR	:	Récepteur du poliovirus
QMRA	:	Analyse quantitative du risque microbiologique sanitaire
RV	:	Rotavirus
sb	:	Simple brin
STEU	:	Station de traitement des eaux usées
$TCID_{50}$	:	Dose infectieuse 50 %
VHA	:	Virus de l'hépatite A
VHE	:	Virus de l'hépatite E
VLP	:	Pseudo-particule virale

Introduction

Les virus entériques humains sont les principaux agents étiologiques des gastro-entérites infectieuses, qui sont des maladies très communes touchant tous les pays. Dans les pays à faible niveau socio-économique, les gastro-entérites virales ont un taux de morbidité élevé chez les populations vulnérables et causent de nombreux décès, en particulier chez les jeunes enfants. Selon les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) plus de 200 000 enfants décèdent chaque année des suites d'une gastro-entérite virale (Stuempfig and Seroy, 2019). Dans les pays les plus industrialisés, les infections par les virus entériques sont le plus souvent bénignes et les symptômes se résolvent en trois jours. Elles sont néanmoins associées à une diminution de la qualité de vie et probablement des décès prématurés chez les populations les plus sensibles. De plus, elles engendrent un coût socio-économique important lié aux dépenses de santé et à la diminution de productivité. À l'échelle mondiale, les infections à norovirus engendrent chaque année 4,2 milliards de dollars de dépenses liées aux soins médicaux, et 60,3 milliards de dollars attribuables à la perte de productivité (Bartsch *et al.*, 2016). En France, les coûts directs liés au rotavirus seraient d'environ 44 millions d'euros. Si des cas isolés peuvent survenir, les gastro-entérites virales se manifestent le plus souvent sous forme d'épidémies. Les virus entériques sont des virus à transmission oro-fécale qui peuvent en effet induire de nombreux cas après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, et se propager de personne à personne dans les collectivités. La voie hydrique est un mode de transmission particulièrement important dans les pays dont les infrastructures sanitaires et l'accès à l'eau potable sont insuffisants. Dans les autres pays, les infections liées à l'ingestion d'eau contaminée sont minoritaires en comparaison avec la transmission de personne à personne, mais ne sont toutefois pas exceptionnelles.

Le cycle des virus entériques comprend deux grandes phases : la première est une phase d'infection et de réplication au sein de l'hôte, tandis que la seconde correspond à une phase de persistance plus ou moins longue dans l'environnement avant d'atteindre éventuellement un nouvel hôte. Depuis le début des années 2010, des études ont mis en évidence l'existence d'interactions, entre certains virus entériques (entérovirus, norovirus) et le microbiote intestinal, ayant un rôle crucial pour la pathogénicité de ces virus. Certains auteurs supposent même que les processus d'évolution et d'adaptation auraient conduit les virus entériques à mettre à leur profit la présence du microbiote intestinal pour favoriser, via des interactions physiques, leur stabilité dans le système digestif de l'hôte ainsi que le processus infectieux. La transmission indirecte des virus entériques, dont celle par voie hydrique, implique qu'ils puissent persister suffisamment longtemps et résister

aux différentes conditions environnementales rencontrées. Les interactions des virus entre eux sous forme d'agrégats peuvent favoriser leur persistance et leur résistance aux traitements de désinfection mis en place dans les usines de production d'eau potable. De plus, à l'image des interactions avec le microbiote intestinal qui confèreraient à certains virus un avantage sélectif en termes de persistance et de pathogénicité, des interactions entre les microbiomes, et plus généralement la matière organique présents dans l'environnement, pourraient conférer à certains virus un avantage pour maintenir leur potentiel infectieux dans l'environnement ou au cours des traitements de désinfection.

1. Les virus entériques humains à transmission hydrique

1.1. Les virus entériques

1.1.1. Généralités

Il existe plus de 140 sérotypes de virus entériques pouvant infecter l'homme, et de nouveaux types sont découverts chaque année (Haas, 2014). Ces virus sont transmis par voie orale et pénètrent dans un organisme hôte au niveau du tractus gastro-intestinal où ils se répliquent en grand nombre. Certains virus peuvent ensuite migrer vers un site de multiplication extra-intestinal comme cela se produit lors des hépatites virales. Dans les cas symptomatiques, les infections se traduisent généralement par des gastro-entérites. Toutefois, une proportion conséquente des infections est asymptomatique (Gallimore *et al.*2004 ; Kapusinszky, Minor, et Delwart 2012). Selon une méta-analyse regroupant des données issues de 81 études, la prévalence des infections asymptomatiques à norovirus serait en moyenne de 7 % (Qi *et al.*, 2018). Cependant cette prévalence est particulièrement élevée chez les enfants, dépassant parfois 30 % (Marques Mendanha de Oliveira *et al.*2014 ; García *et al.*2006). De même, jusqu'à 29 % des enfants de moins d'un an seraient des excréteurs asymptomatiques de rotavirus (Amar *et al.*, 2007). La période d'incubation des virus entériques est généralement de l'ordre d'un à cinq jours (Lee *et al.*, 2013) à l'exception des virus des hépatites A et E pour lesquels les signes cliniques apparaissent deux à six semaines après infection.

Les virus entériques humains partagent de nombreux points communs. Ce sont des pathogènes à transmission oro-fécale excrétés dans les selles ou les vomissements en très grand nombre, jusqu'à 10^{12} particules par gramme (Haas *et al.*2014) ; ils ont généralement une faible dose infectieuse, moins de 100 particules pouvant être suffisantes pour initier une infection (ce nombre dépend du virus et de l'immunité individuelle) (Yezli and Otter, 2011) ; ils sont de petites tailles, les plus volumineux ne dépassant pas 110 nm ; ils sont non enveloppés, ce qui les rends particulièrement résistants dans le milieu extérieur et face aux traitements de désinfection. Malgré ces caractéristiques communes, les virus entériques regroupent un ensemble hétérogène de virus appartenant à des familles distinctes issues de trois groupes selon la classification de Baltimore (basée sur le type d'acide nucléique). Les principaux virus entériques susceptibles d'être transmis par voie hydrique sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Principaux virus entériques humains susceptibles d'être transmis par voie hydrique (ADN : acide désoxyribonucléique ; ARN : acide ribonucléique ; sb/db : simple brin/double brin)

Famille	Genre	Espèce	Nombre de génotypes humains	Taille (nm)	Type de génome	Taille du génome (Kb)	Références
Adenoviridae	Mastadenoviridae	Adénovirus	68 (une faible proportion est responsable de gastroentérites)	70 à 110	ADN db	36	(Smith *et al.*, 2010)
Astroviridae	Mamastrovirus	Astrovirus	8	28 à 35	ARN sb (+)	6,8 à 7,9	(Pérot *et al.*, 2017)
Caliciviridae	Norovirus	Norovirus humain	GI (9), GII (22), GIV (1), GVI (1)	27 à 35	ARN sb (+)	7,5 à 7,7	(Nasheri *et al.*, 2017)
	Sapovirus	Sapovirus humain	GI (7), GII (7), GIV (1), GV (2)	30 à 38	ARN sb (+)	7,1 à 7,7	(Oka *et al.*, 2015)
Hepeviridae	Orthohepevirus	Virus de l'hépatite E	8	27 à 34	ARN sb (+)	7,2 à 7,4	(Himmelsbach *et al.*, 2018)
Picornaviridae	Cosavirus	Cosavirus A, B, C, D, E, F	> 30	30	ARN sb (+)	7,6	(Yu *et al.*, 2017)
	Enterovirus	EV-A	18	27 à 30	ARN sb (+)	7,2 à 8,5	(Tapparel *et al.*, 2013)
		EV-B	57				
		EV-C	23				
		EV-D	3				
	Hepatovirus	Virus de l'hépatite A	3	27	ARN sb (+)	7,5	(Cristina and Costa-Mattioli, 2007)
	Kubovirus	Virus Aichi	3	30	ARN sb (+)	8,3	(Ambert-Balay *et al.*, 2008)
	Parechovirus	Parechovirus humain	16	30	ARN sb (+)	7,3	(Lodder *et al.*, 2013)
	Salivirus	Salivirus	1	30	ARN sb (+)	8,0	(Ng *et al.*, 2016)
Reoviridae	Rotavirus	Rotavirus A	35 types G et 50 types P	80	ARN db	18,5	(Sadiq *et al.*, 2018)

1.1.2. Manifestations cliniques et épidémiologie des principaux virus entériques

La période d'incubation varie de quelques heures à quelques jours, voire quelques semaines dans le cas des virus des hépatites A (VHA) et E (VHE). Dans les cas symptomatiques, des infections par les virus entériques, autres que le VHA et VHE, sont généralement des vomissements, des diarrhées et des douleurs abdominales, pouvant être accompagnés de fièvre, frissons, myalgies et maux de tête. Ces manifestations cliniques disparaissent le plus souvent en quelques jours. Toutefois, les virus entériques peuvent être associés à une grande variété de maladies dont la sévérité, qui peut conduire au décès, dépend de l'espèce virale et de l'état de santé des individus. Les cas les plus graves concernent généralement les populations particulièrement sensibles qui sont les plus jeunes, les plus âgés ainsi que les sujets immunodéprimés. L'infection peut en effet gagner des sites extra-intestinaux ou devenir systémique. Les norovirus peuvent par exemple induire des atteintes rénales ou cardiaques (Cardemil *et al.*, 2017). Les sujets immunodéprimés infectés par les adénovirus peuvent développer des méningo-encéphalites et des néphrites, et des symptômes neurologiques (Khanal *et al.*, 2018). Des encéphalites ont par ailleurs été reportées suite à des infections par des astrovirus (Corcoran *et al.*, 2014). Dans les cas les plus sérieux, les entérovirus sont à l'origine de méningites, encéphalites, poliomyélites ou myocardites. Dans certains cas, comme cela a été démontré pour les rotavirus, l'infection peut être systémique (Candy, 2007). Enfin, les virus entériques participeraient à l'étiologie de maladies chroniques, et seraient ainsi associés à certains cas de cardiomyopathie, de myopathie inflammatoire, de sclérose latérale amyotrophique (Bruu, 2002), ou encore de diabète insulino-dépendant (Crawford *et al.*, 2017; Laitinen *et al.*, 2014) et de fatigue chronique (Chia and Chia, 2008).

Les virus les plus fréquemment associés aux gastro-entérites virales sont les norovirus, les rotavirus et les entérovirus. Les norovirus sont la première cause de gastroentérite tous âges confondus. Ils sont responsables chaque année d'environ 677 millions de cas et de plus de 200 000 décès, la plupart parmi les enfants de moins de cinq ans dans les pays à faibles ressources (Pires *et al.*, 2015). Dans les pays à revenu moyen ou élevé on estime qu'il y a entre 2000 et 13 000 décès, en majorité parmi les plus de 65 ans qui sont la population la plus à risque (Lindsay *et al.*, 2015). Seuls les génogroupes GI, GII et GIV comportent des génotypes capables d'infecter l'homme. Le génotype GII.4, en particulier, est responsable de la majorité de cas (Glass *et al.*, 2009) et cause plus de 90 % des cas sporadiques de gastroentérite aigüe chez les enfants (Hoa Tran *et al.*, 2013). Les rotavirus sont la première cause de gastroentérite chez les jeunes enfants, le groupe A étant le plus courant et le plus répandu. Les rotavirus sont à l'origine de plus de 40 % des hospitalisations liées à des diarrhées dans le monde et sont responsables chaque année de plus 200 000 décès, dont 90 % sont des enfants dans les pays en développement d'Afrique et d'Asie du Sud (Bányai *et al.*, 2018). Le

nombre de cas est néanmoins en déclin depuis l'introduction d'un vaccin antirotavirus en 2006 (Sindhu *et al.*, 2017).

Les autres virus entériques listés dans le Tableau 1 sont responsables d'une proportion plus faible des gastro-entérites virales. Les gastro-entérites d'origine adénovirale touchent surtout les enfants de moins de cinq ans, et impliquent les adénovirus appartenant au type F (HAdV-40 et HAdV-41) (Khanal *et al.*, 2018; Lennon *et al.*, 2007). De même, les infections par les astrovirus concernent en grande majorité les enfants, chez qui HAstV-1 et HAstV-2 sont les sérotypes plus fréquemment retrouvés (Matsui and Greenberg, 2001; Palombo and Bishop, 1996). Les infections sont peu fréquentes chez les adultes et impliquent les sérotypes 4 à 8 (Carter, 2005).

Les VHA et VHE provoquent, après deux à six semaines d'incubation, une inflammation aigüe du foie se manifestant par souvent un ictère, de la fatigue et de la fièvre. Le plus souvent les symptômes disparaissent en quelques semaines. Dans de rares cas, l'hépatite peut être fulminante et mettre en jeu le pronostic vital (Waqar and Koirala, 2019; Wiktor, 2017). Le VHE est le premier agent étiologique d'hépatite aigüe chez les adultes en bonne santé, mais est particulièrement dangereux pour certaines catégories de populations et notamment les femmes enceintes, dont il augmente de 25 % le taux de mortalité pendant les trois derniers mois de grossesse (Himmelsbach *et al.*, 2018). Chaque année, les VHA et VHE sont à eux deux responsables d'environ 4,7 millions d'infections symptomatiques, causant respectivement plus de 7000 et 44000 décès (WHO, 2017). L'eau contaminée est le mode de transmission majeur du VHE, qui cause des épidémies principalement en Afrique et en Asie. Un vaccin contre l'un des génotypes a été mis au point mais son efficacité n'est pas encore suffisamment documentée pour qu'il soit recommandé par l'OMS (Wiktor, 2017).

Il est à noter que quelques virus entériques sont à transmission zoonotique. C'est notamment le cas des génotypes 3 et 4 du VHE qui peuvent également infecter les suidés. De plus, les animaux domestiques peuvent être un réservoir de rotavirus transmissibles à l'Homme. Les souches de rotavirus animales et humaines partagent en effet de nombreuses caractéristiques génétiques et antigéniques (Cook *et al.*, 2004; Dóró *et al.*, 2015).

1.1.3. Structure des virus entériques

1.1.3.1. Structure générale

Les virus entériques sont constitués d'une capside protéique protégeant un génome de type ARN simple brin, ARN double brin ou ADN double brin, linéaire ou segmenté (rotavirus). Ce sont des virus nus dépourvus d'enveloppe, mais certains comme le VHE et le VHA existent également à l'état pseudo-enveloppé (Rivera-Serrano *et al.*, 2019; Yin *et al.*, 2016). Leur structure est icosaédrique bien que certains comme les rotavirus puissent apparaître sphériques par microscopie électronique en raison d'une densité élevée de spicules à la surface de la capside. La microscopie électronique à transmission, opérationnelle à partir de 1931, a été la première technologie permettant d'observer des virus déjà connus et d'en découvrir de nouveaux sur la base de caractéristiques morphologiques. Quelques clichés représentant différents virus entériques sont présentés sur la Figure 1. En complément, des expériences de dissociation ménagée, des analyses stœchiométriques, de l'électrophorèse, puis la spectrométrie de masse ont permis d'étudier la composition des capsides (Smith *et al.*, 2010). Les structures des virus ont par la suite été obtenues par cryo-microscopie électronique, cristallographie aux rayons X, puis résonance magnétique nucléaire, permettant d'atteindre une résolution quasi atomique de l'ordre de 3 Å (Cifuente *et al.*, 2013; Desselberger, 2014; Nemerow *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 1999). L'hexon, l'une des trois protéines de capside des adénovirus, est d'ailleurs la première protéine d'un virus humain à avoir été cristallisée (Pereira *et al.*, 1968).

Les capsides des virus entériques sont des structures multimériques constituées d'un petit nombre de protéines structurales différentes, les protomères, répétées en grand nombre. Le nombre de protéines structurales principales différentes varie selon les virus d'un (VHE, rotavirus) à six (rotavirus). Quelques virus (astrovirus, adénovirus, rotavirus, norovirus) présentent à leur surface des spicules qui participent à la reconnaissance et à la liaison avec certains récepteurs cellulaires. Par exemple les rotavirus interagissent via les spicules avec différents récepteurs dont les antigènes tissulaires de groupe sanguin (*Histo-blood group antigens* ou HBGA) (Hu *et al.*, 2012), et les fibres des adénovirus ont une forte affinité pour le récepteur CAR (*Coxsackievirus and adenovirus receptor*) (El Bakkouri *et al.*, 2008).

La capside des virus non enveloppés est à l'interface avec l'environnement extérieur et joue un rôle clé dans de nombreuses étapes indispensables au cycle infectieux : protection du génome et persistance dans et hors de l'hôte, reconnaissance des récepteurs, internalisation dans les cellules, décapsidation et encapsidation en sont quelques exemples. Ces travaux de thèse on tout particulièrement porté sur des virus du genre *Enterovirus* dont la structure est détaillée dans la section suivante.

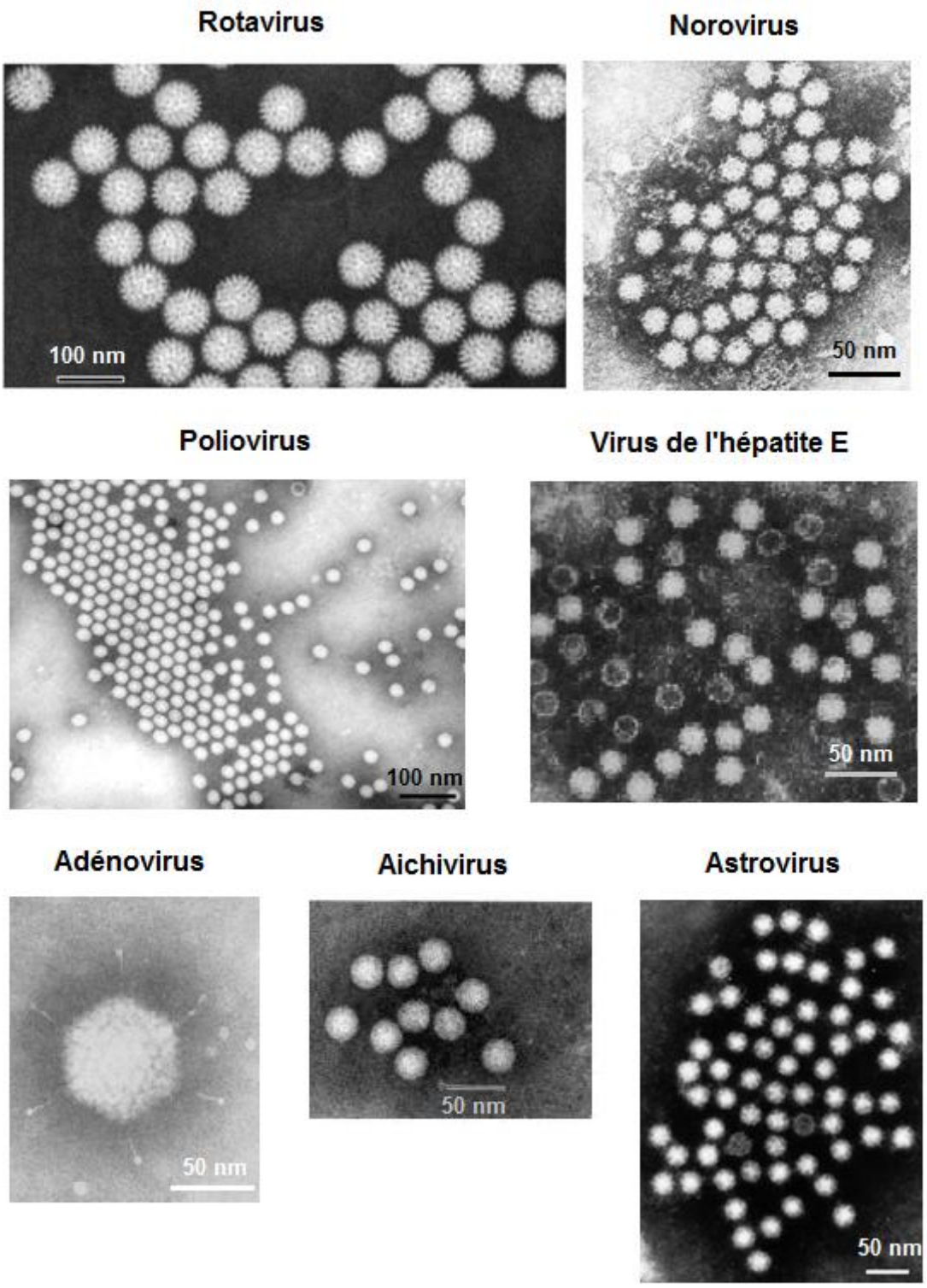


Figure 1 : Quelques virus entériques observés par microscopie électronique à transmission. Rotavirus (Glass *et al.*, 2009), Norovirus (Kapikian *et al.*, 1972), Poliovirus (Goldsmith and Miller, 2009), VHE (CDC/PHIL #5605), Adénovirus (Valentine and Pereira, 1965), Aichivirus (Yamashita *et al.*, 1991), Astrovirus (Bosch *et al.*, 2014)

1.1.3.2. Structure des entérovirus

La capside des entérovirus est composée de 60 copies de quatre polypeptides nommés VP1 à VP4 formant une structure icosaédrique (vingt faces) possédant des axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 (Figure 2). La structure principale est formée par les protéines VP1 à VP3. Chacune de ces trois protéines est organisée en huit feuillets β antiparallèles connectés par des boucles plus variables qui portent les principaux sites antigéniques de neutralisation. La protéine VP4 est localisée sur la face interne de la capside, mais peut être transitoirement accessible, même à température physiologique (Jiang *et al.*, 2014). La classification des entérovirus en différentes espèces repose sur des critères phylogénétiques basés sur la partie du génome codant les des protéines structurales.

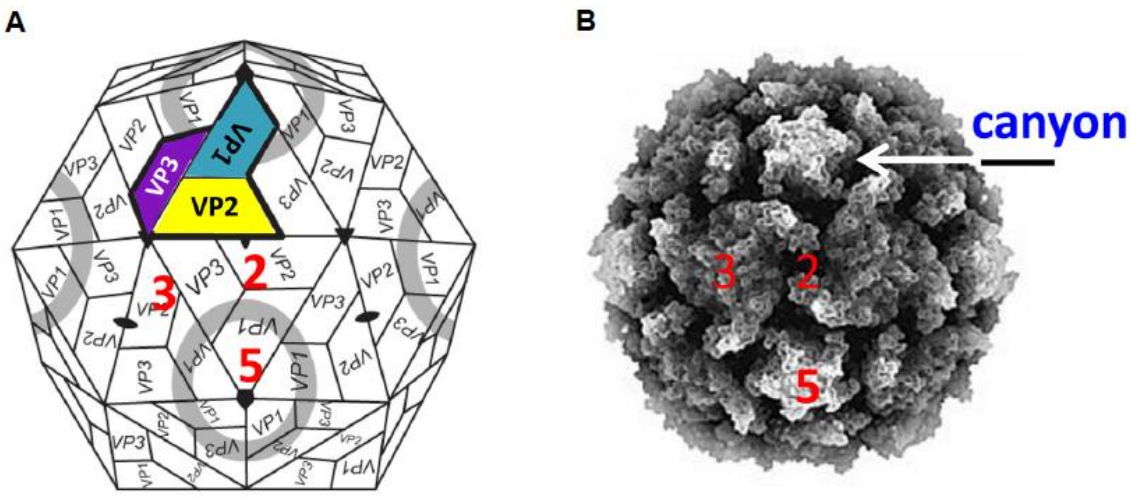


Figure 2 : Structure d'un entérovirus (ici le PV). (A) Schéma de l'agencement des protéines VP1, VP2 et VP3 et des axes de symétrie (2, 3 et 5). (B) Modélisation de la surface de la capside. Issu de Jiang *et al.*(2014).

La surface de la capside comporte une dépression (canyon), autour de l'axe de symétrie d'ordre 5 et qui contient notamment le site d'attachement au récepteur cellulaire. Il existe différents types de récepteurs cellulaires des entérovirus, un sérotype donné pouvant reconnaître plusieurs récepteurs. Par exemple, les coxsackievirus B1 à B6 (appartenant à l'espèce EV-B) peuvent être internalisés via le récepteur CAR, une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines. Certains sérotypes (CV-B1, CV-B3 et CV-B5) peuvent également interagir avec un co-récepteur, la protéine CD55 (ou DAF, *Decay Accelerating Factor*) ancrée à la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un glycophosphatidylinositol (Marjomäki *et al.*, 2015). Le co-récepteur DAF est également reconnu par d'autres sérotypes comme CV-A21 et E70 (Stuart *et al.*, 2002). Les poliovirus (PV), appartenant à l'espèce EV-C, utilisent récepteur PVR (*poliovirus receptor*) ou CD155 de la famille des nectines. Le canyon comporte par ailleurs une poche hydrophobe occupée par une petite

molécule lipidique nommée *pocket factor* provenant de la cellule hôte. Après interaction avec le récepteur cellulaire, l'expulsion de cette molécule initie la décapsidation (Chen *et al.*, 2019; Hendry *et al.*, 1999).

Le génome des entérovirus est un ARN simple brin d'environ 7,5 Kb, lié de façon covalente en 5' à une petite protéine nommée VPg (*viral protein genome-linked*), et se terminant par une queue polyadénylée en 3'. Le génome contient un unique cadre ouvert de lecture (ORF) flanqué de régions 3' et 5' non traduites (NTR) très structurées. La régions 5'NTR contenant des éléments nécessaires à la réplication ou à l'initiation de la traduction comme un IRES (*internal ribosome entry site*). La polyprotéine est organisée en trois domaines, P1 codant les protéines structurales, et P2 et P3 codant les protéines associées à la maturation et réplication. La polyprotéine subit une succession d'étapes de maturation au cours desquelles interviennent notamment les protéases à activité autocatalytique $2A^{pro}$ et $3C^{pro}$. Le génome viral est répliqué par une ARN polymérase ARN-dépendante (Figure 3).

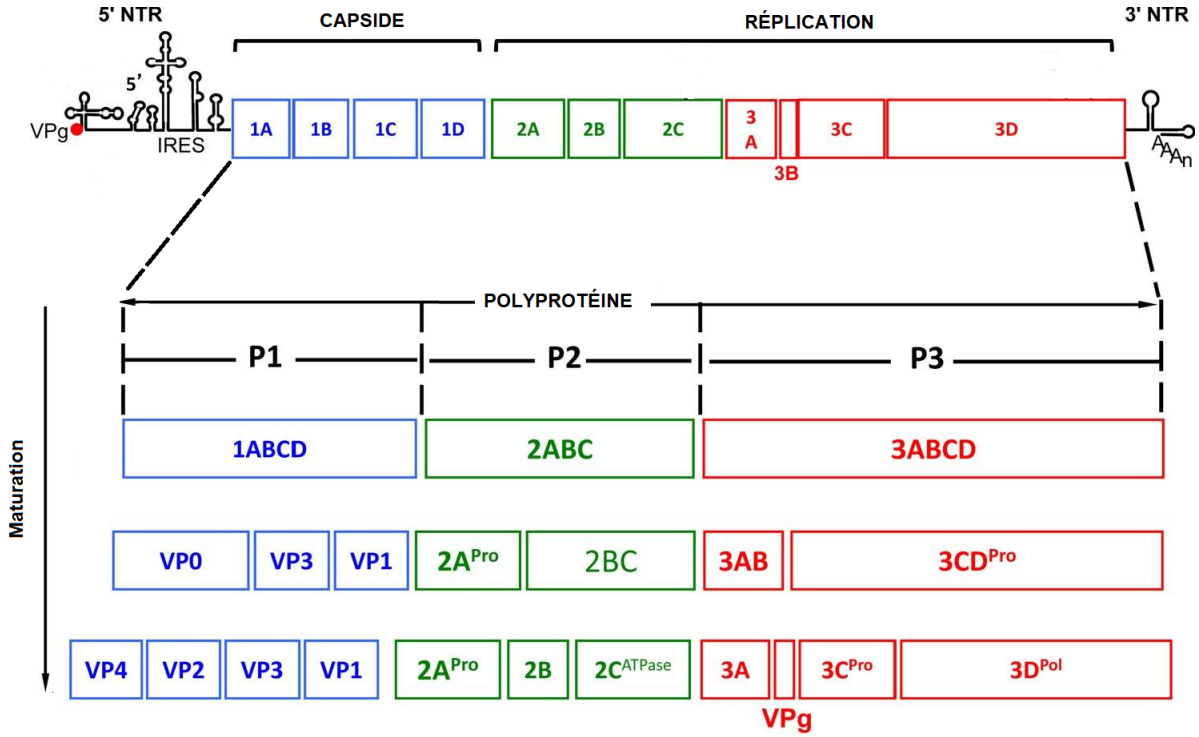


Figure 3 : Organisation du génome des entérovirus et maturation de la polyprotéine. Issu de Jiang *et al.*2014.

1.2. Les épidémies de gastro-entérites virales d'origine hydrique

1.2.1. Généralités

Les virus entériques peuvent être transmis par voie directe de personne à personne, ou bien par voie indirecte via l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. Les modes de transmission des virus entériques dans l'environnement hydrique sont schématisés sur la Figure 4. Ils incluent la consommation de fruits ou légumes contaminés par irrigation ou lavage avec une eau souillée ; la consommation de fruits de mer issus de zones impactées par des eaux superficielles contaminées ou des rejets de station d'épuration ; l'ingestion d'eau lors d'activités récréatives en milieu aquatique ; la consommation d'eau contaminée suite à une anomalie affectant le bon déroulement des traitements ou l'intégrité du réseau.

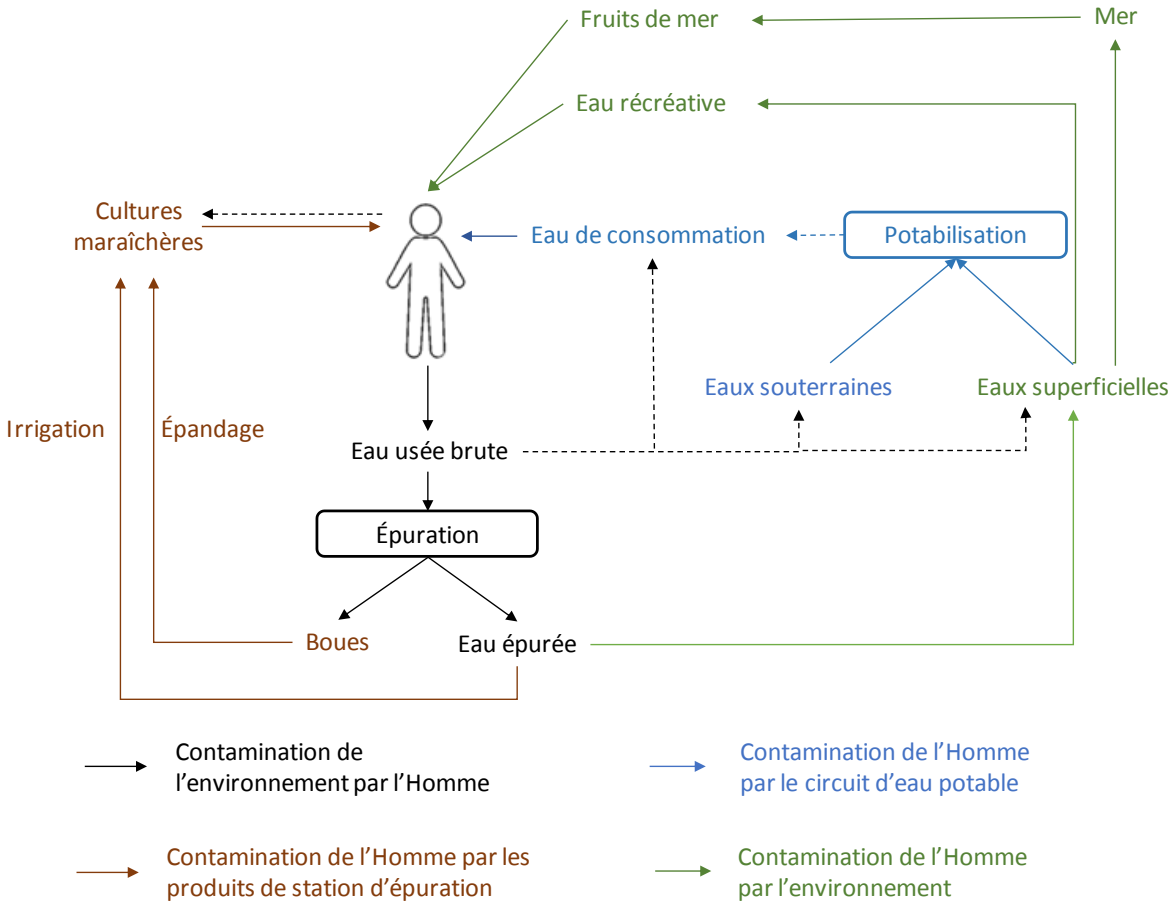


Figure 4 : Cycle de transmission des virus entériques dans l'environnement hydrique. Les flèches pointillées symbolisent les transferts accidentels. Adapté de Schwartzbrod (1991) et Faou (2012).

Établir l'origine hydrique des épidémies de gastroentérites virales pose des difficultés car les symptômes peuvent se déclarer à distance de la source en raison de la période d'incubation, durant parfois plusieurs jours. De plus, les doses infectieuses étant faibles, les méthodes analytiques doivent avoir une limite de détection suffisamment basse. Par ailleurs, les gastroentérites n'entraînent pas

systématiquement une consultation médicale et, même dans ce cas, l'origine virale ne peut pas être établie avec certitude sans investigation plus avancée compte-tenu du caractère non spécifique des symptômes.

Lors d'une épidémie d'origine hydrique, on distingue les cas primaires survenant, selon la période d'incubation du virus, d'un à cinq jours après ingestion de l'eau contaminée, des cas secondaires dus à la transmission directe de personne à personne, apparaissant plus tardivement. Cette distinction est plus difficile à établir lorsque la période d'incubation est courte et que la source de contamination perdure.

1.2.2. Importance de la voie hydrique comme mode de transmission

Dans les pays où la population dispose d'infrastructures sanitaires et d'un accès à l'eau potable continu, la voie hydrique comme mode de transmission des épidémies virales est généralement minoritaire. A titre d'exemple, parmi 101 épidémies de gastro-entérites à *Caliciviridae* (sapovirus et norovirus) ayant touché au total 2756 personnes en 2010 et 2011 en Catalogne (Epagne), seules 5 % étaient liées à l'eau contre 49,5 % liées aux aliments et 45,5 % contractées par voie directe (Torner *et al.*, 2016). D'autre part, une méta-analyse a montré que sur 666 épidémies à norovirus ayant eu lieu entre 1983 et 2010 en grande majorité (90 %) dans l'hémisphère nord, 11 % avait l'eau comme mode de transmission (Matthews *et al.*, 2012). Enfin, au Canada seuls 0,51 % des GEA seraient attribuables chaque année à la présence de pathogènes dans l'eau de boisson, mais cette proportion reste approximative du fait des difficultés d'analyse.

Dans les pays en développement, les maladies transmises par l'eau font environ 2,2 millions de morts chaque année. Dans ces pays, la part des GEA virales à transmission hydrique est très importante mais difficile à établir précisément, car peu de données chiffrées permettent de comparer les nombres de cas liés à l'eau de ceux transmis directement de personne à personne.

1.2.3. Epidémies de gastro-entérites virales liées à l'eau de distribution

Si le mode de contamination par voie hydrique est minoritaire dans un grand nombre de pays, des épidémies liées à la consommation d'eau de distribution contaminée sont toutefois régulièrement reportées dans la littérature et concernent parfois plusieurs milliers de personnes. Les Tableaux 2 à 4 listent des épidémies rapportées dans la littérature scientifique depuis 2000, impliquant des virus entériques, et ayant touché au moins 25 personnes. Les événements sont regroupés en fonction de l'origine de la contamination, qui peut être une altération de la qualité des ressources (Tableau 2), un dysfonctionnement d'une étape de désinfection (Tableau 3), ou une anomalie du réseau d'eau potable (Tableau 4). Les travaux qui ne décrivent pas l'origine de la contamination ne sont pas listés dans ces tableaux. Les virus les plus fréquemment impliqués sont les norovirus et les rotavirus.

La Figure 5 indique les proportions de cas attribuables à chacune des trois classes de causes évoquées ci-dessus. Les premières causes sont des anomalies de système de distribution (54 % des cas) telles que des interconnexions avec le réseau d'eaux usées, des ruptures de canalisations et des chutes de pression provoquant l'intrusion d'eaux usées dans le réseau d'eau potable. Vient ensuite l'altération de la qualité des ressources (33 % des cas) superficielles ou souterraines, très majoritairement en conséquence de précipitations occasionnant des débordements des égouts ou des déversoirs d'orage. Enfin les dysfonctionnements de traitement (13 % des cas) sont les évènements les moins fréquents et sont souvent liés à une insuffisance de chloration.

Notons que les dysfonctionnements au niveau des usines de production d'eau potable représentent deux types de situations : d'une part des anomalies techniques (pannes pompes, défauts concernant les générateurs de chlore, d'ozone, ou les lampes UV, réactifs contaminés) ou des erreurs humaines (manque de maintenances, erreurs opérationnelles), et d'autre part une inadéquation entre le niveau de traitement et une qualité de l'eau soudainement altérée en entrée d'usine (Moreira and Bondelind, 2017).

Les événements reportés ici ne représentent qu'une partie des épidémies liées à la consommation d'eau de distribution, mais suffisent néanmoins à montrer que les épidémies liées à l'eau de distribution ne sont pas exceptionnelles même dans les pays les plus industrialisés, que les norovirus sont les principaux virus entériques responsables, et que divers scénarios peuvent conduire à une contamination de l'eau.

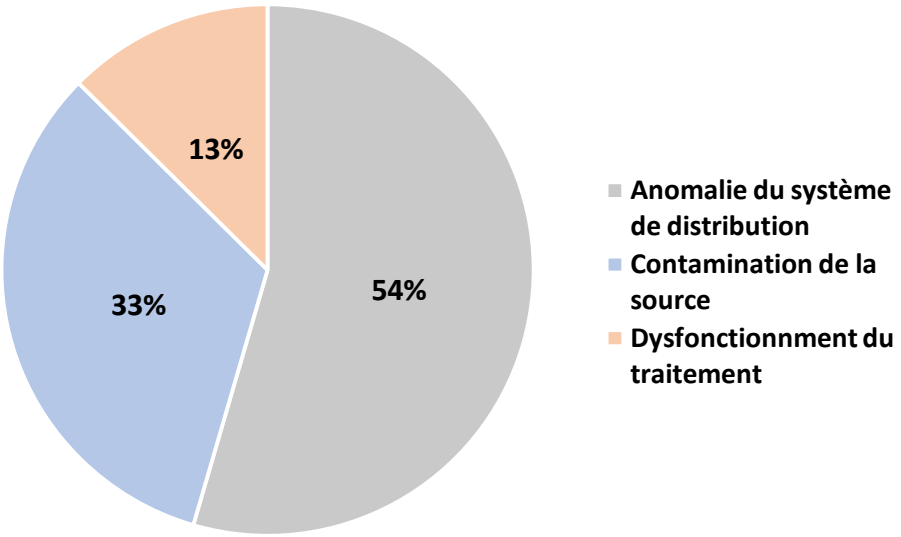


Figure 5 : Origine de la contamination dans les cas d'épidémies liées à l'eau de distribution depuis 2000 reportés ci-dessous (n = 49 208 cas).

Tableau 2 : Épidémies impliquant des virus entériques liées à une contamination des ressources (d'après Moreira et Bondelind (2017) et complété)

Année	Pays	Nombre de cas estimé	Virus impliqué	Type de resource	Origine de la contamination	Référence
2002	France	2000	Norovirus	Eau souterraine	Débordement des eaux usées en amont de la source après précipitations	Tillaut *et al.*(2004)
2002	Suède	500	Norovirus	Eau souterraine	Rupture d'une canalisation du réseau sanitaire à proximité du puits	Carrique-Mas *et al.*(2003)
2004	États-Unis	1450	Norovirus (et *Campylobacter*)	Eau souterraine	Contamination de l'aquifère par des fosses septiques, épandage de boues et infiltration d'eau de ruissellement	O'Reilly *et al.*(2007)
2005	Grèce	709	Norovirus	Eau souterraine	Contamination après precipitations	Papadopoulos *et al.*(2006)
2006	Grèce	1640	Norovirus	Eau souterraine	Contamination après precipitations	Vantarakis *et al.*(2011)
2006	Nouvelle Zélande	218	Norovirus	Eau de surface	Débordement des eaux usées suite au bouchage d'une fosse septique	Hewitt *et al.*(2007)
2007	Pays-Bas	71	Norovirus	Eau souterraine	Contamination ponctuelle d'un puits privé	Ter Waarbeek *et al.*(2010)
2008	Suède	2400	Norovirus	Eau de surface	Précipitations et rejet ponctuel d'eaux usées en amont de la prise d'eau	Larsson *et al.*(2014)
2008	Corée du Sud	67	Norovirus	Eau souterraine	Non détaillée	Koh *et al.*(2011)
2009	Suède	200	Norovirus	Eau souterraine	Contamination du puits lors de la fonte des neiges	Riera-Montes *et al.*(2011)
2009	Italie	299	Rotavirus et norovirus	Eau de surface	Contamination du lac après débordement des eaux usées et/ou rejet illégal	Scarcella *et al.*(2009)
2011	Italie	156	Norovirus	Eau souterraine	Contamination après precipitations	Giammanco *et al.*(2014)

Tableau 2 (suite)

Année	Pays	Nombre de cas estimé	Virus impliqué	Type de resource	Origine de la contamination	Référence
2011	États-Unis	119	Norovirus	Eau de surface	Non précisé	Beer *et al.*(2015)
2012	Grèce	3 620	Rotavirus	Eau de surface	Contamination après précipitations	Mellou *et al.*(2013)
2012	Turquie	115	Norovirus, astrovirus, rotavirus (et *Shigella*)	Eau souterraine	Possible contamination d'une source souterraine alimentant des fontaines	Sezen *et al.*(2015)
2014	Chine	29	Norovirus	Eau souterraine	Incertaine, mais présence d'un système de stockage des eaux usées à proximité d'un puits	Qin *et al.*(2016)
2016	France	2600	Norovirus, rotavirus	Eau souterraine	Ressource alimentée en partie par des rejets de STEU, et défaut de surveillance des installations de traitement	Yvon *et al.*(2019)

Tableau 3 : Épidémies impliquant des virus entériques liées à un dysfonctionnement de traitement (d'après Moreira et Bondelind (2017) et complété)

Année	Pays	Nombre de cas estimé	Virus impliqué	Nature du dysfonctionnement	Référence
2000	France	2600	Rotavirus, norovirus (et *Campylobacter*)	Dysfonctionnement du système de chloration associée à une possible contamination d'une source souterraine après ruissellements	Gallay *et al.*(2006)
2001	Suisse	650	Norovirus	Dysfonctionnement lors de la chloration et/ou de l'ozonation	Fretz *et al.*(2005)
2001	États-Unis	83	Norovirus	Dysfonctionnement du générateur de chlore et contamination issue d'une fosse septique	Blackburn *et al.*(2004)
2006	Italie	2860	Rotavirus, norovirus	Problème technique lié à la chloration	Martinelli *et al.*(2007)

Tableau 4 : Épidémie impliquant des virus entériques liées à une anomalie du système de distribution (d'après Moreira et Bondelind (2017) et complété)

Année	Pays	Nombre de cas estimé	Virus impliqué	Origine de la contamination	Référence
2000	Italie	344	Norovirus	Rupture d'une canalisation reliant le réseau public à un réservoir de secours	Boccia *et al.*(2002)
2001	France	563	Rotavirus (et *Cryptosporidium, Campylobacter, E. coli*)	Contamination par des rejets d'eaux usées	Dalle *et al.*(2003)
2001	Espagne	96	Norovirus	Contamination d'un réservoir liée à un défaut de maintenance et des faiblesses structurelles	Godoy *et al.*(2006)
2001	Pays-Bas	37	Norovirus	Interconnexion entre le réseau d'eau potable et celui des eaux grises non retirée après une maintenance	Fernandes *et al.*(2007)
2002	Suisse	100-150	Norovirus	Contamination par des rejets d'eaux usées	Fretz *et al.*(2005)
2002	Norvège	134	Norovirus	Défaut d'entretien d'un dispositif local d'assainissement et de distribution d'eau potable	Nygård *et al.*(2004)
2004	États-Unis	1450	Norovirus (et *Campylobacter, Giardia*)	Non précisée	Liang *et al.*(2006)
2005	Turquie	9907	Rotavirus	Possible contamination d'un important réservoir	Koroglu *et al.*(2011)
2007	Danemark	140	Norovirus (et *Campylobacter, E. coli*)	Erreur technique au niveau du traitement des eaux usées conduisant à une fuite vers le réseau d'eau potable	Vestergaard *et al.*(2007)
2007	Finlande	8453	Norovirus (et *Campylobacter, Giardia*)	Réseau d'eau potable contaminé par des rejets de station d'épuration	Laine *et al.*(2011)
2008	Suisse	126	Norovirus (et *Campylobacter*)	Erreur technique au niveau d'une station d'épuration conduisant à une entrée d'eau sous pression dans le réseau d'eau potable	Breitenmoser *et al.*(2011)

Tableau 4 (suite)

Année	Pays	Nombre de cas estimé	Virus impliqué	Origine de la contamination	Référence
2008	Slovénie	408	Norovirus, rotavirus, adénovirus (et *Campylobacter, Giardia, Staphylococcus*)	Probable intervention de particuliers sur les canalisations d'eau potable conduisant à un défaut de pression et l'intrusion d'eaux usées	Kopilović *et al.*(2008)
2008	Monténégro	1699	Norovirus	Panne d'une pompe ayant entraîné une chute de pression et l'entrée d'eau contaminée, associée à une chloration insuffisante	Werber *et al.*(2009)
2010	Suède	200	Norovirus	Entrée d'eau d'un puits non traitée dans le réseau d'eau potable	Hallin (2012)
2010	Belgique	222	Norovirus, rotavirus (et *Giardia, Campylobacter*)	Intrusion d'eau de rivière dans le réseau d'eau potable suite au raccordement d'une pompe par les pompiers pour l'extinction un incendie	Braeye *et al.*(2015)
2012	Grèce	79	Norovirus	Chute de neige, ruissellement et insuffisance technique face à une charge microbienne élevée	Mellou *et al.*(2013)
2012	Danemark	187	Norovirus	Contamination issue du réseau d'eau suite à une chute de pression	van Alphen *et al.*(2014)
2012	Finlande	800	Sapovirus (et *E. coli*)	Canalisation principale endommagée pendant la construction d'une route et insuffisamment nettoyée après réparation	Jalava *et al.*(2014)
2013	Espagne	238	Norovirus, rotavirus	Interconnexion entre le réseau d'eau potable et un réseau d'usine prélevant de l'eau de rivière	Altzibar *et al.*(2015)
2014	Chine	1614	Norovirus	Canalisations endommagées et proximité de fosses septiques	Zhou *et al.*(2016)
2016	Italie	25	Norovirus	Rejets d'eaux usées à proximité du réseau	Giammanco *et al.*(2018)

1.3. Contamination des ressources

1.3.1. Origine de la contamination

La qualité des eaux de surface est directement influencée par les activités humaines, et peut être altérée par une contamination fécale d'origine humaine ou animale. À l'échelle mondiale, moins de 20 % des eaux usées sont traitées avant d'être rejetées dans l'environnement (Unesco, 2015), et les traitements n'éliminent qu'une très faible proportion des virus entériques. Les rejets de stations de traitement des eaux usées (STEU) urbaines ou industrielles et les dispositifs d'assainissement individuels sont la principale source de contamination virale des environnements hydriques.

Dans les pays où les réseaux d'assainissement sont établis, les eaux usées domestiques et industrielles sont acheminées vers les STEU dont le rôle est de mettre en œuvre un niveau de traitement suffisant pour ne pas altérer la qualité du milieu récepteur en aval. Il existe deux types de réseaux : les réseaux unitaires et séparatifs (Spellman, 2003). Les réseaux unitaires collectent à la fois les eaux usées et les eaux pluviales qui sont rassemblées au sein du même réseau de canalisation et prises en charge par les STEU. Ce type de réseau doit être dimensionné pour faire face à des variations soudaines du débit. Les réseaux séparatifs collectent séparément les eaux usées qui sont ensuite acheminées vers les STEU, et les eaux pluviales qui sont directement redirigées vers le milieu récepteur. Les STEU utilisent différents procédés biologiques ou physico-chimiques pour éliminer les pollutions liées au carbone, à l'azote, au phosphore et aux matières en suspension, et ne sont pas premièrement conçues pour éliminer les micro-organismes. Les rejets dans le milieu naturel sont réglementés mais les paramètres visés sont exclusivement des paramètres physico-chimiques.

Différents types de traitements sont mis en place au sein des STEU. Ils comprennent le plus souvent après dégrillage, une étape de décantation (traitement primaire), et un traitement par voie biologique ou voie physico-chimique (traitement secondaire). Ces étapes peuvent être complétées par un traitement tertiaire oxydatif qui permet, entre autres, d'améliorer l'élimination des pathogènes. Plusieurs études, dont certaines sont indiquées ci-dessous, rapportent les performances de STEU équipées de différents types de traitements sur l'abattement viral.

Flannery *et al.*(2012) ont quantifié sur une période d'un an les NoV GI et NoV GII par réaction de polymérisation en chaîne précédée d'une transcription inverse (RT-qPCR) dans les eaux usées brutes et les effluents d'une STEU dotée d'un traitement secondaire avec boue activée, en Irlande. Leurs analyses indiquent des concentrations moyennes de 3,5 log/L (NoV GI) et 3,6 log/L (NoV GII) dans les eaux usées, et un abattement moyen respectif de 0,80 et 0,92 log en STEU. En Suède, un suivi sur quatre STEU effectuant un traitement primaire par précipitation chimique et un traitement secondaire par boues activées a montré des concentrations moyennes (déterminées par RT-qPCR) de 3,3 log et 4,4 log d'unités PCR/L en norovirus et entérovirus dans les eaux usées brutes. Les

abattements moyens observés pour ces deux virus étaient respectivement de 0,9 et 1,3 log (Ottoson *et al.*, 2006). Hata *et al.*(2013) ont étudié sur une période de six mois les performances d'élimination d'une STEU, réalisant un traitement par boues activées complété d'un traitement tertiaire par chloration, sur un panel de virus entériques incluant les adénovirus, les entérovirus, les salivirus, les norovirus (GI, GII et GIV) et les astrovirus. Selon les virus, les concentrations moyennes dans les eaux usées brutes (déterminées par PCR) étaient comprises entre 10^4 et $2{,}2.10^6$ copies/L, et des abattements moyens compris entre 1,3 et 3,3 log étaient observés.

En Île-de-France, Moulin *et al.* (2010) ont montré par un suivi de deux ans (2007-2008) que la STEU Seine Amont, équipée d'un traitement primaire et d'un traitement secondaire par boues activées, permettait d'éliminer seulement 1 log d'entérovirus infectieux (titrés sur cellules BGMK).

Dans le Michigan (États-Unis), un suivi sur cinq mois des concentrations en adénovirus, entérovirus et norovirus GII a été effectué au niveau de cinq STEU ayant différentes technologies de traitement mais toutes dotées, en plus d'un traitement secondaire par boue activées, d'une étape de désinfection par chloration ou UV. Les occurrences moyennes de détection de ces trois virus par PCR dans les eaux usées brutes étaient respectivement de 100 %, 67 % et 10 %. La concentration de virus infectieux (déterminée par culture sur cellules A549 et BGMK) était en moyenne de 2.10^4 MPN/100 L dans les eaux usées brutes, $1{,}6.10^1$ MPN/100 L dans les effluents, et $1{,}4.10^2$ MPN/g dans les biosolides. Les abattements observés dans les effluents étaient en moyenne de 4,2 log. Par ailleurs, la désinfection par UV était plus efficace que la désinfection par chloration, et le système de bioréacteur à membrane était plus efficace pour abattre les adénovirus (mais pas les entérovirus) que le système classique d'épuration par boue activée (Simmons and Xagoraraki, 2011).

Enfin, Prévost *et al.*(2015) ont réalisé un suivi pendant une période d'un an des concentrations d'un panel de douze virus entériques dans les effluents de quatre STEU majeures de l'agglomération parisienne, comprenant des traitements par boues activées et filtration biologique. Les concentrations médianes (déterminées par PCR) s'étendaient de moins de 1.10^2 copies/L, s'agissant des entérovirus, à plus de 10^4 copies/L concernant les rotavirus A et adénovirus, tandis que les astrovirus, norovirus (GI et GII), salivirus, cosavirus étaient quantifiés à des concentrations intermédiaires. Par ailleurs, des calculs de flux ont permis de montrer qu'au cours d'une année, 70 % à 90 % de la charge virale mesurée dans le bassin versant en aval de l'agglomération émettrice provenaient des effluents de STEU.

Ainsi, les eaux usées brutes contiennent environs 10^2 à 10^4 virus entériques/L. Lorsque ces eaux sont traitées, les STEU permettent d'abattre approximativement 3 et 1 log de la charge virale, selon la présence ou non d'un traitement tertiaire. Les rejets traités restent donc une source majeure

de contamination virale pour les milieux récepteurs, en particulier en absence de traitement tertiaire.

1.3.2. Ressources superficielles et contamination virale

Les eaux douces de surfaces sont souvent utilisées comme ressources pour approvisionner en eau potable les grandes agglomérations urbaines, car les rivières et les lacs permettent un approvisionnement régulier de grands volumes d'eau brute (Katsanou and Karapanagioti, 2017). L'exploitation de ces ressources est néanmoins plus coûteuse en traitements et nécessite davantage d'infrastructures et de maintenance que celles des ressources souterraines. En milieu urbain, les eaux de surface ont des charges virales relativement élevées (Tableau 5) soumises à d'importantes variations spatio-temporelles.

La contamination virale des eaux de surface est directement influencée par les collectivités humaines et les activités agricoles situées sur les bassins versants. Apportée par les STEU, elle dépend d'une part de la charge virale des effluents et d'autre part des volumes rejetés dans les milieux récepteurs. En effet, la charge virale des effluents est déterminée par les performances des traitements ainsi que par la taille de la population raccordée au réseau d'assainissement et son statut sanitaire. De plus, il existe une variation saisonnière des charges virales dans les rejets qui coïncide avec les pics épidémiques (Farkas *et al.*, 2018a, 2018b; Li *et al.*, 2011; Prevost *et al.*, 2015). L'impact sur le milieu récepteur dépend aussi du facteur de dilution entre le volume d'effluents et celui du milieu.

Les conditions météorologiques et climatiques impactent également la contamination virale des milieux récepteurs de diverses façons. Les précipitations ou les fontes de neige sont particulièrement impactantes lorsque les eaux usées sont prises en charge par un réseau unitaire. Lorsque les volumes excèdent la capacité du réseau, celui-ci déborde via les déversoir d'orages ce qui entraîne des rejets directs d'eaux usées diluées dans l'environnement en bypassant les STEU (Haramoto *et al.*, 2006). Une étude a montré que par temps de pluie, le débordement des déversoirs d'orages impacte fortement les milieux récepteurs. Ainsi, dans les milieux récepteurs en aval de trois STEU de l'agglomération de Chicago (USA), les concentrations en virus cultivables totaux (sur lignée PLC/PRF/5, dont les auteurs ont montré qu'elle permet de détecter cinquante fois plus de virus infectieux dans les eaux usées que les cellules BGM), HAdV infectieux et génomes de NoV étaient plus de dix fois supérieures par temps de pluie que par temps sec (Rodríguez *et al.*, 2012). De plus, lorsque les capacités hydrauliques maximales des STEU sont atteintes, leur efficacité est amoindrie et les traitements peuvent être volontairement réduits pour prendre en charge un volume d'effluent plus important (Capodaglio, 2005). Enfin, le ruissellement d'eau de pluie sur les surfaces agricoles ayant fait l'objet d'épandages de boues contaminées ou bien sur des parcelles d'élevage d'animaux

porteurs de virus entériques à transmission zoonotique (VHE notamment) pourrait entraîner le transfert de virus en amont du bassin versant.

Tableau 5 : Fréquence de détection et concentration des virus entériques dans les eaux de surface.

Virus	Fréquence de détection (%)*	Concentration (copies/L)	Rivière	Pays	Référence
Adénovirus	88 (46/52)	10^2 à 10^5	Llugwy et Conwy	Écosse	(Farkas *et al.*, 2018a)
	58 (7/12)	< 3.10^2	Kalamas	Grèce	(Kokkinos *et al.*, 2018)
	22 (7/32)	10^3 à 10^5	Tibre	Italie	(La Rosa *et al.*, 2017)
	100 (6/6)	10^3 à 10^4	Lloregat	Espagne	(Calgua *et al.*, 2013)
	93 (93/100)	10^2 à 10^3	Seine	France	(Prevost *et al.*, 2015)
Virus aichi	38 (20/52)	10^2 à 10^4	Katsura et Furu	Japon	(Hata *et al.*, 2018)
	21 (21/100)	< 10^2	Seine	France	(Prevost *et al.*, 2015)
Astrovirus	36 (36/100)	10^2 à 10^3	Seine	France	(Prevost *et al.*, 2015)
	29/48	n.i.**	Barrage de San Roque	Argentine	(Masachessi *et al.*, 2018)
Cosavirus	29 (4/14)	10^2 à 10^4	Fujikawa	Japon	(Haramoto and Otagiri, 2014)
	14 (14/100)	< 10^2	Seine	France	(Prevost *et al.*, 2015)
Entérovirus	31 (16/52)	10^2 à 10^4	Katsura et Furu	Japon	(Hata *et al.*, 2018)
	65 (31/48)	n.i.	San Roque (retenue d'eau)	Argentine	(Masachessi *et al.*, 2018)
	28 (9/32)	10^2 à 10^4	Tibre	Italie	(La Rosa *et al.*, 2017)
	6 (6/100)	< 10^2	Seine	France	(Prevost *et al.*, 2015)
Norovirus	50 (6/12)	10^1 à 10^4	Bow (amont)	Canada	(Pang *et al.*, 2019)
	75 (9/12)	10^1 à 10^5	Bow river (aval)		
	58 (30/52)	10^2 à 10^5	Katsura et Furu	Japon	(Hata *et al.*, 2018)
	13 (5/52)	10^2 à 10^3	Llugwy et Conwy	Écosse	(Farkas *et al.*, 2018a)
	17 (2/12)	< 5.10^1	Kalamas	Grèce	(Kokkinos *et al.*, 2018)
	28 (9/32)	n.i.	Tibre	Italie	(La Rosa *et al.*, 2017)
	92 (92/100)	10^2 à 10^3	Seine	France	(Prevost *et al.*, 2015)
Norovirus	60 (29/48)	n.i.	Barrage de San Roque	Argentine	(Masachessi *et al.*, 2018)
	83 (5/6)	10^3 à 10^5	Lloregat	Espagne	(Calgua *et al.*, 2013)

Tableau 5 (suite)

Virus	Fréquence de détection (%)	Concentration (copies/L)	Rivière	Pays	Référence
Rotavirus	100 (12/12)	10^2 à 10^4	Bow (amont)	Canada	(Pang *et al.*, 2019)
	100 (12/12)	10^3 à 10^6	Bow (aval)		
	31 (16/52)	10^2 à 10^5	Katsura et Furu	Japon	(Hata *et al.*, 2018)
	52 (25/48)	n.i.	San Roque (retenue d'eau)	Argentine	(Masachessi *et al.*, 2018)
	9 (3/32)	n.i.	Tibre	Italie	(La Rosa *et al.*, 2017)
	57 (57/100)	10^2 à 10^3	Seine	France	(Prevost *et al.*, 2015)
Salivirus	13 (13/100)	$< 10^2$	Seine	France	(Prevost *et al.*, 2015)
Sapovirus	25 (3/12)	10^2 à 10^4	Bow (amont)	Canada	(Pang *et al.*, 2019)
	75 (9/12)	10^3 à 10^5	Bow river (aval)		
	13 (7/52)	10^2 à 10^4	Katsura et Furu	Japon	(Hata *et al.*, 2018)
	4 (2/52)	10^1	Llugwy et Conwy	Écosse	(Farkas *et al.*, 2018a)
VHA	23 (11/48)	n.i.	Barrage de San Roque	Argentine	(Masachessi *et al.*, 2018)
	8 (3/32)	n.i.	Tibre	Italie	(La Rosa *et al.*, 2017)
	33 (7/27)	n.i.	Po et Dora Riparia	Italie	(Iaconelli *et al.*, 2015)
VHE	2 (1/48)	n.i.	Retenue d'eau de San Roque	Argentine	(Masachessi *et al.*, 2018)
	3 (1/32)	n.i.	Tibre	Italie	(La Rosa *et al.*, 2017)
	4 (1/27)	n.i	Po et Dora Riparia	Italie	(Iaconelli *et al.*, 2015)

* Le nombre d'échantillons positifs sur le nombre total analysés est indiqué entre parenthèses
**n.i. : non indiqué

1.3.3. Ressources souterraines et contamination virale

Les ressources souterraines font référence aux aquifères dont l'eau est extraite via des puits ou jaillit de sources naturelles. Elles approvisionnent en eau douce 33 % de la population mondiale et 75 % de la population européenne (Katsanou and Karapanagioti, 2017). Les ressources souterraines sont de meilleure qualité que les ressources superficielles car le sol agit comme un filtre naturel qui retient une partie de la matière organique, des particules et des micropolluants. Le transfert des virus dans l'aquifère dépend des caractéristiques du sol et de la roche qui la compose, de la saturation du sol, du pH, ainsi que des propriétés intrinsèques des virus (Gerba, 1984; Yates *et al.*, 1988) (Figure 6).

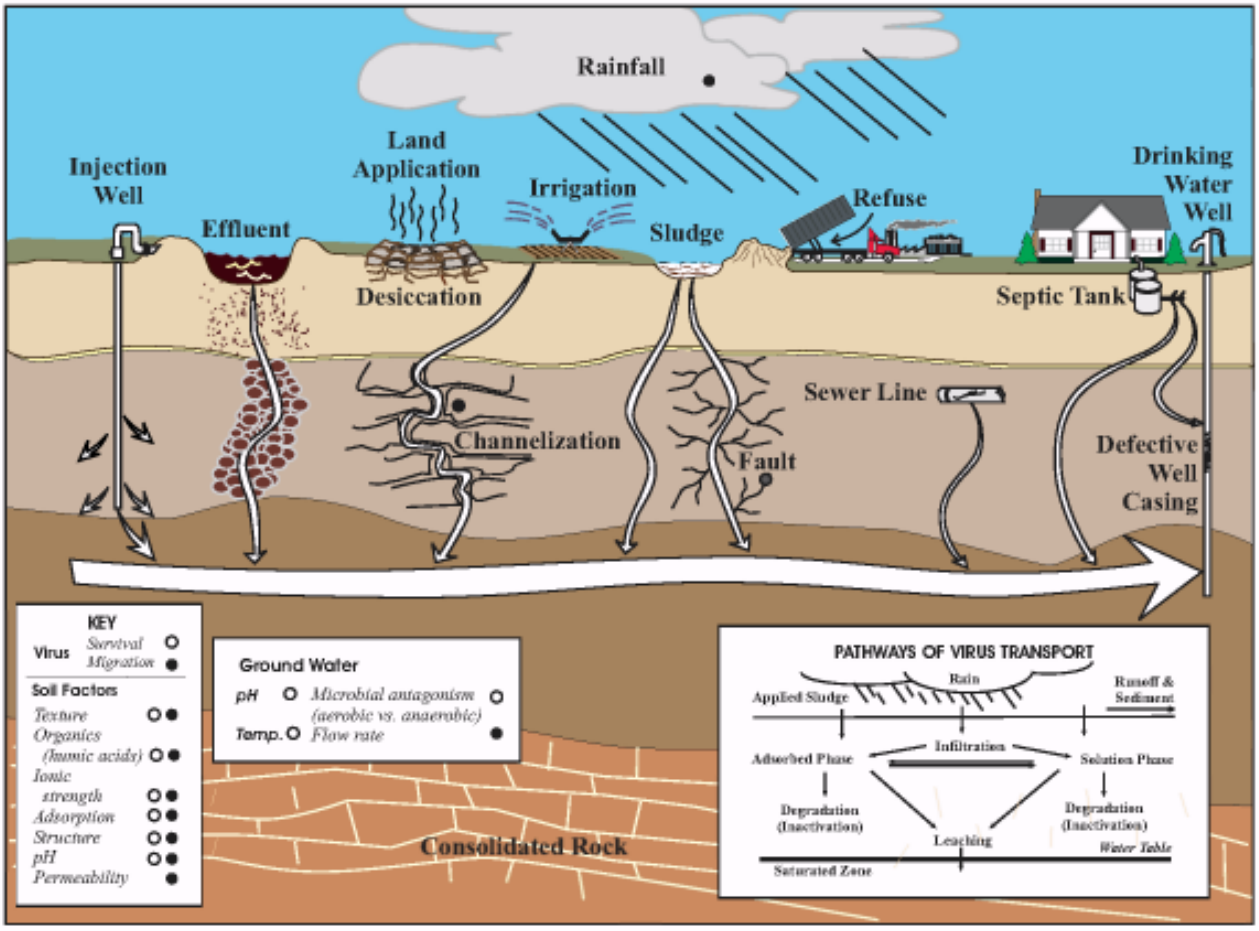


Figure 6 : Facteurs influençant la migration et la persistance des virus dans le sol et l'eau souterraine. Issue de Azadpour-Keeley *et al.* (2003)

Une méta-analyse incluant douze études menées entre 1992 et 2013 aux Etats-Unis, au Canada, en Italie, au Japon et en Corée du Sud a été réalisée pour caractériser la contamination en virus entériques humains de ressources souterraines exploitées par des opérateurs publics pour la production d'eau (Fout *et al.*, 2017). Au total, 2273 échantillons d'eau souterraine, représentant 746

puits et 718 installations de production d'eau potable, ont été analysés. L'analyse indique que des virus entériques humains ont été détectés (par culture ou PCR) dans 15 % des échantillons et 27 % des puits. Parmi les échantillons positifs les concentrations moyennes de virus étaient de 16 unités génomiques/L et 0,4 unités infectieuses /L. Les auteurs notent que ces valeurs pourraient être sous-estimées car les rendements des méthodes de concentration et de détection n'atteignent jamais 100 %.

La contamination des ressources souterraines est notamment dépendante de la qualité et de la proximité des infrastructures sanitaires. Dans une autre étude, parmi 90 échantillons d'eau souterraine issus de 90 puits sélectionnés aléatoirement dans la région de Baltimore, aucun n'était positif par culture sur cellules BGMK permettant la culture des entérovirus (après une première incubation de 14 jours et une ré-inoculation des surnageants de même durée), ni par PCR en ce qui concerne les VHA, entérovirus et norovirus (GI et GII). Du génome de rotavirus a été détecté dans un seul échantillon (Banks and Battigelli, 2002). En revanche, des niveaux de contamination plus importants ont été mis en évidence au Ghana, à travers une étude ayant recherché la présence de génomes d'adénovirus ou de rotavirus dans 62 échantillons d'eau issue de 22 forages ou puits creusés à la main (*hand-dug wells*). Neufs sites ont été positifs en génomes d'adénovirus, et trois en génomes de rotavirus (Lutterodt *et al.*, 2018). Les auteurs soulignent que la contamination généralisée des ressources est directement liée à proximité d'installation sanitaires et de fosses septiques. Dans cette, étude aucune des ressources considérées n'avait une qualité microbiologique suffisante pour ne pas nécessiter de traitement avant consommation.

En Italie, les norovirus, entérovirus, rotavirus et VHA ont été recherchés par PCR dans des échantillions d'eau souterraine issue de 182 puits utilisés pour l'irrigation. Parmi 364 échantillons, 27 (7,4 %) issus de 27 puits ont été positifs pour au moins un type de virus (66,7 % en norovirus, 18,5 % en rotavirus et 15,8 % en entérovirus). Le VHA n'a été détecté dans aucun échantillon (De Giglio *et al.*, 2017). De plus, les auteurs n'ont mis en évidence aucune différence de contamination liée à la géomorphologie poreuse ou fissurée (karstique) du sol.

L'ensemble de ces études indique que les ressources souterraines sont généralement peu contaminées en virus entériques dans les pays industrialisés en zones tempérées. Les ressources souterraines des pays en voie de développement en zones tropicales sont en revanche davantage contaminées.

1.4. Le risque sanitaire lié à la présence de virus entériques dans l'eau de consommation

1.4.1. Généralités

Les épidémies de gastroentérites virales liées à l'eau de distribution ne sont pas exceptionnelles, et un certain nombre d'entre elles pourraient être évitées par des usines de production d'eau potable plus fiables et performantes et par une meilleure évaluation des risques (Ashbolt, 2015). Certaines spécificités des virus entériques complexifient l'évaluation du risque qui leur est associé, comme par exemple leur faible dose infectieuse qui implique que même la présence d'une très faible concentration de particules infectieuses dans l'eau distribuée constitue un risque. De plus, la contamination virale ne coïncide pas nécessairement avec la présence d'indicateurs bactériens de contamination fécale (*Escherichia coli* et Entérocoques intestinaux).

Ainsi, Fout *et al. (*2017) ont évalué la pertinence de différents indicateurs de contamination fécale (coliformes totaux, *E. coli, Enterococcus*, spores, phages somatiques, phages ARN F-spécifiques) pour évaluer la qualité virale des eaux souterraines. Ils montrent que *E. coli* et les phages somatiques sont les meilleurs indicateurs de la présence de virus cultivables à l'échelle de l'échantillon (présence de virus cultivables dans un échantillon 7 à 9 fois plus probable en présence de ces indicateurs), mais que les phages somatiques et les phages ARN F-spécifiques sont les indicateurs les plus pertinents à l'échelle du puits (présence de virus cultivables dans un puits 8 à 9 fois plus probable en présence de ces indicateurs). Leur analyse souligne néanmoins que ces indicateurs peuvent sous-estimer la présence de virus infectieux. De plus, Prévost *et al.*(2015) n'ont observé aucune corrélation entre la concentration en indicateurs bactériens (*E. coli* et entérocoques intestinaux) et celle de différents virus entériques quantifiés par biologie moléculaire (HAdV, NoV GI, NoV GII, RV-A), que ce soit dans les rivières de l'agglomération parisienne (Seine, Marne) ou dans les eaux usées.

1.4.2. Cadre règlementaire

La qualité de l'eau potable est encadrée par la Directive européenne publiée en décembre 1998 (98/83/CE). La réglementation définit l'eau destinée à la consommation humaine comme « une eau devant ne pas contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes et être conforme à un certain nombre de limites et de références de qualité » et fixe des références et des limites de qualités :

- Les limites de qualités sont des paramètres (physico-chimiques ou microbiologiques) susceptibles d'avoir des effets immédiats ou à long terme sur la santé des consommateurs.

- Les références de qualités sont des paramètres sans incidence sur la santé aux concentrations habituellement rencontrées dans les eaux, mais qui peuvent indiquer une altération de la qualité de l'eau ou un dysfonctionnement des installations.

Tableau 6 : Limites et références de qualité (paramètres microbiologiques) décrites dans l'arrêté du 11 janvier 2007 (Annexes I.I.A. et I.II.A)

Limites de qualité	
E. coli	0 dans 100 mL
Entérocoques	0 dans 100 mL
Références de qualité	
Bactéries coliformes	0 dans 100 mL
Bactéries anaérobies sulfito-réductrices (spores comprises)	0 dans 100 mL
Germes aérobies revivifiables à 22 °C et 37 °C	Variation d'un rapport 10 par rapport à la valeur habituelle

Les virus ne font actuellement pas partie des paramètres microbiologiques utilisés comme limites et références de qualité (Tableau 6), mais des évolutions sont à prévoir. En effet un projet de révision de la Directive 98/83/CE est à l'étude par la Commission européenne (www.consilium.europa.eu). Il vise notamment à revoir la pertinence des paramètres microbiologiques, qui n'ont pas été révisés depuis 1998, à la lumière des connaissances scientifiques récentes. Le nouveau projet de directive, dans sa version datée du 2 février 2018, prévoit ainsi de modifier certains paramètres et d'en introduire de nouveaux tels que les coliphages somatiques (absence dans 100 mL). Il souligne d'autre part que des concepts fondés sur l'évaluation sanitaire des risques et la gestion prévisionnelle des risques devraient être davantage considérés concernant les agents pathogènes non pris en compte dans la directive actuelle. La nouvelle directive incitera à la mise en œuvre d'approches préventives, actuellement sous-représentées.

1.4.3. L'évaluation quantitative du risque sanitaire

L'analyse quantitative du risque microbiologique sanitaire (QMRA) est une démarche visant à apporter une aide à la décision et à la gestion des risques. Elle repose sur l'identification des dangers, la caractérisation des dangers, et l'évaluation de l'exposition. Différents modèles permettent ensuite d'intégrer ces paramètres pour aboutir à une estimation chiffrée du risque sous forme de probabilités (Haas et Eisenberg 2001).

Virus de référence

Une QMRA ne pouvant pas être réalisée sur chaque danger, des pathogènes de référence, censés représenter l'ensemble des autres pathogènes de même nature, sont sélectionnés selon des critères prenant en compte leur impact sanitaire et leur persistance. Si un traitement est efficace pour éliminer le pathogène de référence on considère alors qu'il l'est également pour éliminer l'ensemble des pathogènes qu'il représente. Historiquement, des modèles ont été construits à partir de *Giardia* et du rotavirus afin de déterminer le niveau de traitement permettant d'atteindre un niveau de risque acceptable (Regli *et al.*, 1991). L'utilisation du rotavirus pour établir la relation dose-infection pour l'ensemble des virus transmissibles par voie hydrique est considérée comme un approche sécuritaire (Gerba *et al.*, 1996; OMS, 2017). Certaines QMRA ont été menées sur d'autres virus comme le PV ou les HAdV (AFSSA, 2007). La sélection d'un pathogène de référence repose sur un faisceau de critères tels qu'une transmission par voie hydrique établie, la présence et persistance dans les ressources, la sensibilité aux traitements d'élimination, l'impact sanitaire, et la disponibilité de données nécessaire à la réalisation d'une QMRA. Le choix du pathogène de référence peut être adapté dans les contextes spécifiques.

Caractérisation des dangers

La caractérisation des dangers consiste à établir les relations dose-infection puis infection-maladie pour un virus donné. Pendant longtemps, le concept de la dose infectieuse minimale (DIM) a prévalu pour définir la relation dose-infection. La DIM était déterminée en administrant différentes doses de virus à un grand nombre d'individus volontaires (Tableau 7). Or, dans les faits, les études rapportaient souvent la dose nécessaire pour infecter 50 % de la population testée (DI_{50}) car sa détermination nécessitait d'inclure moins de sujets pour être statistiquement fiable. De plus, les doses administrées dans ces essais étaient souvent exprimées en $TCID_{50}$ (nombre de virus infectant 50 % des puits en culture), et donc le nombre réel de virus infectieux n'était qu'approximativement connu (Yezli and Otter, 2011). C'est désormais le concept de contamination unique selon lequel une unité d'agent pathogène suffit pour induire une infection qui prédomine (OMS, 2017).

Tableau 7 : Doses infectieuses minimales de quelques virus entériques. D'après (Yezli and Otter, 2011).

Virus	Dose infectieuse minimale	Référence
Rotavirus	0,9 unités infectieuses	(Ward *et al.*, 1986)
Poliovirus Type 1	12 unités infectieuses	(Katz and Plotkin, 1967)
Poliovirus Type 3	1 $TCID_{50}$	
Norovirus	18 virus	(Teunis *et al.*, 2008)
Echovirus 11	10^{-3} $TCID_{50}$	(Saliba *et al.*, 1968)
Echovirus 12	17 unités infectieuses	(Schiff *et al.*, 1984)

Des modèles permettent de caractériser la relation dose-infection et renseignent sur la probabilité d'infection en fonction de la dose ingérée. Ces modèles admettent généralement trois hypothèses (Haas *et al.*, 1999) :

(1) Une particule virale suffit pour induire une infection (modèle sans seuil), mais avec une probabilité très faible ;
(2) Il n'y a pas de synergie entre les différents micro-organismes ingérés ;
(3) Les pathogènes, qui sont supposés être distribués aléatoirement dans l'eau et présents en faible quantités, suivent une distribution de Poisson.

La construction des modèles dépend de la prise en compte ou non d'une variabilité de la probabilité d'infection au sein de la population. Si la probabilité d'infection est considérée comme constante dans la population, elle suit alors une relation de type exponentielle (Haas, 2002). Si la probabilité d'infection varie d'un individu à l'autre ou si on veut tenir compte d'une différence de virulence entre génotypes, la relation dose-infection peut être modélisées par une loi Bêta-Poisson (Teunis and Havelaar, 2000). D'autre modèles peuvent être établis *a posteriori* lorsque deux populations présentent des probabilités d'infection distinctes mais qu'aucun marqueur ne permet de les identifier initialement (Haas *et al.*, 1999).

Caractérisation de l'exposition

Les données de contamination de l'eau de boisson et de consommation permettent d'évaluer l'exposition. Généralement, la contamination est estimée à partir de la contamination des ressources avant traitement et des hypothèses sur l'efficacité des traitements extrapolés à partir de données concernant des virus modèles.

1.4.4. Mesure de l'effet sanitaire

Dans le domaine de l'eau potable, les objectifs de sécurité sanitaire font appel au concept de niveau de risque acceptable ou tolérable qui consiste à définir une valeur seuil telle que la limite d'incidence annuelle acceptable de gastroentérites dues à l'eau de consommation. Dès 1991, un niveau de risque acceptable d'un cas d'infection pour 10000 habitants a été proposé par analogie avec le niveau de risque initialement défini comme acceptable pour les *Giardia* (Regli *et al.*, 1991). Ce niveau de risque a conduit à définir un seuil d'efficacité de traitement minimal de 4 log pour la production d'eau potable à partir d'eaux superficielles (Macler and Regli, 1993).

Depuis 2003, l'OMS définit un risque acceptable exprimé en nombre d'« années de vie corrigées de l'incapacité » ou DALY qui traduit le temps pendant lequel la qualité de vie ou sa durée est restreinte du fait de la maladie. La DALY permet d'agréger différents effets sanitaires et d'intégrer la probabilité d'occurrence, la gravité et la durée de chacun d'eux. En pratique, chaque effet est pondéré par un coefficient de gravité et multiplié par la durée de l'effet et le pourcentage de personnes affectées, ce qui se traduit par l'équation :

$$DALY = \sum_i c_i \cdot d_i \cdot p_i$$

c_i : coefficient associé à la gravité de l'effet compris entre 0 (bon état de santé) et 1 (décès)

d_i : durée de l'effet

p_i : probabilité d'apparition de l'effet

L'OMS propose une valeur de 10^{-6} DALY/an comme risque acceptable pour les agents microbiologiques infectieux. En pratique, ce niveau de risque est appliqué à chaque micro-organisme de façon indépendante. Cet objectif correspond généralement à une concentration d'environ un micro-organisme pathogène infectieux dans 10^{4} ou 10^{5} litres.

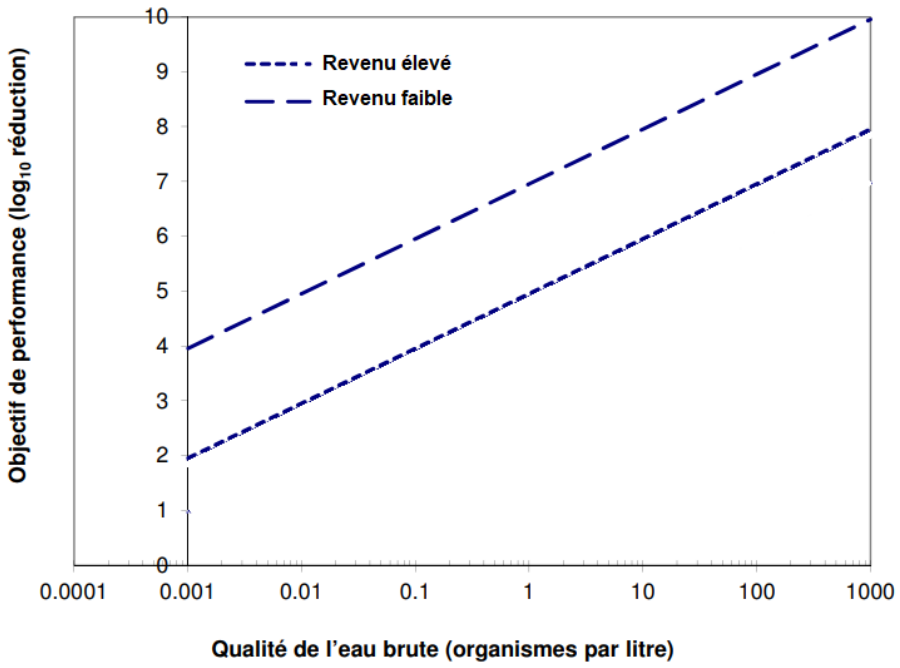


Figure 7 : Objectifs de performance de traitement pour le rotavirus en fonction du niveau de revenu et de la qualité de l'eau brute (d'après (OMS, 2017))

L'objectif de performance de traitement des agents pathogènes dépend de leur concentration dans l'eau brute, mais également du statut sanitaire de la population qui peut être reflété par le niveau de revenu des pays. Concernant le rotavirus utilisé comme modèle pour l'évaluation du risque viral lié à l'eau de distribution, cet objectif est respectivement de 5,96 et 7,96 log de réduction, dans les pays à revenu respectivement élevé et faible, pour une concentration initiale dans l'eau brute de 10 virus/L (Figure 7). Dans la Seine, les concentrations médianes en RV-A (génome) sont de l'ordre de 10^2 à 10^3 copies/L et peuvent ponctuellement atteindre plus de 10^4 copies/L. Une concentration de 10^3 copies/L implique un objectif de traitement d'au moins 8 log d'abattement en considérant par une approche conservative que les génomes détectés correspondent à des virus infectieux.

1.4.5. Limites actuelles d'évaluation du risque sanitaire

Les principaux facteurs limitant l'analyse quantitative du risque sanitaire concernent le manque de données fiables de contamination (AFSSA, 2007) dont notamment le manque de données reliant les indicateurs de contamination fécale à la contamination virale (Payment and Locas, 2011), ou renseignant sur les capacités de survie des virus dans les différents environnements et face aux traitements. Il n'existe par ailleurs pas de méthode de quantification standard, et en ce qui concerne les virus non cultivables la distinction entre les génomes infectieux et non infectieux est difficile à établir, même avec l'utilisation de plus en plus de tests d'intégrité des particules virales.

Enfin, les données permettant de caractériser les relations dose-réponse sont insuffisantes en particulier s'agissant de la sensibilité des populations et de la virulence des différents variants.

1.5. Conclusion

Les infections par les virus entériques humains sont très fréquentes et peuvent être asymptomatiques, ou se manifester par des maladies bénignes à mortelles. Ces virus représentent un risque de santé publique à l'échelle mondiale dont l'impact sanitaire dépend des conditions socio-économiques locales et est, entre autres, lié à la qualité de l'eau de consommation. Les coûts socio-économiques qui y sont associés peuvent être importants. Les virus entériques humains peuvent contaminer toutes les ressources hydriques situées à proximité des activités humaines. Si ces virus sont généralement présents en faibles concentrations dans les eaux souterraines naturellement protégées, leur prévalence est très élevée dans les eaux de surface avec des charges présentant une forte variabilité spatio-temporelle. Le manque de données concernant le maintien de leur potentiel infectieux dans l'environnement et au cours des traitements est l'une des limites à l'évaluation du risque sanitaire qui leur est associé.

2. Inactivation des virus entériques humains dans les milieux hydriques

2.1. Généralités

Les virus ne sont pas capables de se multiplier dans l'environnement, mais peuvent y persister longtemps, parfois même plusieurs années (Seitz *et al.*, 2011). Comme décrit dans les sections précédentes, des virus infectieux peuvent être détectés dans de nombreux types d'eaux, superficielles ou souterraines, ainsi que dans des eaux destinées à la consommation humaine en sortie des filières de potabilisation. Ceci démontre leur capacité à se disséminer dans l'environnement et à résister à différentes conditions environnementales. La persistance des virus leur permet de se propager dans les milieux aquatiques sur de longues distances et augmente les probabilités d'infecter un nouvel hôte (Fauvel *et al.*, 2017b; Sassi *et al.*, 2018). L'évaluation de la persistance des virus entériques est donc essentielle pour caractériser le risque sanitaire qui leur est associé.

La persistance virale dans les milieux aquatiques est la résultante de deux phénomènes distincts : d'une part, des processus d'inactivation par lesquels les virus perdent leur pouvoir infectieux et, d'autre part, de la vitesse à laquelle les virus s'adsorbent à des particules sédimentables et sont immobilisés dans les sédiments. Le premier phénomène est discuté dans ce chapitre 2, tandis que le second, qui met en jeu des interactions physiques entre les virus et d'autres particules est abordé dans le chapitre 3. Les virus peuvent être inactivés par une altération des protéines structurales constituant la capside ou une atteinte du génome (Pinon and Vialette, 2018), empêchant la réalisation d'au moins une étape nécessaire au processus infectieux telle que l'adhésion aux cellules cibles, l'internalisation (ou l'injection du génome dans le cas des phages), la décapsidation, le transport intracellulaire, la réplication du génome, la synthèse des protéines virales, l'encapsidation ou la lyse des cellules pour permettre leur dissémination à d'autres cellules.

Seul un nombre limité de virus entériques sont facilement cultivables *in vitro*, ce qui est pourtant le seul moyen de confirmer la présence d'un risque infectieux. En effet, si des modèles cellulaires existent pour les rotavirus, VHA, VHE, astrovirus et même désormais norovirus, leur culture est longue, techniquement fastidieuse ou limitée à certaines souches. Par exemple, seule la souche vaccinale HM175 du VHA peut être cultivée, seuls certains sérotypes d'astrovirus sont cultivables sur cellules Caco-2 (ou HT-29), et la culture des norovirus sur entéroïdes qui est expérimentalement complexe ne concerne que quelques génotypes. (Bhar and Jones, 2019; Herrmann *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 2017; Okamoto, 2011; Provost *et al.*, 1981; Saif *et al.*, 1988). Pour certains de ces virus, un modèle cellulaire adapté peut donc être utilisé pour évaluer l'efficacité d'un traitement d'inactivation après dopage initial d'un échantillon, mais ne peut renseigner sur le risque infectieux d'un échantillon inconnu. Dans les faits, lorsque l'infectivité d'un échantillon

environnemental est analysée, seuls les entérovirus, voire les adénovirus, sont recherchés (Hamza *et al.*, 2011). Aussi, la détection et la quantification des virus entériques dans l'environnement reste principalement basée sur des méthodes moléculaires (Hamza and Bibby, 2019). Des modèles viraux de substitution sont fréquemment utilisés pour suppléer aux limites et inconvénients des systèmes de culture des virus humains. Ces virus servent notamment à renseigner sur la persistance et la résistance aux traitements d'inactivation de virus d'intérêt non ou difficilement cultivables.

2.2. Modèles viraux de substitution

Les virus de substitution sont sélectionnés selon différents critères tels que leur innocuité pour l'Homme, la possibilité de les dénombrer rapidement à faible coût et surtout leurs cinétiques d'inactivation idéalement proches de celles des virus d'intérêts et pouvant donc avoir une valeur prédictive sur leurs cinétiques d'inactivation ou de transfert (Busta *et al.*, 2003). Dans le cadre de la rétention physique des virus, le choix des virus de substitution repose aussi sur des critères de similitude de structure (le plus souvent la taille, mais parfois la charge électrique ou l'hydrophobicité). Les substituts sont des virus cultivables ayant pour hôte des cellules animales ou bactériennes qui présentent des caractéristiques proches de celles des virus d'intérêt, ou bien parfois des pseudo-particules virales ou *virus like particles* (VLP) dépourvues de matériel génétique (Cook, 2013). Ces particules sont obtenues par expression dans un système cellulaire des gènes codant les protéines de capsides, capables de s'auto-assembler.

A titre d'exemple le bactériophages MS2 présente des similitudes avec les entérovirus par la taille, la structure icosaédrique, le génome ARN simple brin à polarité positive et le point isoélectrique (Lim *et al.*, 2010). Les phages Qβ, φX174 et PRD1 sont également parfois utilisés comme substituts (Gibson *et al.*, 2012; Hornstra *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2017). La pertinence des substituts dépend du mode d'élimination considéré. Le phage MS2 est un bon indicateur de l'inactivation du poliovirus 3 (PV3) par l'ozone (Finch and Fairbairn, 1991) et du poliovirus 1 (PV1) par les UV (Nuanualsuwan *et al.*, 2002). En revanche, le phage MS2 n'est pas un substitut conservateur de l'élimination du poliovirus 1 ou de l'adénovirus 40 par coagulation, contrairement au phage φX174 (Shirasaki *et al.*, 2016). Bertrand *et al.*(2012) qui ont conduit une méta analyse sur la sensibilité des virus entériques à la chaleur suggèrent l'utilisation des phages φX174 et PRD1 comme substituts conservateurs concernant les inactivations thermiques.

Plusieurs virus appartenant à la famille des *Caliciviridae* sont utilisés comme substituts pour les norovirus humains. Il s'agit du calicivirus félin (FCV), du calicivirus canin (CaCV), du virus Tulane, ainsi que du norovirus murin (MNV). Ce dernier, décrit pour la première fois en 2003, est le substitut le plus proche des norovirus humains du point des structures biochimique et moléculaire et de la

pathogenèse (Wobus *et al.*, 2006). Cannon *et al.*(2006) ont comparé la stabilité et l'inactivation du MNV et du FCV dans différentes matrices et conditions de température et pH pour évaluer leur pertinence en tant que substitut du norovirus humain. Ils ont montré que le MNV est plus stable que le FCV en milieu acide comme basique à des pH compris entre 2 et 10. Le MNV a également une stabilité supérieure au FCV à 56°C. Leur persistance à long terme est comparable à 4°C, mais le MNV est plus persistant que le FCV à température ambiante. De façon analogue, Bae *et al.*(2008) ont étudié la persistance du MNV et du FCV dans les eaux de surface et souterraine. Ils ont montré que les cinétiques d'inactivation du MNV sont comparables à celles du norovirus humain, tandis que le FCV est significativement moins stable. Le MNV est ainsi considéré comme un substitut pertinent pour évaluer la survie dans l'environnement du norovirus humain. Le virus Tulane, isolé du macacque rhésus et cultivable depuis 2008, est considéré comme faisant partie d'un nouveau genre de *Caliciviradae* nommé *Recovirus* génétiquement plus apparenté au genre *Norovirus* que tous les autres genres de *Caliciviridae* (Farkas *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2008). Il a de ce fait très vite été considéré comme un substitut valable pour étudier la persistance du norovirus humain (Drouaz *et al.*, 2015; Tian *et al.*, 2013). Le virus Tulane et le MNV ont une résistance à la chaleur (50°C à 75°C) ainsi qu'une persistance dans l'eau à 20°C comparables, mais le MNV est plus stable dans l'eau à 4°C, résiste mieux aux pH extrêmes, et est moins facilement inactivé par le chlore que le virus Tulane. Ce dernier serait donc un substitut moins approprié que le MNV (Hirneisen and Kniel, 2013).

Des VLP de norovirus humains et de rotavirus peuvent être produites *in vitro* par expression puis auto-assemblage des protéines de capside dans des cellules d'insectes. Les VLP de rotavirus permettent une évaluation conservative de la persistance des rotavirus dans l'eau et de leur résistance à différents traitements (Caballero *et al.*, 2004; Loisy *et al.*, 2004). La limite principale de l'utilisation des VLP est que leur quantification repose sur des méthodes immunologiques, de microscopie ou de cytométrie, dont les limites de détection sont élevées. De plus, de par sa charge négative, le génome d'un norovirus ou rotavirus peut influer sur les propriétés de leur surface et induire une différence de comportement en solution par comparaison aux VLP correspondantes qui n'ont pas de matériel génétique (Dika *et al.*, 2011).

Enfin, il existe des modèles viraux non humains qui, outre le fait que ce sont des indicateurs viraux de contamination fécale, présentent des cinétiques de persistance dans l'environnement comparables à celles de certains virus humains. Il s'agit par exemple des bactériophages somatiques et des bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH). Les premiers s'attachent à un récepteur de la paroi bactérienne tandis que les seconds s'attachent au *pilus* présent chez les bactéries porteuses du plasmide codant le facteur F. Ces bactériophages ont un comportement similaire à celui des virus entériques humains dans les STEU, ainsi qu'une persistance comparable dans les milieux aquatiques

(McMinn *et al.*, 2017). Par ailleurs, un intérêt croissant se porte sur un pathogène de plante, le virus de la marbrure bénigne du piment ou PMMoV (*Pepper Mild Mottle Virus*), identifié pour la première fois par métagénomique dans des fèces humaines, dans lesquelles il représentait la majorité des virus à ARN (Zhang *et al.*, 2006). Ce virus est un très bon indicateur de la persistance des virus entériques humains dans les eaux souterraines ou de surface impactées par des eaux usée domestiques non traitées (Symonds *et al.*, 2018). Plus récemment encore les CrAssphages, des bactériophages de bactéries du genre *Bacteroides* présents dans le tube digestif de la moitié de la population, dans lequel ils représenteraient 90 % du virome, ont été identifiés par cross-Assemblage de données métagénomiques (Shkoporov *et al.*, 2018). Des travaux récents indiquent qu'ils seraient un meilleur indicateur de contamination fécale que le PMMoV, notamment car leur concentration dans les eaux usées est très élevée (10^6 copies/mL) (Malla *et al.*, 2019b, 2019a). La connaissance sur ces virus est encore parcellaire, et leur persistance dans l'environnement n'a pas encore été documentée.

2.3. Persistance dans les environnements hydriques

2.3.1. Eau souterraine

De nombreuses études telles que celles citées ci-après ont été menées pour évaluer la persistance des virus, mesurée par culture, dans différentes matrices hydriques environnementales incubées en laboratoire. Dans la plupart, les incubations ont été réalisées à plusieurs températures. Yates *et al.*(1985) ont analysé la vitesse d'inactivation du MS2, du PV1 et de l'échovirus 1 dans des échantillons d'eau souterraine issus de 11 sites. L'abattement maximal journalier d'infectivité parmi ces trois virus était de 0,064 log à 4 °C, 0,186 log à 12 °C, et 0,628 log à 23 °C. Bae et Schwab (2008) ont également analysé la persistance d'un panel de virus dopés dans des échantillons d'eau souterraine. À 25 °C, l'abattement viral par jour, mesuré par culture, était de 0,09 log pour le MS2, 0,04 log pour le MNV, 0,12 log pour le FCV et 0,09 log pour le PV. À 4 °C l'abattement maximal était celui du FCV avec 0,06 log par jour. Cette persistance virale élevée à basse température a également été rapportée par Sobsey *et al.*(1986) qui ont montré que le PV 1, le VHA et l'échovirus 1 dopés dans des échantillons d'eau souterraine conservés à 5 °C étaient capables de persister plus 12 semaines avec moins de 1 log d'inactivation. Charles *et al.*(2009) ont comparé les cinétiques d'inactivation de virus entériques et de substituts dans les eaux souterraines à 12 °C. Dans l'ordre du plus au moins stable, les virus étaient le phage φX174, l'adénovirus 2, le phage PRD1, le PV 3 et le coxsackievirus B1. Le phage φX174 pourrait ainsi être un indicateur conservateur de la persistance des virus entériques dans les eaux souterraines. S'agissant plus particulièrement de l'adénovirus 2, les auteurs ont observé une diminution biphasique comprenant tout d'abord un abattement initial rapide de l'infectivité atteignant 4,2 log après 21 jours, suivi d'une phase de persistance accrue caractérisée par

une vitesse d'abattement de 0,02 log par jour. Dans cette étude, des adénovirus infectieux étaient encore détectés après 364 jours. D'autres travaux menés par Ogorzaly *et al.*(2010) ont confirmé la forte persistance des adénovirus. Les auteurs ont constaté une cinétique de perte d'infectivité de l'adénovirus 2 de seulement 0,0076 log par jour à 4 °C et 0,0279 log par jour à 20 °C dans des eaux souterraines. Des virus infectieux étaient toujours présents après 120 jours d'incubation, avec des abattements de 2,4 et 0,7 log respectivement à 20 °C et 4 °C.

De plus, Espinosa *et al.*(2008) ont étudié la persistance du rotavirus simien RRV et de l'astrovirus humain sérotype 8 dans de l'eau souterraine maintenue à 15 °C à l'obscurité. Un abattement de 2 log d'infectivité du RRV a été observé après 90 jours, et 3 log après 150 jours. Le RRV est ensuite resté très stable, à une valeur d'environ 10^3 FFU/mL, entre 150 jours et 7 mois (fin de l'expérience). L'astrovirus était moins stable que le RRV, avec un abattement d'infectivité supérieur à 3 log après 60 jours suivi d'une phase de persistance sans diminution d'infectivité jusqu'à 120 jours. La Figure 8 synthétise les vitesses d'inactivation virale dans des eaux souterraines reportées dans les études précitées.

Enfin, il n'existe pas de données sur la persistance du PMMoV dans les eaux souterraines, mais sa forte abondance et prévalence dans les aquifères karstiques suggèrent qu'il y serait très persistant (Rosiles-González *et al.*, 2017).

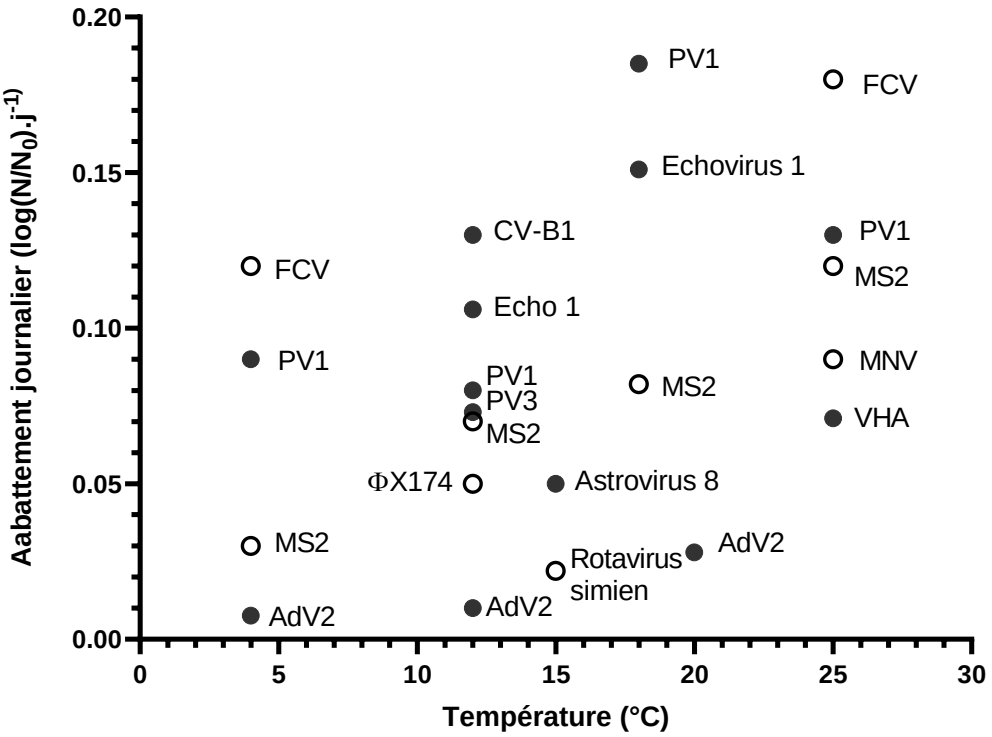


Figure 8 : Abattement journalier de virus entériques humains (●) et modèles (○) dans des eaux souterraines incubées en laboratoire à différentes températures.

2.3.2. Eau de surface

Un certain nombre d'études citées précédemment se sont attachées à comparer la persistance des virus dans les eaux souterraines et les eaux de surface. Toutes s'accordent sur le constat que les virus sont plus persistants dans les eaux souterraines que dans les eaux de surface.

O'brien et Newman (1977) ont constaté plus de 3 log de réduction d'infectivité du PV1 et du coxsackievirus B1 après 4 jours d'incubation *in situ* dans de l'eau de rivière (Rio Grande) à une température comprise entre 23 °C et 27 °C. Dans l'étude de Bae et Swab (2008), l'abattement viral journalier dans de l'eau de surface maintenue à 25 °C en laboratoire, mesuré par culture, était de 0,13 log pour le MS2, 0,16 log pour le MNV, 0,40 log pour le FCV et 0,19 log pour le PV. À 4 °C les abattements journaliers étaient de 0,05 log pour le MS2, 0,19 pour le FV et 0,16 pour le PV. Espinosa *et al.*(2008) ont étudié la persistance du rotavirus simien RRV et de l'astrovirus humain dans de l'eau issue d'un canal impacté par des eaux usées chargées en indicateurs bactériens fécaux, conservées à température ambiante avec une alternance de lumière naturelle et d'obscurité. L'abattement de RRV infectieux atteignait 1,6 log après 30 jours et 4 log après 180 jours. L'inactivation de l'astrovirus était plus conséquente avec un abattement de 4 log au jour 30.

Enfin, Prevost *et al.*(2016) se sont intéressés à la persistance d'infectivité de l'adénovirus 41 et du coxsackievirus B2 ajoutés à des échantillons d'eau de surface et conservés à l'obscurité. La durée permettant d'atteindre 1 log d'inactivation était à 4 °C de 28,8 jours pour l'adénovirus 41 et 14,3 jours pour le coxsackievirus B2. À 20 °C, 1 log d'inactivation était atteint pour ces deux virus après environ 3 jours, soit environ 0,3 log/j.

Plusieurs éléments expliquent les différences de persistance virale constatées dans l'environnement entre les eaux de surface et les eaux souterraines. Les eaux souterraines ont une température relativement constante, tandis que celle des eaux de surface n'est pas homogène dans la colonne d'eau et sujette à fluctuations. De plus, les eaux de surface, plus riches en oxygène dissout et matières en suspension, contiennent une quantité de micro-organismes bien plus importante que les eaux souterraines. Enfin, contrairement aux eaux de surface, les aquifères sont protégées de la lumière solaire.

2.3.3. Facteurs environnementaux affectant l'inactivation virale dans les ressources en eau

2.3.3.1. Température

L'ensemble des études citées précédemment ayant analysé l'effet de la température ont mis en évidence une persistance virale accrue à basse température. La température est de fait le principal facteur déterminant l'inactivation des virus dans les environnements hydriques (Bertrand *et al.*, 2012; John and Rose, 2005; Yates *et al.*, 1988, 1985). Dans une revue visant à évaluer l'impact de

différents paramètres sur l'inactivation des virus dans les eaux souterraines, John et Rose (2005) ont montré que la température, en particulier au-dessus de 20 °C, est un paramètre affectant l'ensemble des virus, contrairement à d'autres paramètres comme l'association aux particules de l'environnement ou l'activité microbienne dont l'effet sur la persistance dépendent du virus considéré. Ainsi, l'inactivation des virus dans l'environnement est en partie contrôlée par le climat et les saisons. La persistance du coxsackievirus B5 a été évaluée dans de l'eau de mer *in situ* grâce à l'utilisation de sacs de dialyse. En été (température de l'eau entre 21 °C et 26 °C), un abattement de 5 log (soit la totalité des virus initiaux) a été constaté en 50 jours, tandis qu'en hiver (température de l'eau entre 4 °C et 16 °C) seulement 2 log d'inactivation étaient atteints en 80 jours. Les auteurs attribuent directement cet écart à la température de l'eau, mais ne précisent pas si les sacs de dialyse utilisés sont opaques, et donc la contribution de l'ensoleillement à l'inactivation (Lo *et al.*, 1976).

Dans les milieux aquatiques, la température participe à l'inactivation virale de façon directe en altérant la structure des capsides virales par dénaturation des protéines structurales, mais peut aussi avoir un effet indirect en fonction des caractéristiques physico-chimiques des milieux. À température égale, les virus sont plus lentement inactivés dans les matrices simples comme les eaux souterraines que dans les eaux environnementales complexes telles que les lacs, rivières, mers, tourbières, étangs, certains puits riches en matières organiques ou encore les eaux usées. Dans ces milieux, les températures élevées favorisent l'activité métabolique microbienne et donc les phénomènes de prédation ou de dégradation (Bertrand *et al.*2012).

2.3.3.2. Lumière solaire

Après la température, les rayons ultra-violets (UV) de la lumière solaire sont la seconde cause d'inactivation des virus dans les environnements non souterrains (Fong and Lipp, 2005). Johnson *et al.*(1997) ont constaté 1 log d'inactivation du PV après 24 h d'incubation dans de l'eau de mer à l'obscurité, contre 2 log à la lumière solaire. Siton *et al.*(2002) ont montré que dans une matrice d'eau de rivière la vitesse d'inactivation des coliphages somatiques et des bactériophages ARN-F spécifiques était plus de dix fois supérieure à la lumière solaire qu'à l'obscurité. L'inactivation par les UV est d'autant plus élevée que la turbidité de l'eau est faible car les matières en suspension en absorbent les rayonnements (Hill *et al.*, 1967). L'inactivation par la lumière solaire est également potentialisée par une concentration élevée en sels (Sinton *et al.*, 2002; Susan Springthorpe *et al.*, 1993).

La lumière solaire inactive les virus via des mécanismes directs et indirects liés aux rayonnements ultra-violets (UV). Les UV comprennent des plus aux moins énergétiques les UV-C

(100-280 nm), les UV-B (280-220 nm) et les UV-A (315-400 nm), mais la totalité des UV-C et une partie des UV-B sont filtrés par la couche d'ozone et n'atteignent donc pas la surface terrestre. Les UV-B sont les principaux contributeurs à l'inactivation virale par la lumière solaire. D'une part, ils altèrent directement les génomes viraux en créant des photoproduits inhibant la réplication, et détériorent dans une moindre mesure les protéines (Schuch and Menck, 2010). D'autre part, en présence de certaines molécules organiques ou inorganiques (constitutives des virus ou d'origine exogène) les UV induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène capables (ROS) de dégrader le matériel génomique ou protéique viral (Romero *et al.*, 2011). Les éléments à l'origine des ROS peuvent être la matière organique naturelle en solution, des sensibilisants produits par des micro-organismes comme les riboflavines et porphyrines ou encore des éléments métalliques tels que le cuivre et le fer (Joshi and Keane, 2010; Kohn *et al.*, 2007; Nieto-Juarez *et al.*, 2010). Les UV-A qui sont les moins énergétiques causent peu de dommages directs mais peuvent contribuer significativement à l'inactivation virale de façon indirecte via la formation de ROS (Sun *et al.*, 2016).

2.3.3.3. Microbiote

Un troisième facteur majeur affectant la persistance virale est la quantité et la composition des communautés microbiennes. L'ensemble des travaux ayant étudié ce paramètre s'accordent sur le fait que les virus infectieux persistent moins longtemps dans des eaux environnementales brutes que dans des eaux stérilisées par filtration, autoclavage, ébullition, ou additionnées d'antibiotiques (Alvarez *et al.*, 2000; Fujioka *et al.*, 1980; Herrmann *et al.*, 1974; Sobsey *et al.*, 1986; Ward *et al.*, 1986). Par exemple, Raphael *et al.*(1985) n'ont pas observé de diminution notable d'infectivité du rotavirus humain après 64 jours d'incubation à 4 °C dans de l'eau de rivière filtrée (0,22 µm), alors que 1 log d'abattement était observé en 10 jours dans la même eau non filtrée. Herrmann *et al.*(1974) ont montré que les entérovirus étaient inactivés plus rapidement en présence d'un microbiote autochtone, en particulier de bactéries présentant une activité protéolytique extracellulaire comme *Pseudomonas aeruginosa*. Les auteurs ont noté une diminution de 5 log d'infectivité du coxsackievirus A9 et du PV1 dans l'eau d'un lac, *in situ*, après 9 et 21 jours respectivement. En revanche pendant la même durée 2 log de réduction d'infectivité de ces deux virus ont été observés dans l'eau du lac stérilisée par filtration. Dans une autre étude, Gordon *et al.*(2003) ont évalué l'impact de différents paramètres tels que la présence de micro-organismes, la température et la teneur en oxygène et nutriments sur la persistance du MS2, du PV et d'un coxsackievirus dopés dans des échantillons d'eau souterraine incubée au laboratoire. Les durées de persistance du poliovirus et du coxsackievirus à 28 °C (exposition à la lumière non précisée) étaient respectivement de 165 jours et 109 jours dans des échantillons stérilisés par filtration et de 4 jours et 3 jours dans des échantillons non filtrés contenant les micro-organismes endogènes. Dans cette

étude, pour les trois virus considérés, la présence de micro-organismes autochtones -et donc l'activité microbiologique et planctonique- était le facteur affectant le plus l'abattement viral.

Ward *et al.*(1986) ont observé que l'infectivité de l'échovirus 12 décroissait dans de l'eau de rivière, et que cet effet virucide dépendait de la présence de micro-organismes. Ils ont en particulier constaté qu'une grande proportion d'isolats bactériens (22/27) issus d'eau de rivière remis en culture dans de l'eau stérile diminuaient fortement l'infectivité virale, et que cet effet s'accompagnait du clivage des protéines de capside et, dans une moindre mesure, de l'ARN viral. Ces auteurs ont ainsi suggéré que des enzymes protéolytiques secrétées par les bactéries inactiveraient les virus en clivant les protéines virales et en rendant les ARN viraux accessibles aux nucléases. Les conditions favorisant le métabolisme microbien comme une température et une teneur en oxygène dissous élevées participeraient donc de façon indirecte à l'inactivation virale dans l'environnement.

2.4. Traitements d'inactivation

2.4.1. Généralités

Les traitements visent à diminuer le nombre d'agents pathogènes et ramener le niveau de risque qui leur est associé à une valeur acceptable. La production d'eau potable nécessite, surtout lorsque la ressource en eau est de mauvaise qualité, la mise en place d'un traitement multi-barrières, mettant successivement en jeu différentes techniques permettant soit la rétention des virus, soit leur inactivation (Figure 9). Ces deux mécanismes participent à l'élimination des virus. La rétention des virus s'effectue au cours des différentes étapes de filtration (filtration avec procédé chimique, filtration sur berge, filtration granulaire à grande vitesse, filtration sur sable lente ou rapide, filtration sur membrane) ainsi que lors de la coagulation, floculation et sédimentation. L'efficacité de l'élimination mécanique des virus par filtration dépend notamment de leur taille, forme, hydrophobicité et point isoélectrique (Boudaud *et al.*, 2012). Sur le modèle d'une usine de traitement des eaux de surface à Paris, les premières étapes de traitement (coagulation, floculation, décantation ou exceptionnellement flottation, filtration) permettent la clarification de l'eau, c'est-à-dire une réduction de la teneur en particules et en matière organique. Une clarification suffisante permet par la suite d'inactiver de façon efficiente les pathogènes.

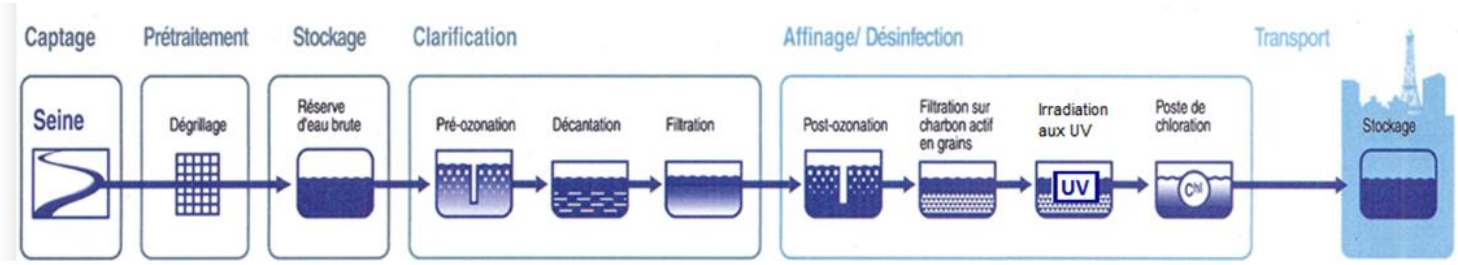


Figure 9 : Filière de production d'eau potable à partir d'eau de surface : exemple de l'usine d'Orly (d'après une communication interne, Eau de Paris)

Les méthodes permettant l'élimination des micropolluants, telle que la filtration sur charbon activé, ne permettent pas d'éliminer efficacement les virus, dont l'inactivation nécessite la mise en œuvre de traitements de désinfection. La désinfection primaire a pour objectif d'inactiver l'ensemble des micro-organismes pathogènes. Les principaux désinfectants sont le chlore libre, les monochloramines, le dioxyde de chlore, l'ozone et les rayons ultra-violets (UV). Les quatre premiers sont des désinfectants chimiques oxydants tandis que les UV sont un traitement physique basé sur des radiations électromagnétiques. La combinaison de plusieurs traitements permet d'élargir le spectre d'efficacité à des pathogènes présentant une résistance accrue à un traitement donné (Figure 10). Un traitement stabilisant rémanent est enfin fréquemment réalisé. Il consiste en l'introduction d'une faible concentration d'agent oxydant dans l'eau en sortie d'usine avant sa mise en distribution afin de limiter la croissance bactérienne dans le réseau jusqu'au consommateur.

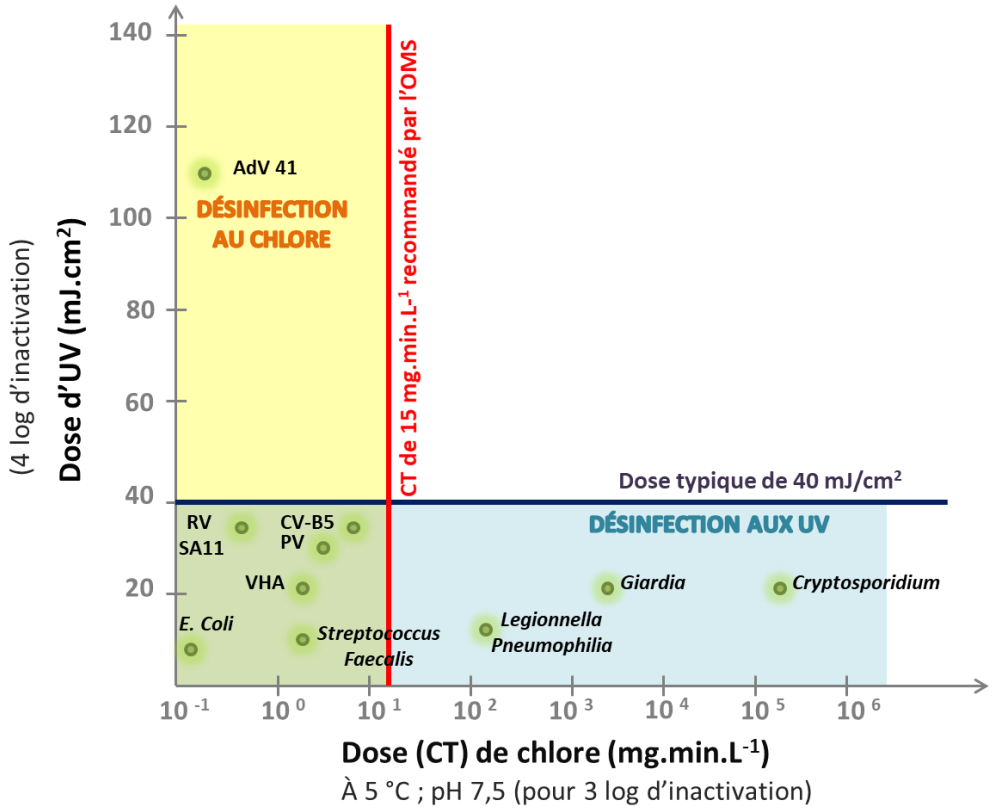


Figure 10 : Avantage d'une désinfection multi-barrières : doses de chlore et d'UV permettant des abattements respectifs de 3 log et 4 log de micro-organismes pathogènes, et spectre d'efficacité aux doses recommandées par l'OMS (issu de Ireland *et al.*(2011)).

Le traitement thermique est un mode d'inactivation très couramment utilisé que ce soit dans les secteurs agro-alimentaire ou médical pour éliminer les organismes pathogènes dans les denrées alimentaires ou sur les dispositifs médicaux (pasteurisation, stérilisation, thermisation). L'évaluation de la sensibilité des virus lors d'expositions à des températures plus ou moins élevées est également un moyen de caractériser la stabilité de la structure des virus et renseigne indirectement sur leur capacité à persister dans l'environnement (Bertrand *et al.*, 2012).

Les virus entériques qui forment un groupe hétérogène de virus diffèrent les uns des autres notamment en termes d'organisation et de composition de la capside ainsi que de type, taille et structure du génome. Il existe de ce fait une variabilité de sensibilité aux traitements qui dépend également des procédés d'inactivation. Cette section 2.4 a pour but de résumer l'efficacité de plusieurs modes d'inactivation sur différents virus entériques ou substituts, et d'apporter un éclairage sur les mécanismes sous-jacents.

2.4.2. Méthodes d'étude des mécanismes d'inactivation

Une méthode d'inactivation est efficace lorsqu'elle empêche la réalisation d'au moins une fonction essentielle au cycle viral telle que la reconnaissance et la liaison aux récepteurs cellulaires, l'internalisation et la décapsidation, la réplication du génome puis l'assemblage et la libération de nouvelles particules. S'il est depuis longtemps connu que ces fonctions sont altérées par des dommages aux protéines et/ou au génome (O'Brien and Newman, 1979; Roy *et al.*, 1981), les mécanismes moléculaires ont pu être approfondis ces quinze dernières années grâce au développement des outils de biologie moléculaire et des méthodes analytiques, dont quelques-unes sont reportées dans le Tableau 8 (Jin *et al.*, 2012, 2013; Li *et al.*, 2004; Mayer *et al.*, 2015; Page *et al.*, 2010; Sigstam *et al.*, 2013; Simonet and Gantzer, 2006a; Wigginton *et al.*, 2012a).

Tableau 8 : Exemples de méthodes utilisées pour l'étude des mécanismes moléculaires d'inactivation virale

FONCTIONS VIRALES		Exemple
Liaison aux cellules cibles	Titration des virus associés aux cellules	(Wigginton *et al.*, 2012b)
Liaison aux récepteurs *in vitro*	Méthode immuno-enzymatique ELISA Couplage du récepteur viral à des billes magnétiques	(Nuanualsuwan and Cliver, 2003) (Araud *et al.*, 2016)
Injection du génome (phage)	Co-incubation phage/bactérie en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique (chloramphénicol), dissociation des pili et quantification des génomes viraux intracellulaires	(Wigginton *et al.*, 2012b)
Réplication du génome	Cinétique de synthèse de génome viral dans la cellule hôte	(Nguyen *et al.*, 2019)
Production de virus infectieux	Cinétique de croissance virale en culture	(Zhong *et al.*, 2017b)
STRUCTURE ET CARACTERISTIQUES PYSICO-CHIMIQUES DES PARTICULES		
Taille	Microscopie électronique à transmission (MET), diffusion dynamique de la lumière (DLS)	(Brié *et al.*, 2017)
Charge	Mobilité électrophorétique	(Brié *et al.*, 2017)
Hydrophobicité	Adhésion sur billes hydrophobes	(Brié *et al.*, 2017)
Intégrité de la capside	Incubation des particules avec de la RNase, ou un monoazide photoréactif (PMA, EMA) couplée à une quantification par (RT)qPCR	(Nuanualsuwan *et al.*, 2002; Prevost *et al.*, 2016)
Antigénicité	Capture des virus par des anticorps monoclonaux et titration	(Nuanualsuwan and Cliver, 2003)
ALTERATION DES CONSTITUANTS		
Dégradation du génome	(RT)qPCR de longs fragments (≈ 1000 nucléotides)	(Simonet and Gantzer, 2006b)
Dégradation des protéines	Spectrométrie de masse	(Wigginton *et al.*, 2012b)
Altération des acides aminés	Spectrométrie de masse Détection des groupements carbonyle par biotine-hydrazide/avidine	(Wigginton *et al.*, 2010) (Sano *et al.*, 2010)

2.4.3. Inactivation thermique

2.4.3.1. Efficacité

L'étude de la stabilité thermique des virus a initialement été motivée par la nécessité d'identifier les températures permettant d'éliminer le risque d'infection via l'alimentation, mais également de mettre au point des vaccins à base de virus atténués suffisamment thermostables pour conserver leur caractère immunogène lors du transport et du stockage, en particulier dans les pays en développement à climat tropical. La connaissance de la stabilité des vaccins, notamment le taux de perte d'activité à une température donnée, aide en effet à déterminer les conditions optimales de stockage (Galazka *et al.*, 1998; Melnick, 1984). De nombreuses études ont mesuré les niveaux d'abattement viral dans différentes conditions correspondant aux temps d'exposition et températures pratiqués dans l'industrie agro-alimentaire. Par exemple, les températures comprises entre 65 °C et 88 °C maintenues pendant quelques secondes à quelques minutes reflètent des conditions de pasteurisation et permettent un abattement d'au moins 4 log d'infectivité. Les inactivations à des températures inférieures à 37 °C sont utilisées pour évaluer la stabilité des virus dans l'environnement, mais la diminution du titre infectieux, lente à ces températures, doit être mesurée pendant plusieurs jours à plusieurs mois (Fields *et al.*, 2007). Par exemple, à 20 °C dans de l'eau potable déchlorée l'infectivité de coxsackievirus B2 et l'adénovirus 41 décroit de 1 log en 12 et 14,2 jours respectivement, et de 4 log en 79,2 et 97,3 jours (Prevost *et al.*, 2016). Néanmoins, les mécanismes d'inactivation à basses températures sont les mêmes jusqu'à environ 50°C (Bertrand *et al.*2012), si bien que des inactivations à 50 °C accélèrent les cinétiques tout en permettant de pouvoir comparer la persistance dans l'environnement de différents virus.

Les inactivations à températures intermédiaires comprises entre 45 °C et 65 °C environ présentent un intérêt particulier car dans cet intervalle se situe une température de transition, variable d'un virus à l'autre, à partir de laquelle l'infectivité décroit rapidement. Selon la méta-analyse de Bertrand *et al. (*2012) la vitesse d'inactivation des virus entériques augmente à partir de 50 °C, mais les auteurs soulignent que relativement peu de données ont été publiées sur des inactivations autour 50 °C et que des travaux sont encore nécessaires pour évaluer la sensibilité des virus entre 40 °C et 60 °C. À ces températures l'abattement viral n'est souvent pas total, ce qui permet de comparer la stabilité des différents virus et substituts et renseigne indirectement sur la persistance relative des différents virus dans l'environnement.

L'efficacité de l'inactivation thermique dépend de la température et du temps d'exposition, et varie selon le virus considéré (Figure 11, Tableau 9). Les calicivirus murin et félin, les norovirus humains et le bactériophage φX174 sont les plus résistants aux températures élevées. Un traitement

à une température comprise entre 60 °C et 65 °C est néanmoins généralement suffisant pour abattre 4 log du titre infectieux de la plupart des virus entériques.

Tableau 9 : Inactivation des virus entériques et de virus modèles par traitement thermique, mesurée par culture. PBS : *Phosphate buffered saline* ; TBS : *Tris-buffered saline*

Virus	Température (°C)	Temps de contact (min)	Abattement (Log_{10})	Matrice	Référence
Adénovirus 5	45	10	1	PBS	(Leifels *et al.*, 2015)
	55	10	3		
	65	10	5,5		
FCV	50	30	3,5	Eau	(Lee and Gillespie, 1973)
	60	30	2,1	PBS	(Gibson and Schwab, 2011)
MNV	45	10	0	PBS	(Leifels *et al.*, 2015)
	55	10	2,5		
	65	10	4		
	60	10	3,6	PBS	(Seo *et al.*, 2012)
	60	30	2,2	PBS	(Gibson and Schwab, 2011)
Poliovirus 1	45	10	2	PBS	(Leifels *et al.*, 2015)
	55	10	3		
	65	10	7		
	55	30	> 5	Eau	(Strazynski *et al.*, 2002)
Rotavirus A	45	10	0,8	PBS	(Leifels *et al.*, 2015)
	55	10	3		
	65	10	4		
	50	10	2	DMEM	(O'Mahony *et al.*, 2000)
		30	4		
	55	10	3		
		30	5		
	60	10	7		
Rotavirus simien SA11	50	30	2	TBS	(Estes *et al.*, 1979)
VHA	55	4	1	PBS	(Parry and Mortimer, 1984)
	60	4	2		
	65	4	4		
	70	4	> 6		
Bactériophage φX174	45	10	0	PBS	(Leifels *et al.*, 2015)
	55	10	0		
	65	10	3,5		
Bactériophage MS2	72	3	8	Tampon salin (5 mM NaH2PO)	(Pecson *et al.*, 2009)

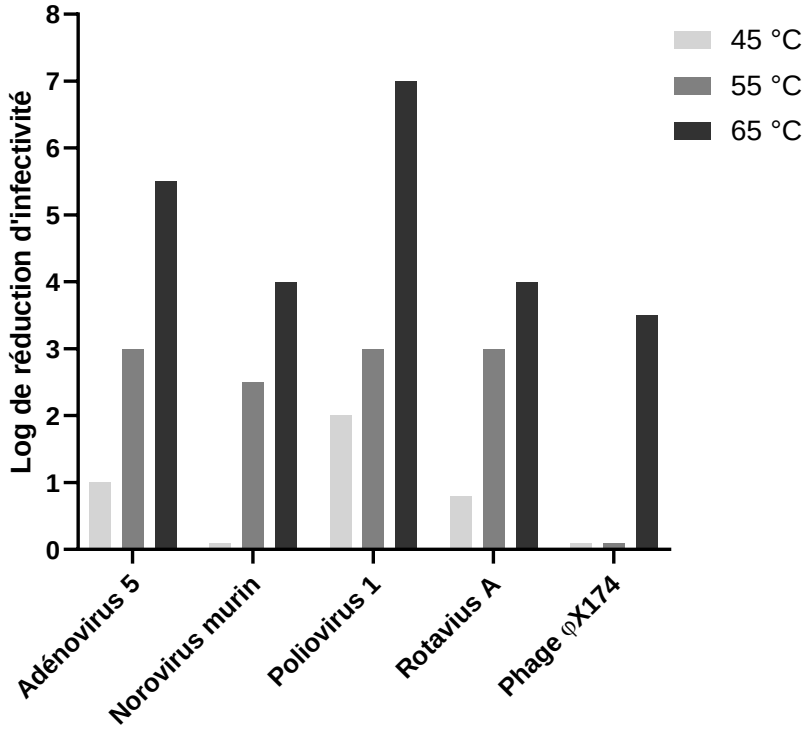


Figure 11 : Abattement de quelques virus entériques ou modèles, inactivé pendant 10 min à 45 °C, 55 °C ou 65 °C dans du PBS (d'après Leifels *et al.*(2015)).

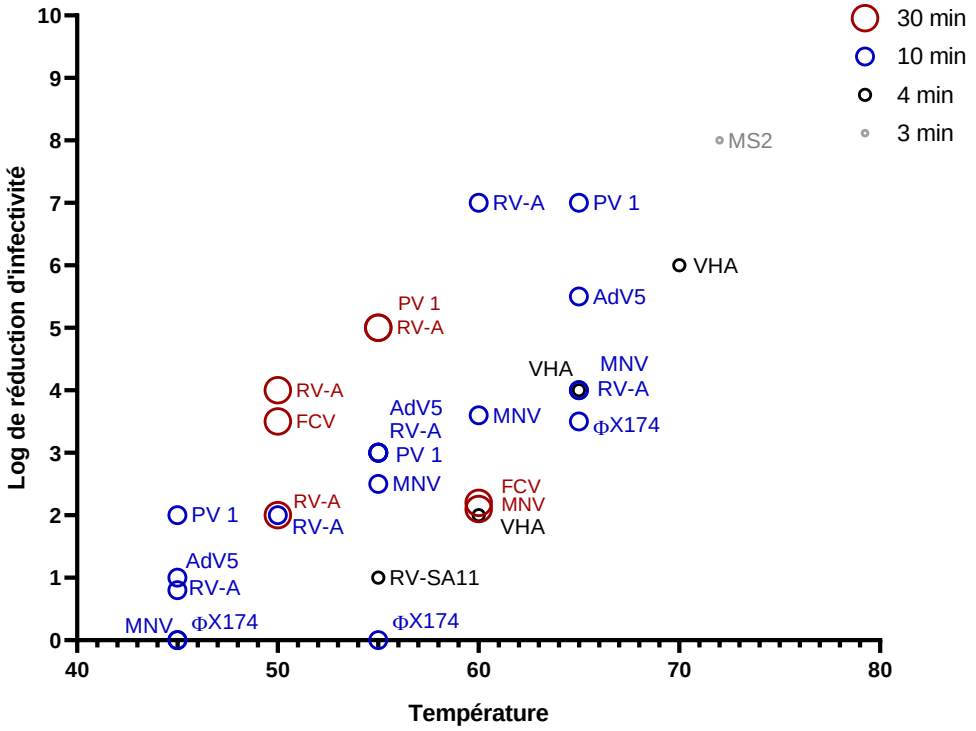


Figure 12 : Abattement de virus entériques ou modèles à différentes températures et en fonction du temps, dans de l'eau ou un tampon salin (données issues du Tableau 9)

2.4.3.2. Mécanisme

L'inactivation des virus non enveloppés par la température repose principalement sur l'altération des protéines de capside. L'augmentation de la température a pour effet de détruire les liaisons hydrogène et d'affaiblir, au sein de la capside, les interactions nécessaires au maintien de l'intégrité structurale. Ce phénomène se manifeste notamment par une expansion des capsides virales de quelques nanomètres (Belnap *et al.*, 2000; Brié *et al.*, 2016). Les génomes viraux sont au contraire particulièrement stables et sont très peu dégradés lors des inactivations thermiques, même à des températures de pasteurisation (Bertrand *et al.*, 2012; Pecson *et al.*, 2009).

Dès 1955, des travaux ont montré qu'un traitement de 20 min à 60 °C altère les motifs antigéniques des trois types de PV (Le Bouvier, 1955). Breindl (1971) a étudié le mécanisme d'inactivation du PV 1 (souche Mahoney) traité à 50 °C pendant 10 min ou 30 min en mesurant la densité des différents constituants viraux à l'issue de l'inactivation. Dans cette étude, le premier évènement observé était la désolidarisation de la protéine de capside VP4 du reste de la particule. VP4 est une petite protéine normalement située sur la face interne de la capside dont elle stabilise la structure mais qui protrude à la surface de la capside à partir d'une certaine température. La seconde étape était la libération de l'ARN viral. Dans le cas des adénovirus, la chaleur provoque la destructuration de la base du penton, principale zone de fragilité de la capside, et la dissociation des fibres nécessaires à la liaison aux cellules cibles (Russell *et al.*, 1967).

Le mécanisme d'inactivation dépend de la température. Jusqu'à une température de transition comprise entre 45 °C et 72 °C selon les virus, la perte d'infectivité est le fait de l'altération des récepteurs viraux et des structures nécessaires à la liaison aux cellules cibles, sans perte d'intégrité des capsides. Au-delà de la température de transition des changements structuraux s'opèrent et la cinétique d'inactivation s'accélère (Bertrand *et al.*, 2012; Volkin *et al.*, 1997). Ces modifications structurales s'accompagnent d'une évolution des propriétés de surface. Par exemple le point isoélectrique du PV change à 56 °C (O'Brien and Newman, 1979). Quelques travaux présentés ci-dessous décrivent les modifications physico-chimiques ou fonctionnelles s'opérant au voisinage de la température de transition.

Volkin *et al.*(1997) ont étudié les modifications structurales du VHA soumis à une augmentation graduelle de température, par spectroscopie à fluorescence. Cette technique permet de mesurer la longueur d'onde du pic d'émission de la fluorescence intrinsèque du virus, qui renseigne sur les modifications de la capside. L'ajout de molécules fluoresçant après liaison à l'ARN viral ou à des structures hydrophobes a ensuite permis d'affiner la compréhension des modifications structurales. Les auteurs ont reporté des changements discrets d'émission de fluorescence entre 40 °C et 60 °C, puis une transition majeure et irréversible de la longueur d'onde du pic d'émission (de

330 nm à 350 nm) entre 60 °C et 62 °C. Cette transition traduit l'exposition des résidus tryptophane initialement localisés dans les régions hydrophobes internes de la capside, et s'accompagne d'une perte d'antigénicité. Cette transition correspond aussi à une perte d'intégrité des capsides à 62 °C. De plus, une deuxième phase de dénaturation plus avancée des protéines, se manifestant par l'exposition de nouvelles régions hydrophobes, a été mise en évidence à 65 °C.

Brié *et al.* ont observé une modification de la capside par exposition réversible des résidus hydrophobes du MS2 à 60 °C. La température critique associée à la déstructuration et à la perméabilité irréversibles des capsides serait autour de 67 °C pour le MS2, et 72 °C pour le MNV (Brié *et al.*, 2016, 2017a). La perte d'infectivité est néanmoins déjà notable en dessous de la température critique de destructuration, que ce soit pour MNV ou les autres virus (Figure 11). S'agissant du norovirus, Ausar *et al.*(2006) ont observé que la capside des VLP expose des résidus hydrophobes à 55 °C mais demeure stable jusqu'à 60 °C (à pH compris entre 3 et 7), température qui correspond à un début de transition se manifestant par une perturbation des structures secondaires (repliements locaux des chaînes polypeptidiques), tertiaires (structure tridimensionnelle) et quaternaires (agencement des protéines entre elles). À 65 °C les VLP perdent leur structure icosaédrique et leur morphologie est irrégulière.

Wigginton (2012b) ont étudié les conséquences des différents modes d'inactivation sur trois fonctions nécessaires à l'infectivité du MS2 : la capacité à se lier aux cellules hôtes, à y injecter leur génome, et à l'y répliquer. Ils ont montré que la perte d'infectivité du MS2 après inactivation à 72 °C était entièrement attribuable à la perte de capacité d'adhésion aux cellules cibles. En revanche, il n'y avait pas de modification chimique détectable par MALDI-TOF des protéines.

Nuanualsuwan *et al.* (2002) ont également décrit les changements fonctionnels des capsides du VHA, du PV et du FCV induits par différents modes d'inactivation, notamment lors d'inactivations thermiques complètes à 72 °C (quelques secondes) et à 37 °C (plusieurs semaines). Cette dernière température permet d'étudier la façon dont les virus perdent naturellement leur potentiel infectieux dans l'organisme à température physiologique. Les génomes des trois virus inactivés à 37 °C puis traités à la RNase et à la protéine K étaient détectables par PCR, démontrant l'intégrité des capsides. En revanche, après inactivation à 72 °C, les génomes étaient dégradés. De plus, tous les virus inactivés thermiquement avaient perdus leur capacité de liaison aux cellules cibles.

2.4.3.3. Facteurs influençant l'inactivation thermique

La composition de la matrice peut avoir un impact conséquent sur l'efficacité de l'inactivation thermique. Bertand *et al.*(2012) ont montré qu'à partir de 50 °C, les cinétiques d'inactivation thermiques sont plus rapides dans les matrices simples (tampons salins, milieu de culture, eau potable, eau souterraine) que dans les matrices complexes (eau de surface et toute autre matrice). Des effets protecteurs ont en particuliers été constatés dans les matrices alimentaires à teneur élevée en protéines, lipides ou sucres (Bidawid *et al.*, 2000; Deboosere *et al.*, 2004; Strazynski *et al.*, 2002). Plusieurs composés ont été identifiés comme pouvant stabiliser le PV lors d'un traitement thermique. Ces molécules incluent certains acides gras comme l'acide myristique (Dorval *et al.*, 1989), le collagène (Milo, 1971) ou encore le glutathion (Abdelnabi *et al.*, 2017).

Il existerait également des différences d'inactivation au sein des matrices simples. Un abattement de 1 log d'infectivité du FCV à 72 °C a été obtenu après 19,5 s dans du PBS et 3,6 s dans du milieu DMEM (Bozkurt *et al.*, 2013; Lamhoujeb *et al.*, 2008). La variabilité observée entre les différents tampon ou milieu de culture pourrait en partie être attribuable à leur composition saline (Arthur and Gibson, 2015).

Il est connu depuis longtemps qu'une teneur élevée (supérieure à 1 M) en certains sels cationiques a un effet stabilisateur des entérovirus vis-à-vis l'inactivation thermique (Wallis and Melnick, 1961). L'ajout de chlorure de magnésium ($MgCl_2$) ou d'autres cations divalents est d'ailleurs un moyen de stabiliser les vaccins à base de virus atténués (Dorval *et al.*, 1989; Melnick *et al.*, 1963; Mirchamsy *et al.*, 1978). En particulier, une concentration élevée en NaCl permet le maintien de l'intégrité de la capside du poliovirus et de son infectivité à 50 °C (Majer and Thomssen, 1965). Un grand nombre d'autres cations stabilisent le PV avec une efficacité variable (Dorval *et al.*, 1989). L'effet dépend ainsi de la nature de l'ion, mais également du virus considéré. En effet, les adénovirus sont stabilisés à 50 °C par les ions sodium (Na^+) mais pas par les cations divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) qui au contraire favorisent leur inactivation (Wallis *et al.*, 1962). De façon similaire, certains auteurs ont observé une augmentation de la thermorésistance des adénovirus lorsque la force ionique décroit (Sprunck and Wigand, 1981).

De manière générale la teneur en sels influence la stabilité et la conformation des protéines selon un phénomène nommé « effet de Hofmeister » lié aux interactions entre les molécules d'eau et les ions (Zhang and Cremer, 2006). En solution, les sels se dissocient en ions qui attirent des molécules d'eau et diminuent leur disponibilité pour hydrater les protéines qui tendent donc à précipiter. De plus les ions n'ont pas la même affinité pour l'eau : en solution les cations sont généralement plus hydratés que les anions. Ainsi, à partir d'une certaine concentration, les ions et notamment les cations, induisent l'agrégation des virus, favorisant leur stabilité. Par exemple, le VHA

tend à s'agréger à une teneur en NaCl de 240 mM, une concentration inférieure à salinité de l'eau de mer (environ 600 mM de NaCl) (Volkin *et al.*, 1997). Les processus d'agrégation et les conséquences en termes de stabilité virale sont traités dans le chapitre 3.

Les abattements viraux reportés dans la littérature dépendent enfin des modes opératoires. Dans une revue visant à comparer diverses méthodes utilisées pour évaluer l'inactivation thermique des virus, Arthur et Gibson (2015) indiquent que des différences peuvent être liées au type de chaleur (sèche ou humide), à un éventuel préchauffage de la matrice avant introduction des virus, ainsi qu'au volume des échantillons et à leur concentration initiale en virus.

2.4.4. Rayons ultra-violets

2.4.4.1. Efficacité

Les propriétés germicides des rayons UV sont connus depuis 1878 (Downes, 1879) et ont été utilisées pour la production d'eau potable pour la première fois en 1910 (Henry *et al.*, 1910). Les lampes UV équipent désormais la plupart des usines de potabilisation. La généralisation de la désinfection aux UV s'explique par sa grande efficacité sur les parasites *Cryptosporidium* et *Giardia* particulièrement résistants à la chloration, un temps de contact relativement court, et le fait qu'elle ne nécessite pas d'ajout de réactif chimique. De plus, aux longueurs d'onde supérieures à 240 nm, les UV ne génèrent pas de sous-produits de désinfection comme peuvent le faire les méthodes de désinfection chimiques (Betancourt and Rose, 2004). La désinfection aux UV s'effectue avec des lampes à basse pression émettant principalement un rayonnement monochromatique à environ 254 nm (UV_{254}) ou avec des lampes moyenne pression émettant sur un spectre plus large un rayonnement polychromatique (Sommer *et al.*, 2008).

L'efficacité des UV dépend de la longueur d'onde, de l'intensité et de l'exposition des micro-organismes. La dose d'UV ou fluence (mJ/cm^2) reçue par un micro-organisme est le produit de l'intensité lumineuse qui l'atteint et du temps d'exposition. La dose la plus communément appliquée dans les usines de potabilisation est de 40 mJ/cm^2. Le

Tableau 10 indique les doses d'UV permettant d'abattre 1 à 4 log d'infectivité de différents virus entériques et modèles au moyen de lampes basse pression. Les virus les plus sensibles sont les entérovirus, les virus de la famille des *Caliciviridae*, les rotavirus et le VHA pour lesquels une dose de 40 mJ/cm^2 (radiation monochromatique) est suffisante pour abattre 4 log d'infectivité. Viennent ensuite les bactériophages MS2 et φX174 pour lesquels le même abattement requiert plus de 100 mJ/cm^2 et enfin les adénovirus, très résistants, qui nécessitent une dose pouvant atteindre à 200 mJ/cm^2.

Tableau 10 : Doses de rayons UV requises pour une inactivation (mesurée par culture) de 1 log (90 %) à 4 log (99,99 %) de virus entériques et modèles au moyen de lampes monochromatiques (254 nm) dans de l'eau ou un tampon salin.

Virus	Dose UV (mJ/cm^2)				Référence
	1 log	2 log	3 log	4 log	
Adénovirus 40	50	109	167	226	(Jeanette A. Thurston-Enriquez *et al.*, 2003)
Adénovirus 41	15,5	40	60	93,3	(Prevost *et al.*, 2016)
Coxsackievirus B2	8,6	25	40	49,8	(Prevost *et al.*, 2016)
Coxsackievirus B5	9	17	25	34	(Hijnen *et al.*, 2006)
	9,5	18	27	36	(Gerba *et al.*, 2002)
FCV	9	19	28	38	(Hijnen *et al.*, 2006)
	5	15	20	25	(Park *et al.*, 2011)
	6	16	26	36	(Jeanette A. Thurston-Enriquez *et al.*, 2003)
MNV	8	18	22	29	(Park *et al.*, 2011)
Poliovirus 1	7	9	22	30	(Hijnen *et al.*, 2006)
	< 5	15	20-25	30-35	(Simonet and Gantzer, 2006a)
	8	15.5	23	31	(Gerba *et al.*, 2002)
Rotavirus simien SA-11	10	20	29	39	(Hijnen *et al.*, 2006)
	10	20	30	40	(Li *et al.*, 2009)
VHA	6	11	17	22	(Hijnen *et al.*, 2006)
Bactériophage MS2	18	48	55	70	(Park *et al.*, 2011)
	23	55	87	119	(Jeanette A. Thurston-Enriquez *et al.*, 2003)
Bactériophage φX174	20-25	55-60	90-95	120-125	(Ho *et al.*, 2016)

2.4.4.2. Mécanisme

Aux longueurs d'ondes utilisées pour la désinfection l'énergie des photons est absorbée par les cycles aromatiques ce qui induit majoritairement des dommages aux acides nucléiques, mais peut également dans une moindre mesure altérer les protéines (Nuanualsuwan and Cliver, 2003). L'inactivation dépend donc en particulier de la réactivité des UV_{254} sur les nucléotides et acides aminés cycliques (tyrosine, tryptophane, phénylalanine) (Wigginton *et al.*, 2012b).

Au niveau des acides nucléiques, les UV induisent la formation de dimères de pyrimidines, d'adduits aux pyrimidines, de cassures ou encore des pontages acides nucléiques - protéines. À 254 nm la perte d'infectivité est principalement due à la formation de dimères ou d'hydrates de pyrimidine, qui empêchent la progression de la polymérase virale. Dans le cas des virus à ARN l'inactivation est en particulier liée à des photoproduits ciblant les uridines. Chez le bactériophage MS2, les UV génèrent notamment des hydrates d'uridine (Yamada *et al.*, 1973). Selon les travaux de Smirnov *et al.*(1991), la formation de photodimères d'uridine est le principal mécanisme d'inactivation du rotavirus SA11 par les UV à des doses conventionnelles. Ces auteurs n'ont observé la formation de pontage ARN-protéine qu'à des doses très élevées. La taille du génome ainsi que l'abondance de doublets de pyrimidines, pouvant se dimériser sous l'action des UV, ont été proposés comme paramètres prédictifs de l'efficacité d'inactivation par les UVC (Lytle and Sagripanti, 2005). Simonet et Gantzer (2006a) ont constaté que, alors que les cinétiques d'inactivation du PV et du MS2 étaient corrélées à la dégradation de leur génome, l'ARN du poliovirus était plus sensible que celui de MS2 malgré une taille équivalente. Il semblerait ainsi que les structures secondaires et la compaction du génome modulent la sensibilité aux UV.

Les conséquences des UV sur les protéines de capside sont moins documentées, mais plusieurs études suggèrent qu'elles contribueraient significativement à l'inactivation virale dans certains cas. Ainsi, le PV, le FCV et dans une moindre mesure le VHA inactivés par les UV_{254} perdent leur capacité de liaison aux cellules cibles (Nuanualsuwan and Cliver, 2003). Au contraire, Wigginton *et al.*(2010; 2012b) ont montré que les UV_{254} induisent l'oxydation des protéines du MS2 sur des acides aminés impliqués dans le maintien de la structure de la capside et la liaison de l'ARN à la capside, mais la capacité de liaison du MS2 n'était pas affectée. En revanche, l'injection et la réplication du génome étaient inhibées. Mayer *et al.*(2015) ont étudié l'impact de la composition des capsides d'un panel de virus sur l'inactivation par les UV_{254} et ont constaté une corrélation significative entre l'abondance relative de certains acides aminés et la sensibilité au UV des virus. L'altération des protéines de capside pourrait favoriser la pénétration des UV jusqu'au génome ainsi que participer, via un phénomène de photolyse, à la formation de radicaux libres très réactifs. Cependant, des capsides

riches en acides aminés aromatiques pourraient d'autre part absorber les UV ce qui limiterait leur transmission au génome (Mayer *et al.*, 2015).

Les adénovirus se révèlent être particulièrement résistants aux UV à 254 nm, non pas parce qu'ils subissent intrinsèquement moins de dommages que les virus à ARN, mais parce que les lésions de leur ADN double brin peuvent être éliminées par les systèmes de réparation de la cellule hôte en culture (Guo *et al.*, 2010; Rainbow, 1977). L'utilisation de lampes moyenne pression à la place de lampes basse pression permet d'augmenter l'inactivation des adénovirus (Beck *et al.*, 2018; Linden *et al.*, 2007), plus sensibles aux faibles longueurs d'onde que d'autres virus comme le MS2 (Linden *et al.*, 2015). Par exemple, une dose de 40 mJ/cm^2 d'UV$_{254}$ (lampe basse pression) induit 1 log d'inactivation de l'adénovirus 2 tandis que 3 log d'inactivation sont atteints avec la même dose avec une lampe moyenne pression (Shin *et al.*, 2009). Les lampes moyenne pression sont particulièrement efficaces car elles émettent à des longueurs d'onde inférieures à 240 nm ciblant les protéines virales. Par exemple, des doses de 9 à 25 mJ/cm^2 à des longueurs d'onde de 210 nm, 220 nm et 230 nm permettent d'inactiver 4 log d'infectivité de l'adénovirus 2. À ces longueurs d'onde, l'inactivation est directement corrélée à des dommages sur les protéines (Beck *et al.*, 2018, 2015). À noter que dans le cas d'usage industriel des lampes UV, les longueurs d'ondes inférieures à environ 240 nm, dont l'énergie élevée favorise la formation de sous-produits de désinfection, sont coupées par des gaines de quartz dopées en titane (ANSES, 2010).

Enfin, des phénomènes de transcomplémentation se produisant lorsqu'au moins deux particules virales inactivées par les UV infectent la même cellule hôte ont été décrits dans certaines conditions expérimentales et concerneraient des virus à ADN comme à ARN (McClain and Spendlove, 1966; Yamamoto and Shimojo, 1971).

2.4.4.3. Facteurs influençant l'inactivation par les UV

La turbidité de l'eau est le principal paramètre pouvant affecter l'efficacité des rayonnements UV car les matières dissoutes ou en suspension absorbent l'énergie des rayons ce qui diminue la transmittance du rayonnement dans l'eau (loi de Beer-Lambert) et donc l'exposition effective des pathogènes (Luckiesch, M., and Holladay, L. L., 1944). Les virus associés à des particules sont protégés des rayons (Templeton *et al.*, 2005). Néanmoins, dans les usines de production d'eau potable l'eau n'est traitée aux UV que lorsque la turbidité est suffisamment basse. Pour assurer une bonne transmission des rayonnements UV dans l'eau à traiter, la turbidité de l'eau à l'entrée du réacteur ne doit pas dépasser 0,3 NFU (ANSES, 2010)

D'autres facteurs peuvent affecter la fluence à laquelle est exposée l'eau à traiter comme le flux ou les propriétés hydrauliques des lampes UV (Cabaj *et al.*, 1996). Ainsi la dose de 40 mJ/cm^2

usuellement recommandée est en réalité plus faible lorsque la qualité de l'eau est insuffisante ou son flux trop rapide. C'est pourquoi le flux de l'eau à traiter est normalement adapté en fonction de sa turbidité. Différents protocoles de validation assurent les performances de traitement au niveau des usines (National Water Research Institute, 2012; USEPA, 2006).

Dans les études d'inactivation virale à l'échelle du laboratoire, les conditions expérimentales peuvent également influencer les abattements observés. Selon Thurston-Enriquez *et al.*(2003) l'inactivation est plus efficace sur les productions virales les plus clarifiées (dépourvues de débris cellulaires) car elles n'augmentent pas la turbidité de l'échantillon. De plus, les étapes de congélation-décongélation fréquemment réalisées dans les protocoles de production virale pour libérer un maximum de particules intracellulaires fragiliseraient les capsides et augmenteraient la sensibilité aux UV (Nwachuku *et al.*, 2005). Il existe d'autres disparités dans les protocoles expérimentaux (longueur du trajet optique dans l'eau ; échantillon statique, sous agitation ou en flux continu) qui pourraient modifier les performances d'inactivation mesurées.

2.4.5. Chlore

2.4.5.1. Efficacité

L'utilisation du chlore comme désinfectant de l'eau s'est développée à partir des années 1900, bien que quelques utilisations isolées ait été rapportées auparavant (Parkes, 2014). La chloration de l'eau de distribution a permis une réduction conséquente des maladies transmissibles par l'eau comme la typhoïde, le cholera ou la dysenterie. C'est désormais le traitement de désinfection le plus répandu dans les usines de production d'eau potable. Le chlore est un agent oxydant peu couteux et rémanent qui est utilisé aussi bien en désinfection primaire pour inactiver les micro-organismes pathogènes qu'en désinfection secondaire sous forme résiduelle pour limiter la prolifération des micro-organismes dans le réseau de distribution. L'inconvénient majeur du chlore est qu'en réagissant avec la matière organique ou les ions bromates, il engendre la formation de sous-produits de désinfection nocifs pour la santé tels que des trihalométhanes, des acides holoacétiques ou d'autres composés halogénés (Krasner *et al.*, 2006; Rook, 1976).

La désinfection chimique fait appel au concept de Ct qui définit la dose de désinfectant comme le produit de sa concentration résiduelle C (mg/L) par le temps de contact t (min). Dans l'eau, le chlore libre existe sous la forme d'un acide (acide hypochloreux, HOCl) et de sa base conjuguée (ion hypochlorite, OCl^-). La dissolution du chlore gazeux (Cl_2) dans l'eau et la dissociation de l'acide hypochloreux sont régies par des équilibres suivants :

$$(1)\ Cl_2 + H_2O \Leftrightarrow HOCl + HCl$$

$$(2)\ HOCl \Leftrightarrow H^+ + OCl^- \quad (pKa = 7{,}5 \text{ à } 25\ °C)$$

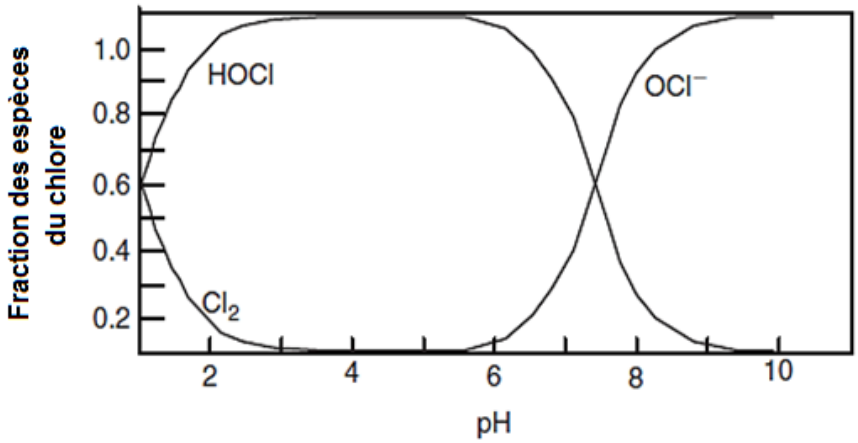


Figure 13 : Diagramme de distribution des espèces du chlore en fonction du pH à 25 °C (Ghernaout, 2018)

Lors de la chloration, le pH est un paramètre essentiel à contrôler car il définit la prédominance des deux formes (Figure 13), l'acide hypochloreux étant un oxydant beaucoup plus réactif que l'ion hypochlorite et donc la principale forme active. L'inactivation est ainsi plus efficace à pH inférieur à 7,5 lorsque l'acide hypochloreux est majoritaire. Thurston-Enriquez *et al.*(2003) ont par exemple noté qu'un abattement de 2 log du FCV nécessitait une dose de chlore près de dix fois supérieure à pH 8 (0,18 mg.min.L^{-1}) qu'à pH 6 (0,02 mg.min.L^{-1}). Les doses de chlore nécessaires pour atteindre 2 ou 4 log d'abattement de virus entériques humains et modèles sont indiqués dans le Tableau 11. À pH 7, une dose de chlore inférieure à 1 mg.min.L^{-1} , voire 0,1 mg.min.L^{-1} suffit à inactiver plus de 4 log d'infectivité des *Caliciviridae*, adénovirus, et bactériophages MS2 ou φX174. En comparaison, les entérovirus, le rotavirus A et le VHA sont plus résistants et requièrent une dose supérieure à 1 mg.min.L^{-1} pour un abattement similaire. Il existe de plus une variabilité de sensibilité au sein d'une même espèce virale. Dans les mêmes conditions expérimentales, la dose de chlore permettant un abattement de 2 log d'infectivité de cinq sérotypes d'entérovirus à pH 7,5 varie de 1,4 à 5,4 mg.min.L^{-1} (Black *et al.*, 2009). De plus, le PV 1 Brunhilde est deux fois plus résistant que la souche Mahoney (Sharp and Leong, 1980).

Tableau 11 : Doses de chlore (CT) nécessaires pour un abattement d'infectivité de 2 log (99 %) et 4 log (99,99 %) de virus entériques et modèles, dans de l'eau ou un tampon salin.

Virus	CT (mg.min.L^{-1})		Température (°C)	pH	Référence
	2 log	4 log			
Adénovirus 40	0.04-0.17	0,75	5	7	(J. A. Thurston-Enriquez *et al.*, 2003)
	< 0,02	< 0,04	5	7	(Cromeans *et al.*, 2010)
Adénovirus 41	0,2	0,8	20	7	(Prevost *et al.*, 2016)
Coxsackievirus B2	1	2,5	20	7	(Prevost *et al.*, 2016)
Coxsackievirus B5	3,6	7,4	5	7	(Cromeans *et al.*, 2010)
	5,4	11,5	5	7,5	(Black *et al.*, 2009)
FCV	< 0,08	< 0,08	5	7	(J. A. Thurston-Enriquez *et al.*, 2003)
MNV	< 0,02	< 0,07	5	7	(Cromeans *et al.*, 2010)
	0,141	0,314	5	7 ,2	(Lim *et al.*, 2010)
Poliovirus 1	1 - 2,75	< 10	5	6	(J. A. Thurston-Enriquez *et al.*, 2003)
	0,12	0,24	5	6	(Shin and Sobsey, 2008)
Rotavirus A	2,3	4,5	20	7,5	(Caballero *et al.*, 2004)
VHA	n.i.	1,8	5	7	(Sobsey *et al.*, 1988)
Bactériophage MS2	1,6	3,3	5	6	(Shin and Sobsey, 2008)
	0,071	0,247	5	7 ,2	(Shin and Sobsey, 2008)
Bactériophage φX174	n.i.	0,2	5	7	(Sobsey *et al.*, 1988)

* non indiqué

2.4.5.2. Mécanisme

Comme pour la plupart des traitements oxydants, l'inactivation par le chlore est en grande majorité due à la dégradation des capsides mais peut également affecter le génome si le potentiel oxydant est suffisant. En effet, d'une part les capsides sont les premières structures virales exposées aux agents oxydants, et d'autre part les cinétiques de réaction du chlore sont beaucoup plus rapides avec les protéines qu'avec les acides nucléiques (Wigginton and Kohn, 2012). Les oxydants affectent à la fois le squelette carboné et les résidus d'acides aminés, les sites les plus réactifs étant l'extrémité N-terminale des chaines protéiques ainsi que les acides aminés soufrés, aromatiques, ou contenant une fonction amine libre (Mayer *et al.*, 2015). Lorsque le chlore atteint le génome, des produits de

chloration des bases azotées peuvent se former (5-chlorocytidine, 8-choloroguanosine, 8-chloroadenosine) mais leurs effets sur la réplication virale sont peu documentés.

L'infectivité des virus inactivés par le chlore décroit bien plus rapidement que la quantité de génomes détectés par (RT)qPCR, ce qui indique que l'inactivation par le chlore est en premier lieu due à l'altération des capsides (Prevost *et al.*, 2016; Sobsey *et al.*, 1998). Nuanualsuwan et Cliver (2003), ont montré que l'inactivation au chlore du VHA, du PV1 et du FCV induit chez ces trois virus une perte de la fonction de liaison à leurs récepteurs cellulaires. Dans cette étude les virus ont été inactivés avec la dose minimale permettant l'inactivation totale d'infectivité. La perte de capacité de liaison n'est donc pas liée à une forte dose de chlore. De plus, il existe une certaine disparité entre les virus. Selon les travaux de Brié *et al.*(2017, 2018), la chloration engendre une faible perte de capacité de liaison du MS2 aux cellules cibles, mais impacte plus fortement celles du MNV. S'agissant des caractéristiques physico-chimiques des particules, la chloration augmente la charge négative globale du MS2 mais ne modifie pas la charge du MNV, et n'engendre aucune augmentation de l'hydrophobicité de ces deux virus (Brié *et al.*, 2017, 2018).

Cependant, dans d'autres études, l'altération des protéines de capsides et la perte résultante de la fonction de liaison aux cellules n'ont pas été identifiées comme les principaux mécanismes d'inactivation. Wigginton *et al.* (2012b) ont montré que l'inactivation du phage MS2 par le chlore affecte les fonctions d'injection et de réplication du génome, respectivement causés par des dommages au génome et aux protéines, sans toutefois impacter la faculté de liaison aux cellules cibles. Dans cette étude, la diminution d'intégrité du génome, mesurée par amplification de segments d'ARN, était comparable à celle de virus inactivés par les UV. Ces travaux ont confirmé que le chlore a un effet non négligeable sur le génome, ce qui avait été constaté précédemment sur d'autres virus. En 1979, l'inactivation du PV1 avait été attribuée à la dégradation du génome dans une étude identifiant comme premier événement responsable de l'inactivation virale le clivage de l'ARN qui, dans un second temps, se dissocie de la capside. Dans cette étude, le PV1 inactivé au chlore avait conservé sa capacité de liaison aux cellules cibles (O'Brien and Newman, 1979).

De plus, l'inactivation du VHA a été plus particulièrement attribuée à la dégradation de la région 5' non codante par Li et al (2002) selon qui la perte d'antigénicité du VHA est un phénomène secondaire se produisant uniquement à dose de chlore élevée (60 min à 10 mg/L). Les auteurs ont montré par RT-PCR que la région 5' non codante n'était plus amplifiable après inactivation (30 min à 10 mg/L), contrairement aux segments couvrant la séquence codante. La région 5' non codante contient en particulier l'IRES (*internal ribosome entry site*) et une structure en boucle ayant un rôle de signal pour l'initiation de la réplication.

Enfin, Page *et al.*(2010) ont observé que l'ADN de l'adénovirus 2 inactivé par le chlore était suffisamment intact pour être amplifié par PCR. Les virus étaient également capables de se lier aux récepteurs CAR des cellules cibles. Cependant, l'expression d'une protéine précoce transactivatrice (E1A) dans les cellules infectées était inhibée. L'ensemble de ces travaux tend à montrer que les mécanismes d'inactivation par le chlore dépendent d'une part de la dose et d'autre part de la structure de chaque virus.

2.4.5.3. Facteurs influençant l'inactivation par le chlore

Comme décrit précédemment, le principal paramètre affectant l'efficacité de la chloration est le pH dont la valeur détermine l'abondance relative d'acide hypochloreux et d'ion hypochlorite : pour l'ensemble des virus, la chloration est plus efficace lorsque l'acide hypochloreux prédomine (Engelbrecht *et al.*, 1980; J. A. Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). La température impacte également les cinétiques d'inactivation. La vitesse d'inactivation du PV 1 double lorsque la température passe de 5 °C à 25 °C (Scarpino *et al.*, 1972). À pH constant, l'augmentation de température engendre pourtant une légère diminution de l'acide hypochloreux au profit de l'ion hypochlorite, mais cet effet est négligeable en comparaison de l'augmentation concomitante de la vitesse de réaction.

L'efficacité de la chloration ainsi que de tous les traitements oxydatifs est enfin particulièrement dépendante à la composition de l'eau, dont la charge en molécules organique ou inorganique exerce une demande en désinfectant correspondant à la différence entre la quantité de désinfectant initialement ajoutée et la quantité résiduelle (Dow *et al.*, 2006; LeChevallier *et al.*, 1981). Une forte demande en chlore diminue donc la dose à laquelle les pathogènes sont effectivement exposés. La mesure de la concentration résiduelle après un temps de contact donné, dans les usines de potabilisation comme dans les expériences d'inactivation, permet de contrôler l'efficacité du traitement. Une certaine proportion des études de désinfection menées à l'échelle du laboratoire ne détermine cependant pas la demande en chlore des matrices hydriques ou la concentration résiduelle en fin de traitement. Même dans le cas d'expériences conduites dans de l'eau à demande nulle en chlore, l'ajout des virus peut être associé à un apport plus ou moins important de matières oxydables selon le niveau de purification des productions virales.

Barbeau *et al.*(2005) ont étudié la contribution de plusieurs paramètres (température, pH, turbidité, matière organique) sur l'efficacité d'inactivation du phage MS2 par le chlore dans des matrices hydriques synthétiques. Le pH et la température étaient les deux facteurs contribuant le plus à la variabilité de l'efficacité. De plus, lorsque la demande en chlore de l'eau était prise en compte pour déterminer l'exposition, la présence de matière organique naturelle (0.5 mg/l) n'influençait pas l'inactivation.

Enfin la chloration peut être affectée par la présence d'ions. À pH 10, l'ajout de NaCl, KCl et CsCl (0,1 M) augmente l'inactivation du PV et des coxsackievirus B5 et B3 sans altération du rapport $HOCl/OCl^-$ (Jensen *et al.*, 1980). À 5 °C et pH 9, l'ajout de KCl (0,0169 M) augmente d'un facteur 15 la vitesse d'inactivation du PV1 (Berg *et al.*, 1990). L'effet potentialisateur du KCl a également été observé à ph 4,5 (Berg and Sanjaghsaz, 1995). L'ajout de sels permet notamment d'accroître le potentiel virucide de la forme la moins active du chlore, OCl^-. Ainsi la vitesse d'inactivation du PV est plus de trente fois supérieure à pH 10 avec du NaCl (0,1 M) qu'à pH 6 (Sharp and Leong, 1980).

2.4.6. Dioxyde de chlore

2.4.6.1. Efficacité

Le dioxyde de chlore (ClO_2) a été utilisé dans une usine de traitement de l'eau pour la première fois 1944 aux Etats-Unis afin d'éliminer les phénols (Vincent *et al.*, 1946). Son utilisation comme agent de désinfection s'est par la suite répandue à partir de 1956, à mesure que des sous-produits de désinfection du chlore ont été identifiés. Le dioxyde de chlore est ainsi utilisé en remplacement du chlore en désinfection primaire ou en désinfection secondaire après traitement UV.

Le dioxyde chlore est un agent oxydant qui présente en effet de nombreux avantages par comparaison avec le chlore : il est cinq à dix fois plus soluble dans l'eau tout en étant inodore ; il ne réagit pas avec les composés azotés, les bromures et la matière organique et ne forme donc pas de nitrosamines, bromates ou trihalométhanes ; il est plus efficace pour oxyder le fer et le manganèse et son action désinfectante est également supérieure notamment sur les virus, avec une efficacité stable sur une grande étendue de pH (entre 4 et 10) ; il est enfin moins corrosif à long terme pour les installations (Aieta and Berg, 1986; Backer, 2017; Gray, 2014). Les inconvénients du dioxyde chlore sont son instabilité, nécessitant une production sur site qui génère du chlore en grande quantité, et le fait qu'il peut former des sous-produits de désinfection de type chlorite ou chlorate nocifs pour la santé. Le Tableau 12 présente les doses de dioxyde de chlore nécessaires pour inactiver 2 log d'infectivité de différents virus entériques ou substituts.

Tableau 12 : Doses de dioxyde de chlore (CT) nécessaires pour un abattement d'infectivité de 2 log (99 %) de virus entériques et modèles

Virus	CT ($mg.min.L^{-1}$)	Température (°C)	pH	Référence
Adénovirus 40	0,38	5	6	(Thurston-Enriquez *et al.*, 2005a)
Coxsackievirus B5	0,12 – 0,63	20	7	(Zoni *et al.*, 2007)
FCV	0,3 – 15	5 - 25	6-8	(Jacangelo *et al.*, 2002)
	0,5 – 2,2	20	7	(Zoni *et al.*, 2007)
MNV	< 0,001	20	7,2	(Lim *et al.*, 2010)
	0,071	5		
Poliovirus 1	0,2 – 6,7	5	6-7	(Hoff, 1986)
Rotavirus	0,2 – 2,1	5	6 - 7	(Hoff, 1986)
VHA	< 0,5	20	7	(Zoni *et al.*, 2007)
Bactériophage MS2	0,079	5	7,2	(Lim *et al.*, 2010)
	0,027	20		
	0,16	20	7,2	(Jin *et al.*, 2013)

2.4.6.2. Mécanisme

Selon Wigginton *et al.* (2012b), l'inactivation du phage MS2 par le dioxyde de chlore est exclusivement due à la perte de la capacité de liaison aux cellules cibles. Le dioxyde de chlore ne provoque aucun dommage à l'ARN viral mais dégrade la protéine de capside (180 exemplaires par virus) et la protéine de maturation (1 exemplaire par virus), qui serait impliquée dans l'interaction du phage au pilus bactérien. C'est un oxydant relativement sélectif qui réagit principalement avec la cystéine, la tyrosine et le tryptophane. L'inhibition de la capacité de liaison par le dioxyde de chlore du fait de l'altération des protéines de capside a été rapportée pour d'autres phages (Noss *et al.*, 1986).

Dans le cas des virus humains, Alvarez et O'Brien (1982) ont constaté que le dioxyde de chlore augmente la charge négative du PV mais n'altère pas l'absorption aux cellules cibles, la pénétration et la décapsidation. Ils ont en revanche constaté une inhibition de la réplication virale et ont donc conclu à une atteinte de l'ARN. Le dioxyde de chlore altère de même le génome du PV1 en ciblant plus particulièrement les régions 5' et 3' non codantes. De plus, les ARN extraits et dénaturés sont moins sensibles au dioxyde de chlore ce qui indique que la structure tridimensionnelle de l'ARN favorise sa dégradation (Simonet and Gantzer, 2006b). Le dioxyde de chlore cible notamment le segment comprenant les nucléotides 40 à 80 de la région 5' non codante du PV1 nécessaire à l'initiation de la réplication (Jin *et al.*, 2012). Sur le VHA, le dioxyde de chlore provoque des

dommages dans la région 5' non codante (nucléotides 1 à 671) comme le fait le chlore. Les régions les plus structurées du génome du VHA, qui sont les régions 5' et 3' non codantes, sont également des cibles préférentielles du dioxyde de chlore. De plus, à la différence du chlore, il provoque également une destruction complète de l'antigénicité. L'inactivation du VHA peut donc être liée à l'atteinte des protéines de capsides et/ou à la dégradation du génome (Li *et al.*, 2004). D'autres travaux sont nécessaires pour une meilleure compréhension des contributions respectives des altérations génomiques et protéiques, qui semblent dépendre des virus considérés.

2.4.6.3. Facteurs affectant l'inactivation par le dioxyde de chlore

Il est parfois admis qu'une augmentation de dix degrés induit une augmentation de l'inactivation microbienne par inactivation chimique d'un facteur 2 à 3 (Hoff, 1986). Cette considération vaut pour l'effet virucide du dioxyde de chlore. En effet, à pH 7 la vitesse d'inactivation du PV1 est environ 3,5 fois supérieure à 15 °C qu'à 5 °C (Cronier *et al.*, 1978), et à pH 6 les doses permettant l'inactivation de 4 log d'infectivité de l'adénovirus 40 et du FCV sont respectivement 1,4 et 2,9 fois supérieures à 5 °C qu'à 15 °C (Thurston-Enriquez *et al.*, 2005a). Cependant, en tant que gaz dissous non dissocié dans l'eau, le dioxyde de chlore est volatil, ce qui peut ralentir la cinétique de désinfection lors d'une exposition de longue durée à température élevée (Hoff, 1986).

L'efficacité du dioxyde de chlore est largement moins dépendante du pH que ne l'est celle du chlore, mais est supérieure à pH 10 qu'à pH 6, ce qui serait lié à une fragilité des capsides en milieu basique (Alvarez and O'Brien, 1982; Cronier *et al.*, 1978; Noss *et al.*, 1986). Enfin, d'importantes quantités de matières organiques auraient moins d'impact sur activité désinfectante du dioxyde de chlore que celle du chlore (Benarde *et al.*, 1965; Hirneisen *et al.*, 2010).

2.4.7. Ozone

2.4.7.1. Efficacité

L'ozone (O_3) est un oxydant puissant qui a été utilisé pour la première fois comme traitement de désinfection en 1906 dans une usine de potabilisation française (Rice *et al.*, 1981). Son spectre d'action antimicrobienne est très étendu (bactéries, virus, protozoaires, spores, champignons) et son efficacité désinfectante est supérieure à celle du chlore. En solution, l'ozone se décompose pour former trois espèces réactives qui sont les radicaux libres hydroperoxyl ($^{\bullet}HO_2$), hydroxyl ($^{\bullet}OH$) et superoxide ($^{\bullet}O_2$).

Par comparaison avec les autres méthodes de désinfection chimique, relativement peu de données sont disponibles sur les abattements viraux par l'ozone. Cela est lié à sa forte réactivité qui d'une part nécessite la possession d'équipements nécessaires à sa production *in situ,* et d'autre part

impose de maintenir une concentration stable et basse en milieu réactionnel afin que les cinétiques d'inactivation soient suffisamment lentes pour être mesurables. Par ailleurs, différentes méthodes sont utilisées pour l'exposition à l'ozone (ajout d'ozone dissous en solution, ou générateur d'ozone à bulles) et le calcul des doses d'exposition, ce qui complique la comparaison entre différentes études. À titre d'exemple, Sigmon *et al.*(2015) et Thurston-Enriquez *et al.*(2005b) effectuent une première mesure de l'ozone 10 à 15 secondes après le début de la réaction, tandis que Wolf *et al.*(2018) soulignent que la première phase de consommation de l'ozone qui se produit avant 10 secondes est cruciale pour le calcul de l'exposition. Ainsi les approches expérimentales qui ne considèrent pas la diminution initiale de la concentration en ozone tendent à surestimer l'exposition.

Le Tableau 13 indique les doses d'ozone conduisant à un abattement de 2 log d'infectivité de quelques virus entériques et modèles. Concernant le phage MS2, Shin et Sobsey (2003) ont mesuré 3,5 log de réduction d'infectivité après 10 s à 0,37 mg/L d'ozone (pH 7, 5°C), contre 2,96 log de réduction après 60 s à 0,60 mg/L (pH 6,9, 22 °C) dans l'étude de Finch et Fairbairn (1991). Herbold *et al.*(1989) rapportent une réduction de 2,7 log d'infectivité du VHA après 1,2 s à 0,25 mg/L (pH 7,2, 20 °C). Enfin, une étude indique un abattement de 2 log du rotavirus humain après 60 s à 5,2 mg/L (pH7, 25 °C) (Vaughn *et al.*, 1987) tandis qu'une autre donne un abattement de 3 log pour une dose largement supérieure de 5,2 mg/L pendant 60 s (pH 7, 25 °C) (Khadre and Yousef, 2002). Cet écart traduit l'importance du mode opératoire, dont la méthode de purification des virus. Des composants annexes peuvent en effet réagir très rapidement et réduire l'ozone disponible.

Il est néanmoins possible de comparer la sensibilité des virus étudiés dans le cadre d'un même protocole expérimental. Selon Wolf *et al.*(2018), le phage MS2 et l'échovirus 11 (souche Gregory) sont les plus sensibles à l'ozone, suivis par le phage φX174 et l'adénovirus 2, tandis que le virus le plus résistant est le coxsackievirus B5 (souche Faulkner). Ce classement est en accord avec Sigmon *et al.*(2015) qui ont déterminé que les virus étaient, par ordre de résistance croissante, le phage MS2, l'échovirus 11 et le PV1, l'adénovirus 2 et le phage φX174, puis le coxsackievirus B5. Il existe enfin comme pour les autres modes d'inactivation des variabilités de sensibilité au sein d'une même espèce virale. Le PV2 serait par exemple plus résistant que le PV1, et le rotavirus simien SA-11 plus résistant que le rotavirus humain Wa (Roy *et al.*, 1982; Vaughn *et al.*, 1987)

Tableau 13 : Doses d'ozone (CT) nécessaires pour un abattement d'infectivité de 2 log (99 %) de virus entériques et modèles

Virus	CT ($mg.min.L^{-1}$)	Température (°C)	pH	Référence
Adénovirus 40	<0.01- 0.02	5	7	(Thurston-Enriquez *et al.*, 2005b)
Coxsackievirus B5	0.0041	22	6,5	(Wolf *et al.*, 2018)
	0.072	20	7,2	(Roy *et al.*, 1981)
	0.51	16	7,6	(Sigmon *et al.*, 2015)
FCV	<0.01-<0.14	5	7	(Jacangelo *et al.*, 2002)
	<0.01	5	5	(Thurston-Enriquez *et al.*, 2005b)
MNV	0,70 – 0,72	20	7	(Lim *et al.*, 2010)
	0,13 – 0,17	20	5,6	
Poliovirus 1	0,2	5	6 - 7	(Hoff, 1986)
Rotavirus	0,006 – 0,06	5	6 - 7	(Hoff, 1986)

2.4.7.2. Mécanisme

D'après les travaux de Mayer *et al.*(2015), l'altération des protéines de capside du MS2 et de l'adénovirus de type F est théoriquement intégralement responsable de l'inactivation par l'ozone, qui réagit beaucoup plus fortement avec les acides aminés qu'avec les acides nucléiques. Le niveau d'altération des capsides peut de plus différer selon la composition protéique du virus considéré. Il en effet connu que l'ozone réagit plus spécifiquement avec certains acides aminés soufrés ou aromatiques (cystéine, méthionine, tyrosine, histidine, et phénylalanine) (Mudd *et al.*, 1969). Chez les bactériophages f2 et T4, l'ozone dissocie la capside en plusieurs sous-unités, ce qui induit une perte de capacité d'adhésion à la bactérie et engendre la libération du génome (Kim *et al.*, 1980).

D'autres résultats laissent penser que le génome est également une cible notable de l'ozone. Des études ont en effet reporté des atteintes des protéines de capsides des virus inactivés par l'ozone, sans toutefois toujours parvenir mettre en évidence le dysfonctionnement d'une fonction virale liée aux protéines comme l'adhésion aux récepteurs ou le maintien de l'antigénicité (Riesser *et al.*, 1977; Roy *et al.*, 1981; Vaughn *et al.*, 1987). Par exemple, Roy *et al.*(1981) et ont mis en évidence par électrophorèse une modification des protéines structurales VP1 et VP2 (mais pas VP3 et VP4) du PV1. Cependant, ni l'intégrité des particules (évaluée par détermination de leurs coefficients de sédimentation), ni l'adhésion aux cellules cibles, n'étaient suffisamment affectées pour expliquer le niveau d'inactivation observé. Selon ces auteurs, qui ont par ailleurs mis en évidence une fragmentation de l'ARN des virus inactivés, le génome serait la principale cible de l'ozone après

diffusion à l'intérieur de la capside. Les conclusions de cette étude sont que, dans le cadre d'une exposition de 2 min avec une concentration résiduelle inférieure 0,3 mg/L, l'ozone diffuserait à l'intérieur des capsides où il réagirait avec l'ARN viral.

Cette hypothèse va dans le sens de l'étude de Shin et Sobsey (2003) qui montre que la diminution d'infectivité du PV1 et du MS2 correspond aussi à la diminution de la détection des génomes par amplification de long fragments (*long range PCR*). L'ozone altère donc rapidement l'ARN viral mais cette étude ne permet pas d'affirmer qu'il s'agit du premier mécanisme d'inactivation. Plus récemment la dégradation de la région 5' non codante a été identifiée comme étant la cause majeure de l'inactivation du PV1 par l'ozone (Jiang *et al.*, 2019). Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour confirmer que ce mécanisme s'étend à d'autres virus entériques humains.

2.4.7.3. Facteurs affectant l'ozonation

La stabilité de l'ozone dépend surtout de la température, du pH et de la présence de matière organique. L'augmentation de la température diminue la solubilité et la stabilité de l'ozone dans l'eau mais ces phénomènes peuvent être compensés par une augmentation de la vitesse de réaction avec les substrats oxydables (Khadre and Yousef, 2002; Kim *et al.*, 1980). L'inactivation du VHA à 10 °C (pH 7,2) requiert une dose plus faible qu'à 20 °C (Herbold *et al.*, 1989). À l'inverse, la constante d'inactivation du MS2 augmente d'un facteur 1,8 lorsque la température augmente de 2 °C à 22 °C (pH 8,5) (Wolf *et al.*, 2018).

La stabilité de l'ozone dans l'eau décroit lorsque le pH augmente (Kim, 1998), ce qui conduit à une diminution de l'inactivation des rotavirus et du PV1 en milieu alcalin (Vaughn *et al.*, 1987). À pH 4,3, le PV1 est 4 fois plus résistant qu'à pH 7,2 (Roy *et al.*, 1982). L'étude de Wolf *et al.*(2018) qui ont tenu compte de la cinétique de diminution de l'ozone pour calculer précisément l'exposition indique que le passage en milieu alcalin, d'un pH 6,5 à 8,5 (22 °C), augmente d'un facteur 2 la constante d'inactivation du MS2. Cela suggère qu'en milieu basique les virus seraient intrinsèquement plus sensibles à l'ozone.

Enfin la matière organique peut impacter négativement l'efficacité de l'inactivation en réagissant avec l'ozone et donc diminuant la concentration réelle d'exposition (Farooq and Akhlaque, 1983), mais aussi en conférant une protection aux virus. À titre d'exemple, Emerson *et al.*(1982) ont premièrement déterminé qu'une concentration de 0,28 mg/L d'ozone pendant 10 s permettait d'inactiver totalement une suspension de PV1. Dans une autre expérience sur du PV1 associé à des débris cellulaires, 2 min d'exposition à une concentration supérieure à 6 mg/L ont été nécessaire pour une inactivation totale, la concentration en ozone résiduel en fin de réaction étant pourtant

supérieure à 4 mg/L. Cette étude montre que la matière organique (débris cellulaires) confère aux virus une protection qui n'est pas attribuable à la consommation de l'ozone.

2.4.8. Conclusion sur les méthodes d'inactivation

Les mécanismes des différents modes d'inactivation considérés précédemment sont synthétisés dans le Tableau 14 dont émergent deux points majeurs. Le premier est la spécificité des mécanismes moléculaires mis en jeu par chaque méthode, qui distingue même les désinfectants chimiques tous pourtant basés sur un processus d'oxydation. Le second est qu'un même mode de désinfection peut affecter différemment les fonctions de virus considérés comme structurellement proches comme le phage MS2 et le PV1. Il est de plus important de noter que la connaissance des paramètres affectant les mécanismes d'inactivation est encore très parcellaire. Pour conclure, l'inactivation virale est un processus complexe mettant en jeu une grande variété de mécanismes moléculaires, qui dépend de l'intensité ou dose de traitement, de la structure et de la composition des virus, ainsi que des paramètres physico-chimiques.

Tableau 14 : Récapitulatif des mécanismes de différentes méthodes d'inactivation sur un modèle de phage (MS2) et un modèle de virus humain (PV1), et doses approximatives permettant un abattement de 2 log d'infectivité du PV.

	Mode d'action	**Fonction virale inhibée**		**Paramètres physico-chimiques altérant l'efficacité**
		MS2	**PV1**	
Chaleur (45 °C, 10 min)	Protéines : dénaturation conduisant à des changements structuraux et perte d'intégrité	Adhésion	Adhésion	Sels Matière organique
UV (15 mJ/cm^2)	Génome : modifications de bases, dimères, pontages Protéines : altération de certains acides aminés (F, Y, W), pontages	Réplication Injection	Réplication Adhésion	Turbidité Matière organique
Chlore (2 mg.min.L^{-1})	Protéines : oxydation peu spécifique Génome : dommages sur la région 5' non codante	Réplication Injection	Adhésion Réplication	pH Matière organique Température Sels
Dioxyde de chlore (5 mg.min.L^{-1})	Protéines : oxydation spécifique de certains acides aminés (C, Y, W) Génome : dommages sur les régions 5' et 3'non codantes	Adhésion	Réplication Adhésion	Matière organique Température
Ozone (0.2 mg.min.L^{-1})	Protéines : oxydation préférentielle de certains acides aminés (C, F, H, M, Y, W) Génome : dommages sur la région 5' non codante	Adhésion	Réplication	Température pH Matière organique

2.5. Phénomènes impactant l'efficacité des traitements

Actuellement, la prédiction de l'efficacité d'un traitement multi-barrière repose sur le postulat que l'abattement viral global est la somme des abattements atteints par chaque étape de traitements (Kwok-Keung and LeChevallier, 2013). Plusieurs phénomènes documentés dans la littérature scientifique incitent à remettre en perspective la validité du principe d'additivité des traitements.

2.5.1. Effets synergiques

Lorsque les traitements sont combinés, c'est à dire réalisés simultanément ou de façon séquentielle, l'efficacité globale réelle peut dans certaines situations s'écarter de l'efficacité prédite par additivité. Rattanakul *et al.*(2015) ont observé un effet synergique en prétraitant l'adénovirus 5 au chlore avant exposition aux UV, mais pas lorsque la chloration était réalisée après l'exposition aux UV ou simultanément. Des effets synergiques ont aussi été mis en évidence lors d'une exposition simultanée comme séquentielle du phage MS2 au chlore et aux UV (Rattanakul *et al.*, 2014). Dans cette étude, l'application simultanée des deux traitements a engendré une vitesse d'inactivation 2,3 fois supérieure à la vitesse prédite à partir des traitements conduits séparément. Cho *et al.*(2011), étudiant l'inactivation séquentielle du MS2 par irradiation aux UV basse pression puis chloration, ont seulement décrit un effet additif. Cependant, l'ajout d'un agent oxydant (H_2O_2) en amont du traitement UV-chlore a permis d'augmenter l'inactivation virale via deux mécanismes : la formation d'espèces réactives de l'oxygène par photolyse, puis l'augmentation de la sensibilité des phages au chlore. L'effet synergique global a conduit à un abattement viral de 1,5 log supérieur à l'abattement prévu. Enfin, des effets synergiques ont également été constatés sur l'inactivation du MS2 après application séquentielle UV-ozone ou ozone-UV et dans une moindre mesure lors d'une co-exposition (Fang *et al.*, 2014).

2.5.2. Déviation par rapport au modèle d'inactivation log-linéaire

Le premier modèle décrivant l'inactivation d'un micro-organisme pathogène a été construit en 1908 par Chick puis généralisé la même année à d'autres désinfectants par Watson (Chick, 1908; Watson, 1908). Le modèle Chick-Watson correspond à une décroissance logarithmique de la concentration en pathogènes infectieux au cours du temps décrit par la relation :

$$\ln (c/c_0) = -k_{CW}.C^n.t$$

où c_0 et c et sont les concentrations en pathogènes infectieux initiale et au temps t ; k_{CW} est une constante d'inactivation ; C est la concentration en désinfectant et n un coefficient souvent expérimentalement déterminé comme égal à 1 (cas d'une inactivation de premier ordre).

Des profils d'inactivation s'écartant de ce modèle log-linéaire ont fréquemment été décrits dans les expériences d'inactivation virale (Battigelli et al., 1993; Harakeh and Butler, 1984; Mattle et al., 2011; Mattle and Kohn, 2012; Nieuwstad and Havelaar, 1994). Un profil épaulé traduit une faible vitesse initiale d'inactivation, tandis qu'un profil avec un plateau (*tailing)* est interprété comme une inactivation biphasique avec une vitesse d'inactivation élevée à faible dose et basse à haute dose (Figure 14). Le profil épaulé a été observé lors d'inactivations thermiques (Bozkurt *et al.*, 2015; Tuladhar *et al.*, 2012a), tandis que l'apparition d'un plateau est plus commun lors d'inactivation par les UV ou par désinfection chimique. Ce phénomène peut être à l'origine d'une inactivation virale incomplète lors de la désinfection.

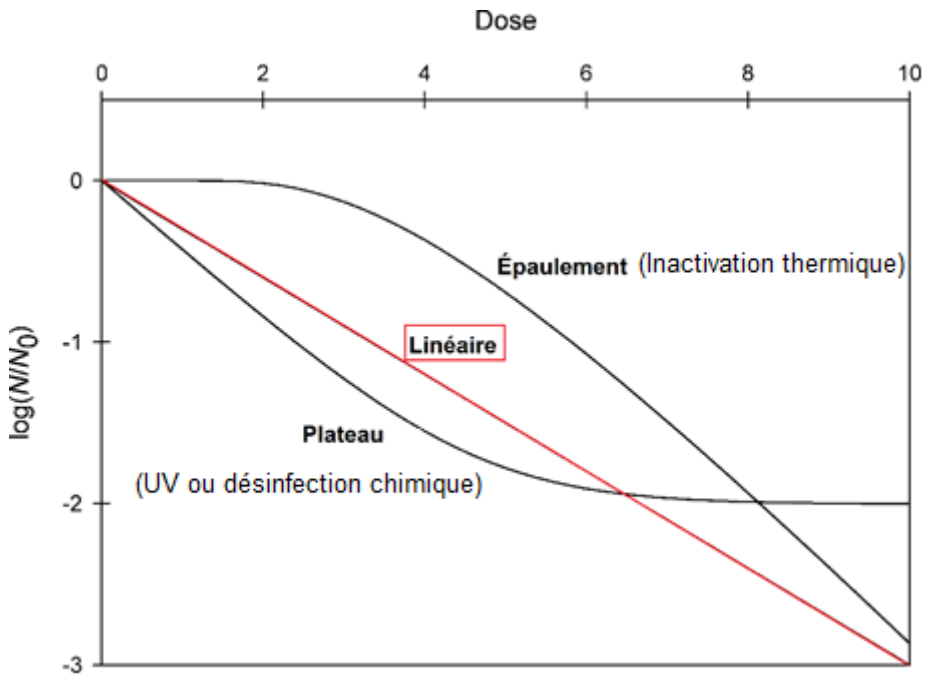


Figure 14 : Types de courbes de désinfection. La courbe linéaire correspond au modèle de Chick-Watson (issu de Jensen *et al.*(2010)).

Des mécanismes permettant d'expliquer la décroissance de la vitesse d'inactivation au cours du temps ont été initialement proposés par Hiatt (1964), qui a distingué les effets mécanistiques liés au processus de réaction des effets inhérents à l'hétérogénéité des virus. Selon les travaux de Sigstam *et al.*(2014), les mécanismes possibles incluent une modification des propriétés physico-chimiques du milieu réactionnel, une modification des propriétés des virus augmentant leur résistance, la préexistence d'agrégats viraux ou leur formation au cours du processus, et enfin l'existence de sous-populations virales de sensibilité variable. Ces différentes hypothèses ont été testées dans le cas de l'inactivation du phage MS2 par le dioxyde de chlore. Il s'est avéré que la désinfection engendrait la formation d'un adduit capable de se lier réversiblement (un lavage

permettant de l'éliminer) aux capsides et de leur conférer une protection (Sigstam *et al.*, 2014). Dans le cas d'une inactivation aux UV à 254 nm, Mattle et Kohn (2012) ont montré que l'apparition d'un plateau était lié à la présence d'agrégats viraux (initialement générés en diminuant le pH) qui favorisent les événements de co-infection et de recombinaison permettant de produire des virus viables à partir de plusieurs virus au génome endommagé. Ils ont de plus observé qu'un retour à pH neutre permettait de dissocier les agrégats des suspensions non exposées aux UV, mais qu'une partie des agrégats exposés aux UV n'était pas redispersée par l'augmentation de pH. Cela signifie que les UV stabiliseraient la cohésion des agrégats, peut-être en créant des pontages protéine-protéine entre virus.

2.5.3. Adaptation des virus aux traitements

Il existe pour finir des différences de sensibilités notables non seulement au sein des représentants d'une même espèce virale comme illustré par Black *et al.*(2009) qui ont comparé la sensibilité au chlore de plusieurs sérotypes d'entérovirus, mais également entre variants appartenant à un même sérotype. Avec un taux de l'ordre de 10^{-4} substitution par nucléotide et par cycle d'infection, l'évolution particulièrement rapide des génomes de virus à ARN leur confère la capacité de s'adapter très rapidement à certaines pressions de sélection auxquelles ils sont soumis entre deux cycles infectieux (Elena and Sanjuán, 2005; Sanjuán *et al.*, 2010). Ce phénomène a permis de générer en laboratoire des variants ayant une résistance accrue à certains modes d'inactivation, en les exposant sur plusieurs cycles à des doses sublétales des divers agents désinfectants. Il expliquerait par ailleurs que des souches environnementales, potentiellement exposées à des conditions physico-chimiques adverses au cours de leur circulation, puissent être plus résistantes que les sérotypes de laboratoire correspondants entretenus dans des conditions n'exerçant pas de pression de sélection notoire. La détermination des caractéristiques génétiques des populations virales, qui s'est développée depuis la démocratisation du séquençage haut débit au début des années 2010 (Posada-Cespedes *et al.*, 2017), a permis d'identifier des polymorphismes participant aux phénotypes résistants et d'approfondir la connaissance des mécanismes d'inactivation.

Un des premier PV thermorésistants, survivant à une inactivation de 1h à 50 °C, a été obtenu en 1957 (Youngner, 1957). Des virus pouvant résister jusqu'à 75°C ont par la suite été isolés (Medearis Jr *et al.*, 1960). En 1975, des variants des PV1 et PV2 thermorésistants ont été obtenus après douze passages entrecoupés d'une inactivation partielle de 2 h à 50 °C. Une analyse par électrophorèse des polypeptides a démontré l'existence de mutations dans les protéines de capside VP1 à VP3, tandis qu'aucune différence n'a été détectée parmi les protéines non structurales. Par ailleurs, la thermorésistance a résulté d'un processus de mutation multi-étapes (Fennell and Phillips,

1974). Récemment, une mutation unique dans la protéine VP1 (M132V) a été identifié comme suffisante pour conférer une thermorésistance au PV (Nguyen *et al.*, 2018). Un variant du PV (souche LSc) ayant une résistance accrue au chlore a été obtenu pour la première fois en 1977 après dix passages, les virus ayant été exposés entre chaque passage à une dose sub-létale de chlore (30 min à une concentration de 0,6 à 0,8 mg/L) (Bates *et al.*, 1977). Plus récemment, une série de travaux conduits par l'équipe de Tamar Kohn a décrit les caractéristiques phénotypiques et génétiques de populations virales présentant une résistance accrue aux UV et au dioxyde de chlore obtenues par évolution expérimentale. Chez le phage MS2, la résistance au dioxyde de chlore a été associée à des mutations engendrant un enrichissement des sites de liaison en acides aminés plus stables vis-à-vis du dioxyde de chlore, n'impactant pas la fonction d'adhésion aux cellules cibles après traitement (Zhong *et al.*, 2016). Dans le cas de l'échovirus 11, la résistance au dioxyde de chlore était due à l'apparition de la capacité à utiliser un récepteur cellulaire alternatif (Zhong *et al.*, 2017b). Par ailleurs, il a été montré que des échovirus 11 ayant une résistance accrue aux UV-C ont une fidélité réplicative supérieure à celle des populations sauvages. Cette résistance aux UV impliquerait des mécanismes analogues à ceux mis jeu dans la résistance à la ribavirine, un antiviral mutagène (Carratalà *et al.*, 2017). Enfin, des MNV résistants au chlore ont été générés *in vitro* dès trois passages. Quatre à six mutations non synonymes dans les protéines VP1 et VP2 ont été détectées dans les deux réplicats expérimentaux au dixième passage, dont une dans VP2 commune aux deux populations (Rachmadi *et al.*, 2018b).

L'émergence de variants résistants n'est pas un phénomène observé exclusivement en conditions artificielles au laboratoire. Des variants du PV1 résistants au chlore ont été isolés dans de l'eau de distribution contenant une concentration résiduelle de chlore de 1 mg/L (Shaffer *et al.*, 1980). De plus, parmi sept isolats de coxsackievirus B4 ou B5 issus d'eau de distribution désinfectée par chloration ou d'eaux usées, six présentaient une résistance au chlore supérieure à la souche de laboratoire correspondante (Payment *et al.*, 1985). Plus récemment, Meister *et al.* (2018) ont caractérisé les cinétiques d'inactivation de neuf souches d'entérovirus (coxsackievirus B1, B4 et B5) isolés d'eaux usées et de deux souches de laboratoire (coxsackievirus B5 Faulkner, échovirus 11 Gregory), au cours de plusieurs traitements d'inactivation (chaleur, UV, chlore, dioxyde de chlore, lumière solaire). Les auteurs ont mis en évidence d'importantes variabilités inter- comme intra-sérotypiques dans les cinétiques de désinfection. Ils ont en particulier démontré par une analyse statistique bayésienne qu'au moins la moitié des six isolats de CVB5 avaient une probabilité supérieure à 90 % d'être plus résistants que la souche de laboratoire Faulkner à la chaleur, au chlore, au dioxyde de chlore et aux UV. Cette étude illustre les limites de l'utilisation des souches de laboratoire pour évaluer la sensibilité des virus circulants aux traitements d'inactivation. Selon

Rachmadi *et al.*(2018a), les traitements de désinfection de l'eau exerceraient une pression de sélection sur les virus à ARN en sélectionnant les virus les plus résistants. Les pratiques de désinfection, en exerçant une pression de sélection, pourraient ainsi contribuer à l'évolution des populations virales (Figure 15).

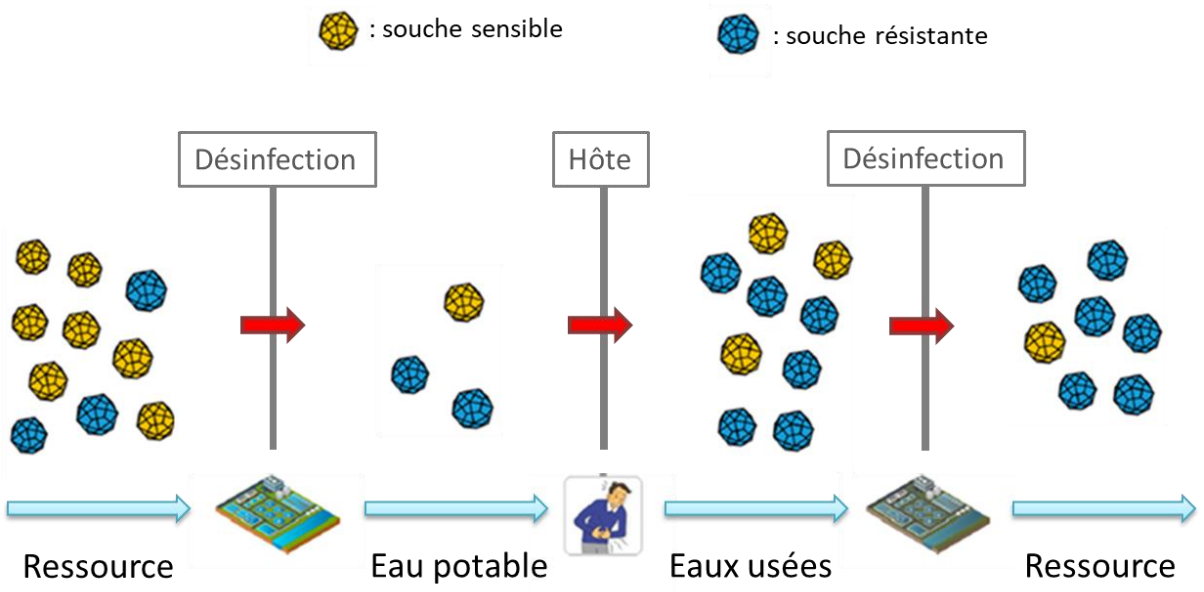


Figure 15 : Sélection naturelle des virus entériques due à la désinfection de l'eau (adapté de Rachmadi *et al.*(2018a)).

2.6. Conclusion

Chaque mode d'inactivation virale met en jeu une combinaison différente de mécanismes moléculaires affectant les protéines et/ou le génome. Dans les milieux hydriques environnementaux, la persistance virale est majoritairement déterminée par la stabilité des capsides, sous l'influence principalement de la température. Les performances des méthodes de désinfection dépendent d'une part des caractéristiques de chaque virus, et d'autre part des conditions physico-chimiques. Cette partie montre l'importance de mener les expériences d'inactivation dans des conditions parfaitement maîtrisées, en contrôlant notamment l'exposition réelle des virus aux agents inactivants. De plus, compte-tenu des capacités d'adaptation des virus et des différences de sensibilité entre les souches circulantes et les modèles entretenus en laboratoire, il serait très informatif que les travaux évaluant l'efficacité des traitements puissent également caractériser la sensibilité d'isolats environnementaux.

3. Interactions des virus entériques humains dans leurs environnements

3.1. Généralités

Le cycle des virus entériques peut être divisé en deux grandes phases, la première débutant au moment de l'entrée en contact avec l'hôte et la seconde commençant à partir de l'excrétion des particules nouvellement synthétisées dans le milieu extérieur. La première phase dure quelques jours à quelques semaines et comprend toutes les étapes nécessaires à la génération de nouvelles particules : fixation aux cellules hôtes (cellules de l'épithélium intestinal le plus souvent), internalisation, décapsidation, réplication du génome, synthèse protéique et assemblage de nouvelles particules, puis relargage des virions hors de la cellule avant excrétion dans le milieu extérieur. La seconde phase est une dissémination et une persistance dans l'environnement qui peut se prolonger plusieurs mois avant que les virus soient ingérés par un nouvel hôte.

Les virus entériques sont ainsi soumis à des milieux extrêmement variés caractérisés par d'importantes variations de température, de salinité, de pH ou d'humidité et peuvent entrer au voisinage d'une diversité conséquente de molécules, micro-organismes, et autres particules biologiques ou minérales. Dans l'hôte, les virus sont confrontés à un pH bas, à des enzymes protéolytiques, et au microbiote intestinal entouré de mucus. Dans le système digestif de l'hôte, les virus établissent en particulier des interactions avec des bactéries ou des produits bactériens, qui peuvent favoriser leur infectivité et pathogénèse. Dans les environnements hydriques, les virus sont soumis à des variations de température ou salinité, et peuvent s'agréger ou s'associer à des éléments biotiques ou abiotiques.

3.2. Interactions avec le microbiote intestinal et pathogénèse

3.2.1. Types d'interactions

Le système digestif humain abrite de 10^{12} à 10^{14} micro-organismes et est à ce titre le système de l'organisme qui contient le plus grand nombre de bactéries commensales (Adak and Khan, 2019). Le nombre d'espèces bactériennes qui y est représenté suit une sorte de gradient qui varie de 200 dans la cavité buccale à environ 1000 dans le colon (Lozupone *et al.*, 2012). Le nombre de bactéries y est aussi croissant : 10 à 10^3 cfu (colonies formant unités) /mL dans l'estomac, 10^4 à 10^7 cfu/mL dans l'intestin grêle, et 10^{10} à 10^{13} cfu/mL dans le colon. Le microbiote commensal est connu pour son rôle protecteur contre les micro-organismes pathogènes, entre-autres en formant une barrière à la surface des cellules de l'épithélium intestinal (Ubeda *et al.*, 2017). Plus méconnu est le rôle facilitateur d'infection qu'il exerce vis-à-vis de certains virus entériques, qui auraient évolué en tirant profit des bactéries commensales (Berkhout, 2015).

Les interactions virus-bactéries peuvent être classées en deux groupes : les interactions directes et les interactions indirectes (Erin A. Almand *et al.*, 2017a). Les interactions directes font références aux liaisons physiques entre les virus et des bactéries ou des produits générés par celles-ci. Elles favorisent le processus infectieux des virus, généralement la fixation aux cellules hôtes. Elles sont donc au bénéfice des virus et neutres pour les bactéries. Les interactions indirectes ne mettent pas en jeu de contact direct entre les virus et les bactéries. Elles font référence au fait qu'une première infection bactérienne ou virale peut affaiblir l'hôte et favoriser un second processus infectieux. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux interactions directes, qui sont résumées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Interactions directes entre des virus entériques et des bactéries du système digestif (d'après Almand *et al.*(2017a))

Virus	Bactéries ou molécules	Description	Références
Norovirus humain	*Enterobacter cloacae*	Les pseudo-HBGA* sont des cofacteurs nécessaires à l'infection des lymphocytes B	(Erin A Almand *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2014; Miura *et al.*, 2013)
MNV	*E. cloacae*, bactéries intestinales, gangliosides	Les pseudo-HBGA sont des cofacteurs de l'infection Les bactéries intestinales favorisent la persistance de l'infection	(Baldridge *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2014)
Poliovirus	Bactéries intestinales, polysaccharides contenant de l'acétyl-N-glucosamine	Augmentation de la fixation au récepteur cellulaire PVR	(Kuss *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2014a)
Réovirus T3SA+	Bactéries intestinales, *Escherichia coli, Ochrobactrum intermedium, Bacillus cereus, Enterococcus faecalis*, certains polysaccharides	Augmentation de la fixation des virus aux cellules et de la réplication virale	(Kuss *et al.*, 2011)
Rotavirus	Bactéries intestinales	Augmentation de la fixation des virus aux cellules et de la réplication virale	(Erin A Almand *et al.*, 2017)

* HBGA (*histo-blood group antigen*) : antigènes de groupes sanguins tissulaires

3.2.2. Entérovirus

Les interactions directes virus-bactéries font l'objet d'un nombre croissant d'études depuis les travaux pionniers de Julie K. Pfeiffer et son équipe en 2011 (Kuss *et al.*, 2011). Par des expériences *in vivo*, les auteurs ont premièrement montré que des souris ayant reçu un traitement antibiotique déplétant le tube digestif du microbiote intestinal présentaient, après ingestion d'un inoculum de PV1 (Mahoney), une mortalité deux fois inférieure à celle des souris contrôle. Dans ces souris, le génome viral était répliqué en moins grand nombre. Les auteurs ont donc prouvé que le microbiote intestinal augmente *in vivo* l'infectivité du PV. Ils ont ensuite constaté que certaines bactéries ou composants bactériens augmentaient *in vitro* la viabilité virale. Ces bactéries étaient aussi bien des bactéries à Gram-positif (paroi constituée de peptidoglycane à 90 %) comme *Bacillus cereus* et *Enterococcus faecalis*, que des bactéries à Gram-négatif (paroi pauvre en peptidoglycane mais enveloppe externe riche en LPS) comme *E. coli* et *O. intermedium.* Plus particulièrement, la bactérie *B. cereus,* identifiée comme augmentant le plus la viabilité du poliovirus, ainsi que le lipopolysaccharide (LPS) de *E. coli* ont favorisé la fixation du poliovirus aux cellules HeLa. Parmi le panel de polysaccharides, ceux qui ont montré un effet promoteur d'infectivité du PV *in vitro* (à une concentration de 1 mg/ml) étaient des polysaccharides de plus de six monosaccharides contenant l'acétyl-N-glucosamine comme le LPS, le peptidoglycane, la chitine et la mucine (Kuss *et al.*2011 ; Robinson, Jesudhasan, et Pfeiffer 2014).

Le mode d'action du LPS est schématisé sur la Figure 16 qui montre que les LPS facilitent la liaison du PV à son récepteur (PVR). En effet, il n'a pas d'effet promoteur de fixation sur des cellules n'exprimant pas le PVR, ou dont les PVR ont préalablement été bloqués par des anticorps spécifiques (Robinson *et al.*, 2014a).

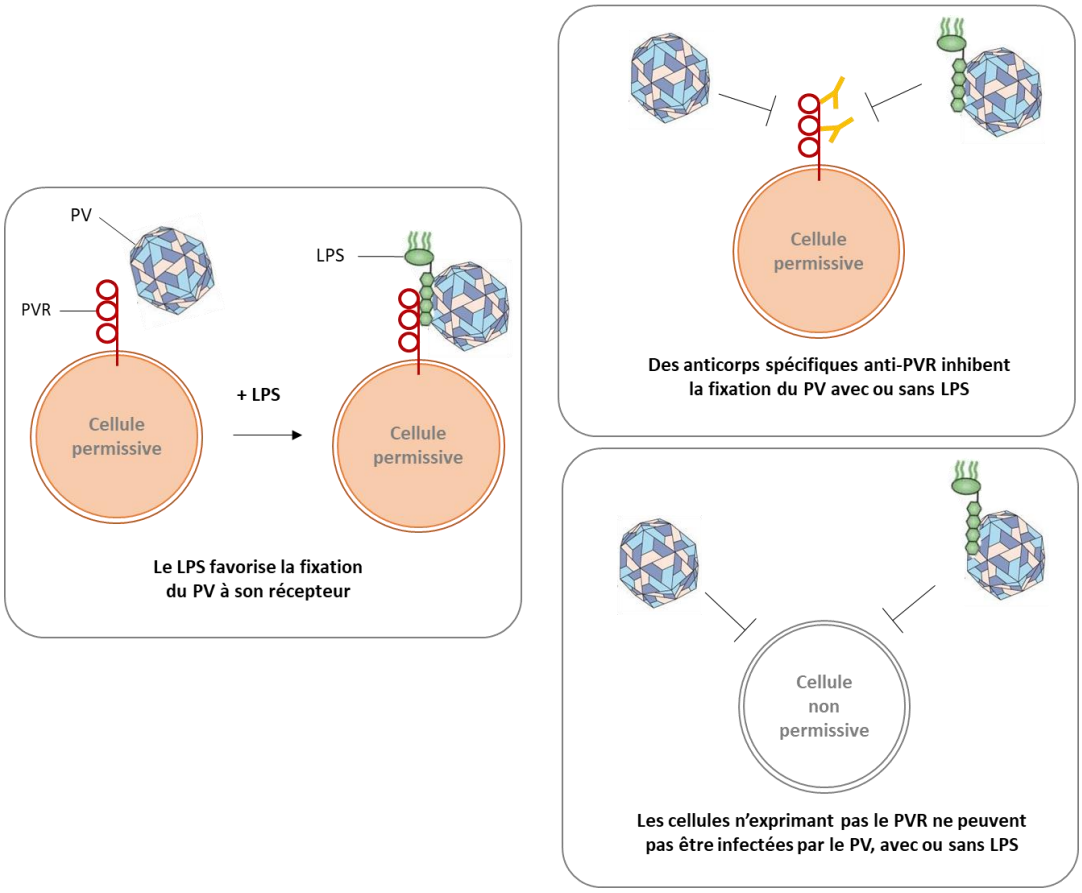


Figure 16 : Le LPS favorise la fixation du poliovirus aux cellules cibles en augmentant l'affinité du poliovirus pour son récepteur PVR. D'après Karst *et al.*(2016) et Robinson *et al.*(2014a).

L'équipe de Julie K. Pfeiffer a ensuite testé un panel de 41 souches bactériennes pour identifier certains déterminants bactériens influençant le processus infectieux du PV. Les deux tiers des bactéries testées (13/41) aussi bien à Gram-positif que à Gram-négatif ont augmenté *in vitro* l'infectivité du virus sur des cellules HeLa. La bactérie *Lactobacillus johnsonii,* issue d'un isolat fécal, est celle qui a été capable de fixer le plus de particules virales. Leurs expériences ont confirmé que l'interaction virus-bactérie nécessite des exopolysaccharides bactériens. Les auteurs ont enfin montré que l'augmentation de la fixation du PV aux cellules cibles induite par certaines bactéries était associé à un accroissement du nombre d'événements de co-infection (jusqu'à six particules virales au sein d'une même cellule) et donc de recombinaison des génomes viraux (Erickson *et al.*, 2018). D'autres entérovirus comme le coxsackievirus B3 peuvent interagir avec des bactéries ou du LPS (Aguilera *et al.*, 2019).

Des exopolysaccharides bactériens et en particulier le LPS favorisent donc *in vitro* comme *in vivo* l'infectivité d'entérovirus, via des interactions directes, en augmentant l'affinité pour leur récepteur. Une des conséquences est l'augmentation des co-infections et donc des événements de recombinaisons participant à la diversité génétique des virus.

3.2.3. Norovirus

Les norovirus utilisent une grande variété de polysaccharides pour infecter les cellules eucaryotes, en particulier les antigènes de groupes sanguins tissulaires (HBGA) qui facilitent la fixation aux cellules (Harrington *et al.*, 2002; Tan and Jiang, 2005). Certaines bactéries intestinales expriment des pseudo-HBGA, des polymères extracellulaires dont la structure est proche des HBGA humains, auxquelles les norovirus peuvent se fixer (Miura *et al.*, 2013; Springer *et al.*, 1961). Mirua *et al.* ont par exemple observé la fixation des norovirus GI.1 et GI.6 à la bactérie *Enterobacter cloacae*. Dans le cas du norovirus GI.1, l'interaction implique les antigènes A présents sur les pseudo-HBGA, et plus particulièrement l'acétyl-N-galactosamine terminal. Par ailleurs une mutation ponctuelle (W375A) abolit l'interaction. Il semble ainsi exister une forte spécificité d'interaction, de même qu'avec les HBGA humains (Huang *et al.*, 2005). D'autres auteurs ont montré que les norovirus GI.6 et G1.4 peuvent se fixer à un panel de bactéries représentatives du microbiote intestinal, sans pour autant préciser le rôle des pseudo-HBGA dans ces interactions (Erin A. Almand *et al.*, 2017b).

L'interaction entre les norovirus et les pseudo-HBGA aurait un rôle prépondérant pour l'initiation du processus infectieux. En effet, des pseudo-HBGA ou la bactérie *E. cloacae* sont nécessaires à l'infection des lymphocytes B par le norovirus (GII.4) dans le système de culture développé par Jones et ses collègues (2014a) (Figure 17 A). De plus, de la même façon qu'évoqué précédemment avec le poliovirus la déplétion du microbiote intestinal de souris inhibe l'infection par le norovirus murin (Jones *et al.*, 2014), et les souris dont on restaure le microbiote redeviennent sensibles au MNoV (Baldridge *et al.*, 2015). Chez l'homme il existe par ailleurs un lien entre l'abondance de certains groupes de bactéries et la susceptibilité de l'infection les norovirus (Rodríguez-Díaz *et al.*, 2017).

Certiains norovirus (GII.4 et GI.3) peuvent également se lier à d'autres molécules comme des gangliosides (glycolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acides sialiques) qui sont des lipopolysaccharides présents sur la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (Han *et al.*, 2014). Dans le cas des MNoV, les acides sialiques terminaux des gangliosides sont des facteurs de fixation aux macrophages murins (Figure 17 B) (Taube *et al.*, 2009).

Le microbiote intestinal a enfin un rôle plus indirect, en modulant la composition cellulaire de l'épithélium intestinal. Chez la souris, le récepteur protéique du MNoV, nommé CD3001f, est exprimé par des cellules de l'épithélium très peu abondante appelées *tuft cell* (cellules chimiosensible riches en microvillosités). L'équipe ayant découvert l'existence de ce récepteur (Orchard *et al.*, 2016) a également montré que le microbiote intestinal stimule chez la souris la prolifération de ces cellules et favorise donc l'infection par le MNoV (Figure 17 C et D) (Wilen *et al.*, 2018).

Enfin, les sels biliaires ont un rôle important pour permettre l'infection par les norovirus, mais cela n'impliquerait pas d'interactions directes entre les deux. Dans le modèle de culture *ex vivo* sur entéroïdes humains développé par Ettayebi *et al.*(2016), la bile est un élément indispensable à la réplication du génome viral (Figure 17 B). Le mécanisme est lié à un effet des sels biliaires sur les cellules et non sur les virus, dans la mesure où la réplication du virus est stimulée lorsque les cellules sont prétraitées par des sels biliaires, mais non lorsque seuls les virus le sont.

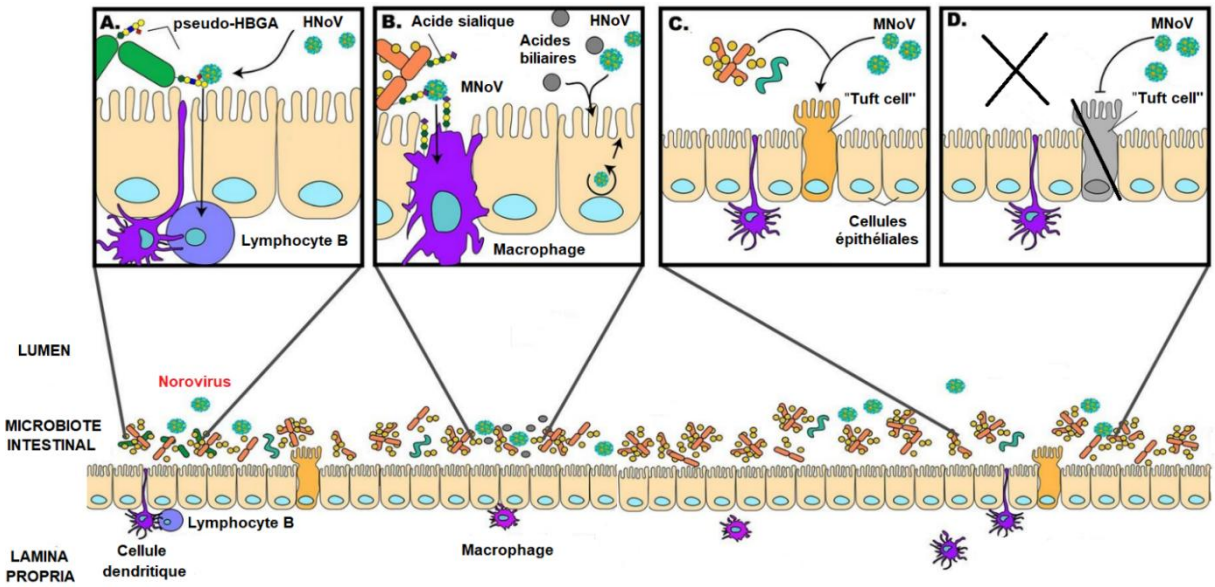


Figure 17 : Influence du microbiote intestinal sur le processus infectieux du norovirus (d'après (Sullender and Baldridge, 2018)).

3.2.4. Réovirus

De même que pour le PV ou le norovirus, la déplétion du microbiote intestinal de la souris par des antibiotiques diminue la réplication du réovirus T3SA+ dans l'intestin ainsi que les symptômes associés à une infection (Kuss *et al.*, 2011), et inhibe également l'infection par rotavirus (Uchiyama *et al.*, 2014). Le reovirus (T1L et T3D) interagit avec des bactéries à Gram-positif (*B. subtilis*) ou à Gram-négatif (*E. coli*) ainsi qu'avec des polysaccharides bactériens de façon sérotype dépendante (Berger *et al.*, 2017a). On trouve parmi ces polysaccharides le LPS, le PG, la mucine, le mannane et l'acide lipoïque. Par ailleurs le rotavirus est connu pour reconnaître des glycannes exposant des motifs d'acide sialiques à la surface des cellules hôtes (Stencel-Baerenwald *et al.*, 2014). Ils se pourrait donc qu'il puisse également se fixer à des acides sialiques bactériens, mais cela ne semble pas avoir été décrit. Le mécanisme exact de l'effet promoteur d'infectivité des réovirus par le microbiote intestinal n'a pas été détaillé. En revanche certaines bactéries augmentent la thermorésistance du rotavirus (Berger *et al.*, 2017a), ce qui pourrait participer à maintenir son potentiel infectieux au sein de l'hôte.

3.2.5. Autres virus entériques

Il n'a pas été démontré que les virus entériques autres que ceux mentionnés ci-dessus puissent interagir directement avec le microbiote et en tirer bénéfice pour infecter l'hôte. Les astrovirus infectent de la même façon des souris normales ou celles dont le microbiote intestinal a été déplété (Ingle *et al.*, 2019). De plus il a été montré que parmi des enfants atteints de diarrhées persistantes des astrovirus étaient plus souvent détectés chez ceux ayant suivi un traitement antibiotique (Unicomb *et al.*, 1998). Dans le cas des adénovirus, le processus infectieux serait indirectement inhibé par le microbiote intestinal qui stimule la production de défensines antivirales (Wilson *et al.*, 2013).

3.2.6. Effet stabilisateur des interactions virus -microbiote *in vitro*

En plus d'augmenter la pathogenèse de certains virus entériques, les exopolysaccharides bactériens ont également un rôle stabilisateur des particules virales. Julie K. Pfeiffer et ses collègues (Robinson *et al.*, 2014a) ont noté que le LPS et certains autres polysaccharides à une concentration de 1 mg/ml maintiennent le potentiel infectieux du poliovirus exposé à deux modes d'inactivation : six heures d'incubation à 42 °C ou un traitement au chlore à 1 mg.min. L^{-1}, qui inactivent tous deux totalement le virus mis dans du PBS seul. Lorsque l'ARN viral est relargué, les virus opèrent une transition 160S-80S traduisant une diminution de leur densité. Cette transition se produit au cours du processus infectieux normal, ou bien lorsque les particules subissent une inactivation thermique *in vitro.* Les auteurs ont montré qu'à l'issu du traitement thermique les particules virales incubées avec du LPS conservent leur structure initiale de 160S. Ainsi le LPS stabilise la structure du virus et empêche le relargage de l'ARN lors d'une élévation de température (Figure 18).

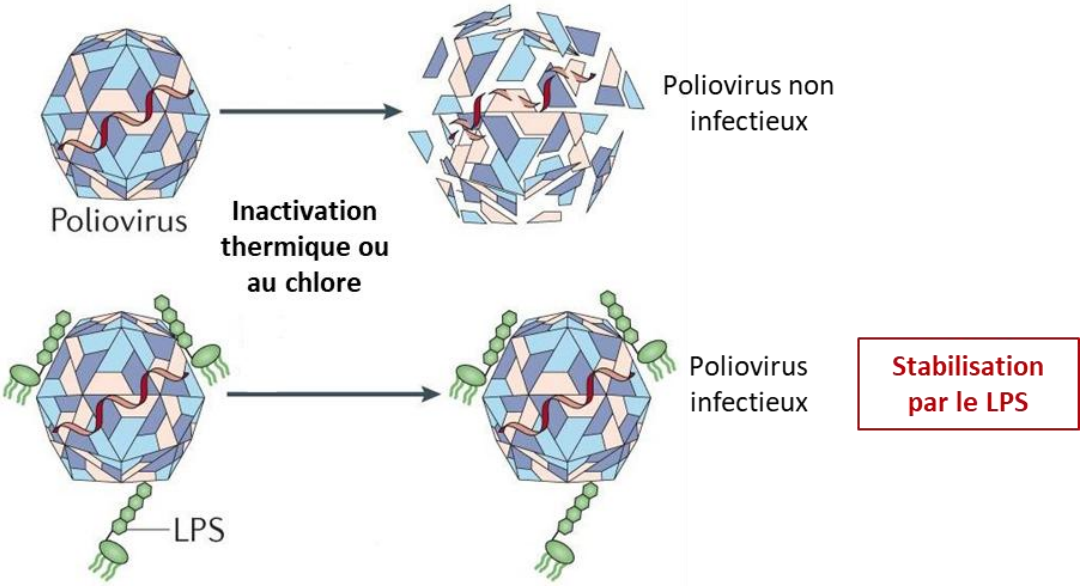


Figure 18 : Stabilisation du poliovirus par le LPS. Le LPS augmente la thermostabilité et la résistance au chlore du poliovirus en favorisant la stabilité et l'intégrité de la capside (d'après Karst (2016)).

Le mécanisme moléculaire de l'interaction poliovirus-LPS implique la tyrosine en position 99 de VP1 située dans la BC-loop exposée à la surface des particules. La substitution de cette tyrosine par une lysine (T99K) induit une diminution de la liaison au LPS, à température inférieure à 40 °C. Si cette position n'est pas le site d'interaction avec le LPS (la délétion de l'acide aminé 99 n'abolit pas l'interaction), les auteurs suggèrent qu'elle influencerait l'accessibilité au site de liaison situé dans une poche. Ainsi la mutation T99K bloquerait l'accès au site de liaison à température physiologique, mais au-delà de 40°C, la température induirait l'ouverture de cette poche. Le coxsackievirus B3 est également protégé d'une inactivation thermique (4h30 min à 44°C) par du LPS ou les bactéries *E. coli*, *Prevotella ruminicola*, *Bacillus badius* et *Lactobacillus johnsonii*. Il existe toutefois des distinctions liées au sérotype viral dans la mesure où tous protègent le CVB3-H3, mais seul le LPS protège le CVB3-Nancy (Aguilera *et al.*, 2019).

La liaison entre les norovirus et les bactéries produisant des pseudo-HBGA participe à leur stabilisation. En effet, la liaison des norovirus GI.1 et GII.4 aux bactéries *E. coli* produisant des pseudo-HBGA leur confèrent une protection lors d'un choc thermique de 2 min à 90°C, en maintenant l'intégrité des sites antigéniques et la capacité à se lier à la mucine. Cette protection n'est pas observée avec de bactéries *E. coli* ne produisant pas de pseudo-HBGA (Li *et al.*, 2015).

Enfin, les réovirus T1L et T3D, dont l'infectivité décroit après 2h à température ambiante, sont stabilisés en présence des polysaccharides auxquels ils peuvent se fixer (LPS, PG, mannane, mucine, acide lipoïque) (Berger *et al.*, 2017a). La stabilité et le niveau de protection induite par les polysaccharides dépend du sérotype.

3.3. Interactions dans les milieux hydriques

3.3.1. Généralités

Les analyses des virus dans les matrices hydriques consistent le plus souvent en une étape de concentration (nécessaire pour atteindre une limite de détection suffisamment petite) suivie d'une quantification, qui peut être réalisée par culture ou biologie moléculaire. Elles renseignent sur la contamination des milieux considérés (milieux aquatiques environnementaux, qualité des ressources, réseau de distribution, eau produite…) afin par exemple d'adapter les traitements de désinfection et de contrôler leur efficacité, ou d'évaluer le risque sanitaire lié à la présence de virus dans des eaux récréatives ou de consommation. Ces analyses n'apportent pas de renseignements directs sur le comportement des particules virales, tel que leur état libre, agrégé, ou associé à d'autres constituants. En revanche, une littérature abondante s'est attachée à décrire les différentes interactions pouvant s'établir entre les virus et les autres particules des milieux hydriques, et à en discuter les implications en matière de transport, persistance et inactivation.

3.3.2. Les virus entériques en milieu hydrique

En milieu aqueux, les virus forment de suspensions colloïdales du fait de leur taille sub-micrométrique et des effets négligeables de la gravitation par comparaison à ceux de l'agitation thermique (la sédimentation des virus libre nécessite une ultracentrifugation). La nature protéique des capsides leur confère une charge dans les milieux polaires. Les virus entériques ont généralement des points isoélectriques inférieurs à 7 (Tableau 16) et sont donc chargés négativement dans des milieux proches de la neutralité. Ce sont ainsi des particules hydrophiles dont les interactions sont régies par des forces de van der Waals de faible intensité, des mouvements Browniens liés à l'énergie thermique et des interactions électrostatiques. Cela implique que, selon les caractéristiques physico-chimiques des milieux hydriques, les virus entériques ne forment pas nécessairement une suspension monodisperse de particules individualisées (stabilité colloïdale), mais peuvent interagir physiquement et s'agréger.

Tableau 16 : Points isoélectriques estimés de quelques virus entériques (d'après Michen et Graule (2010) et complété)

Virus	Point isoélectrique (pHi)	Référence
Adénovirus 5	4,5	(Trilisky and Lenhoff, 2007)
Coxsackievirus B5	4,75 et 6,75	(Butler *et al.*, 1985)
Echovirus 1	4,0	(Butler *et al.*, 1985)
Coxsackievirus A21	4,8 et 6,1	(Murray *et al.*, 1978)
Poliovirus 1	4,0 et 7,4	(Nasser *et al.*, 1991)
Virus de l'hépatite A	2,8	(Nasser *et al.*, 1991)
Virus de l'hépatite E	5,9 à 6,4	(Vikram and Kumar, 2018)
Norovirus (GI et GII)	5,5 à 6,0	(Goodridge *et al.*, 2004)
Rotavirus simien SA11	8,0	(Butler *et al.*, 1985)

3.3.3. Concept de double couche électrique

Les virus ont une charge nette négative en solution lorsque le pH est supérieur à leur point isoélectrique, ce qui est le plus souvent le cas dans les milieux hydriques environnementaux. Cette charge négative est notamment due à la dissociation des groupements carboxyles situés sur la face externe de la capside. En solution, des contre-ions sont attirés au voisinage de ces charges négatives pour constituer une couche compacte de cations (couche de Stern), suivie d'une couche plus diffuse constituée d'anions et de cations (couche de Gouy-Chapman). Cette double couche détermine les interactions électrostatiques auxquelles sont soumis les virus (Figure 19). Les virus sont individualisés (suspension colloïdale) lorsque les forces de répulsion prédominent. Lorsque la valence ou la concentration des contre-ions augmente ou que le pH diminue, la couche diffuse s'amincit et forces de répulsion sont annulées, permettant aux particules négativement chargées de se rapprocher suffisamment pour être soumises aux forces attractives de faible portée comme les forces de Van der Waals et les liaisons hydrogène. Il s'agit du phénomène de coagulation (Rao and Melnick, 2019).

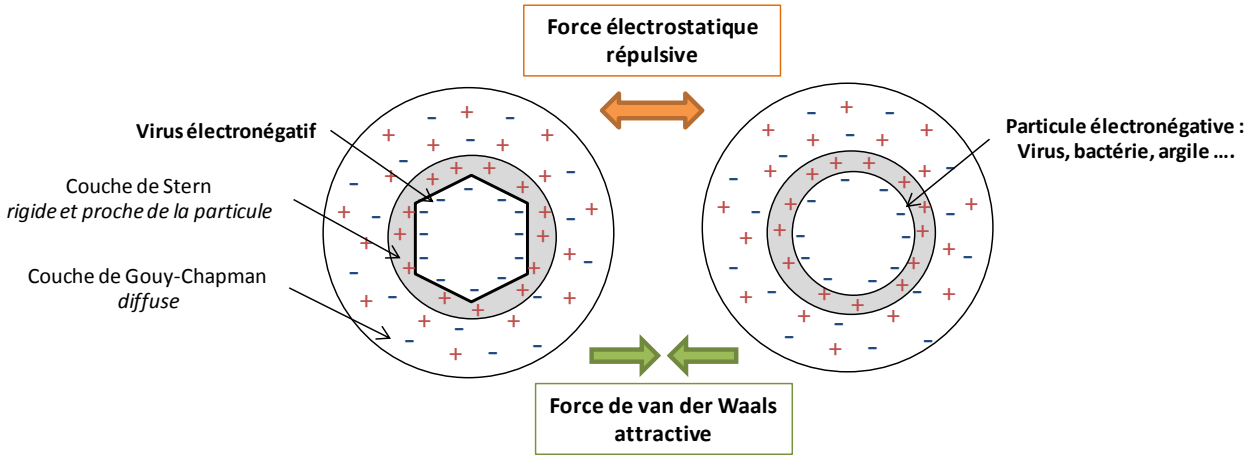


Figure 19 : Schéma de la double couche électrique au voisinage des virus et autres colloïdes électronégatifs.

3.3.4. Agrégation

L'agrégation des virus fait référence à une association physique, durable dans des conditions données, d'au moins deux particules virales. On nomme homo-agrégat une association de virus semblables, et hétéro-agrégat une association impliquant différents virus. Analyser l'agrégation au cours du temps d'une suspension de virus monodispersés revient à en étudier la stabilité colloïdale. La stabilité d'un système colloïdale peut par exemple être étudiée à travers la distribution de la taille des particules, la diffusion de la lumière ou le potentiel zêta.

Historiquement, le phénomène d'agrégation a premièrement été étudié sur le virus de la mosaïque du tabac et d'autres virus de plante. Les biochimistes avaient noté que leurs propriétés variaient selon qu'ils était produits en laboratoire ou isolés de l'environnement, et avaient montré par microscopie électronique à transmission (MET) que le mode de purification des productions virales pouvait engendrer leur agrégation (Bawden and Pirie, 1938; Crook and Sheffield, 1946).

Les conditions favorisant l'agrégation du PV et du réovirus ont été extensivement étudiées à la fin des années 1970 par Floyd, Sharp et Young, qui ont utilisé une méthode d'évaluation du nombre de particules individualisées basée sur leur vitesse de sédimentation (*single particle approximation test* ou SPA) couplé à la microscopie électronique à transmission (MET) et à une titration par culture. Dans les lysats cellulaires bruts obtenus par congélation-décongélation, les particules de PV forment des amas qui peuvent être dissociés par dilution dans du PBS puis séparation sur gradient de sucrose (Young and Sharp, 1977). Cependant, le simple fait de diluer des suspensions de PV monodisperses dans de l'eau distillée (ou autre solution à faible force ionique) ou dans une solution acide induit la formation d'agrégats atteignant parfois plusieurs centaines de particules (Figure 20). Ce phénomène est virus-dépendant, dans la mesure où il affecte moins le réovirus, et est réversible par dilution dans

une solution modérément saline ou retour à pH neutre (Floyd and Sharp, 1977). À travers ces études, les auteurs avertissent que la dilution de suspensions stocks de virus dans de l'eau, dans le cadre des expériences de désinfection, peut conduire à des résultats ambivalents liés à la présence de populations hétérogènes de particules agrégées et individualisées. Les mêmes auteurs ont ensuite caractérisé l'influence du pH, des sels, et plus généralement de différents tampons salins sur la formation d'agrégats (Floyd and Sharp, 1979, 1978). Leurs résultats ont indiqué que le PV et le réovirus tendent à s'agréger fortement lorsque leur charge globale est positive mais seulement dans certaines conditions salines lorsque leur charge est négative. À la différence du PV (pHi de 8,2 dans cette étude), le réovirus s'agrège à son point isoélectrique (3,9). Ainsi pour des pH compris entre 7 et 10,5 les particules sont monodispersées, sauf rare exception (tampon borate). A pH acide, les cations mono- et divalents tendent à inhiber l'agrégation, tandis que les cations trivalents favorisent l'agrégation (Floyd and Sharp, 1978). Les auteurs soulignent que des conditions favorisant l'agrégation d'un virus donné n'ont pas nécessairement le même effet sur un autre virus.

Ayant caractérisé la formation d'homo-agrégats de PV et de réovirus, Floyd (Floyd, 1979) s'est enfin penché sur les hétéro-agrégats d'une suspension mixte. Aucun agrégat n'a été détecté à pH 7 (tampon Tris). À pH 6 (tampon phosphate), le PV a formé des agrégats contrairement au réovirus, qui a cependant eu tendance à se lier aux agrégats de PV. À pH inférieur, les auteurs ont constaté la formation d'hétéro-agrégats massifs.

Pour conclure sur cette série de travaux, les auteurs affirment que les virus en milieu hydrique se comportent comme des suspensions colloïdales à trois exceptions près qui sont : leur tendance à s'agréger à faible force ionique, l'influence des ions et notamment des cations, et les différences de comportement selon le type de virus.

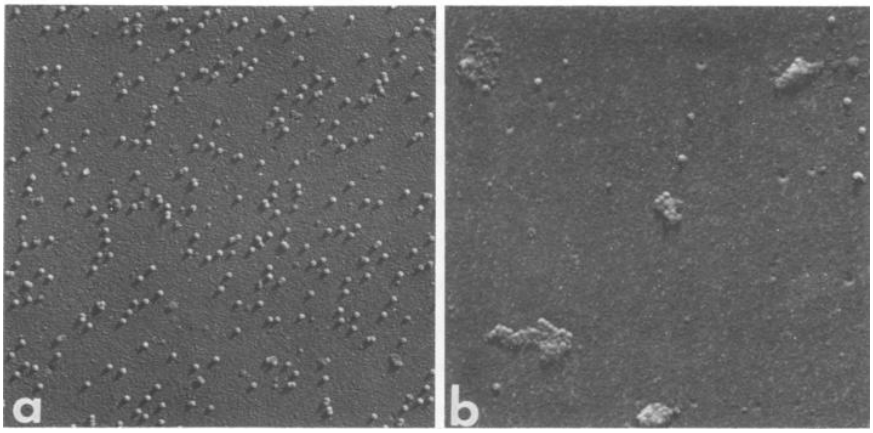


Figure 20 : Observation par microscopie électronique de particules de PV après dilution dans du PBS (a ; x 24 800) ou de l'eau distillée (b ; x 29 000). Issu de (Floyd and Sharp, 1979).

Tableau 17 : Principales méthodes ayant été utilisées pour étudier l'agrégation virale

Méthode	Remarques
Microscopie électronique à transmission (MET)	Permet d'observer la composition des agrégats (hétéro-agrégats) Mais : nécessite une concentration de virus très élevée (>10^9 particules/mL) ; la préparation peut induire des artefacts ; méthode non quantitative
Ultracentrifugation (*Single particle approximation test*)	Fournit une estimation approximative du pourcentage de particules formant des agrégats Mais : nécessite une manipulation très précautionneuse ; seuls peuvent être comparés les échantillons issus d'une même centrifugation ; seul un virus est étudié à la fois et pour lequel les conditions de centrifugation doivent avoir été déterminées ; ne renseigne pas sur la taille des agrégats.
Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	Fournit une distribution précise de la taille des agrégats sur une large étendue ; nécessite un faible volume d'échantillon ; analyse rapide (quelques minutes) ; faible encombrement.

Plusieurs techniques permettent d'étudier l'état agrégation virale (

Tableau 17). La première historiquement utilisée permettait de séparer les agrégats des particules individualisées sur la base de leur vitesse de sédimentation par ultracentrifugation. Les fractions devaient ensuite être titrées ou analysées par microscopie. Cette méthode, qui impliquait nombre de contraintes et d'imprécision a rapidement été délaissée au profit d'une technologie beaucoup plus robuste. Dans les années 1980, le développement des applications des lasers ont permis l'étude de la taille des particules virales et des agrégats par diffusion dynamique de la lumière (DLS), une technique d'analyse spectroscopique permettant de mesurer la distribution de la taille de particules de 1 nm à 10 µm. La technologie repose sur le phénomène de diffusion se produisant lorsque la lumière d'un laser rencontre une particule en solution. Le principe est que plus une particule est volumineuse, moins elle est mobile et moins l'intensité de la lumière diffusée varie au cours du temps. Une mesure de l'intensité réémise à un angle donné au cours du temps permet après traitement mathématique de renseigner sur le rayon hydrodynamique et donc la taille des particules (Mainard and Jacob, 2016).

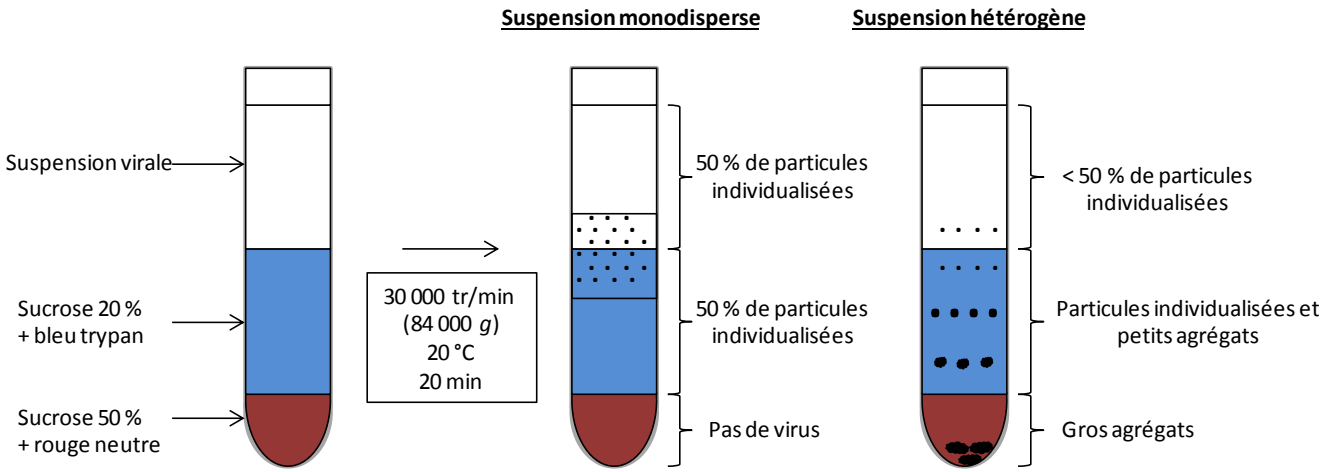


Figure 21 : Principe de la séparation des particules individualisées et agrégées par ultracentrifugation (*single particle approximation test*) réalisée par Young et Sharp (1977).

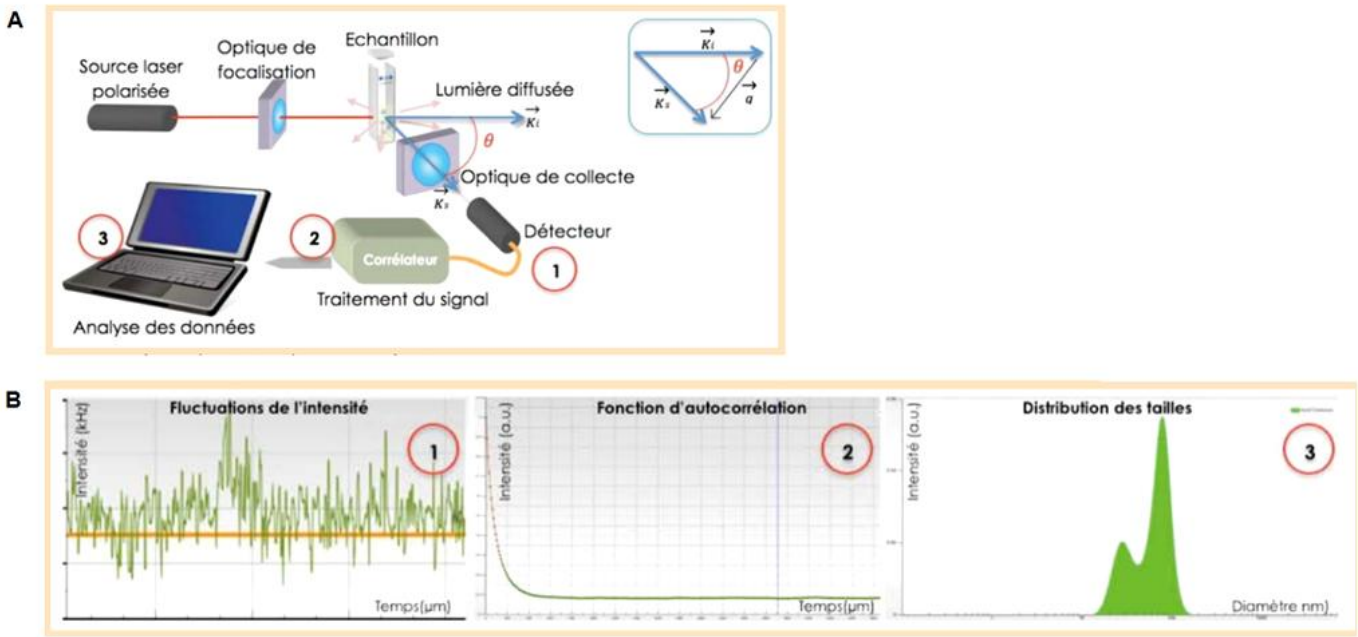


Figure 22 : Schéma général du principe de DLS (A) et étapes de l'analyse des mesures (B). Issu de Mainard et Jacob (2016).

Le principe de la DLS est schématisé sur la Figure 22. Premièrement une source laser polarisée éclaire à une longueur d'onde λ l'échantillon et un détecteur de photons collecte la lumière diffusée à un angle θ par les particules animées d'un mouvement Brownien (1). Une fonction d'autocorrélation permet ensuite de comparer le signal à lui-même après un intervalle de temps très court : plus la fonction décroit rapidement, plus la vitesse de la particule est rapide et sa taille faible (2). Des algorithmes permettent enfin d'extraire la distribution des tailles (3).

Cette méthode a été employée par Langlet *et al. (*2008) pour comparer la stabilité colloïdale de quatre bactériophages à ARN (SP, GA, Q*β*, MS2) en fonction du pH et de la force ionique ($NaNO_3$). Aucune tendance commune à ces phages de taille (21 à 30 nm) et de point isoélectrique (environ 4) pourtant comparables n'a été observée : le MS2 s'agrège à pH bas à toute force ionique, le phage Q*β* à pH bas également mais seulement si la force ionique est élevée, et les phages SP et GA quel que soit le pH (1,5 - 7,5) et la force ionique (1-100 mM) considérés. Ainsi comme affirmé précédemment par Floyd et Sharp, les auteurs concluent qu'au moins trois paramètres influencent l'agrégation virale : le pH, la force ionique et le type de virus. Ils suggèrent en particulier une influence de la densité de charge et de l'hydrophobicité des particules.

La densité de charge à la surface des particules est notamment influencée par la taille du génome, chargé négativement. L'hypothèse d'une influence du génome sur l'agrégation a été testée en comparant le comportement du phage MS2 et de VLP correspondantes ayant le même point isoélectrique (Dika *et al.*, 2011). Alors que les phages forment des agrégats à pH inférieur au pHi quelle que soit la force ionique, les VLP ne s'agrègent qu'au voisinage du pHi, à faible force ionique. Ces données confirment le rôle de l'ARN sur le comportement des particules.

L'ensemble de ces travaux suggère que dans les eaux douces environnementales peu turbides à pH neutre et faible salinité, les virus ont tendance à être individualisés et peuvent donc être transportés sur de longues distances. En conditions plus salines, comme en milieu marin, les virus tendent à s'agréger ce qui favorise leur sédimentation (Wong *et al.*, 2012).

3.3.5. Adsorption aux particules

3.3.5.1. Types de particules des milieux hydriques

Les milieux aquatiques contiennent une grande diversité d'éléments qui peuvent être sous particulaire ou colloïdale. Les particules réfèrent généralement à des matières solides en suspension d'une taille supérieure à 0,45 µm. Les sédiments sont des particules de densités élevées qui se déposent au cours du temps sous l'effet de la pesanteur. Leur diamètre varie de quelques dizaines de micromètres à plusieurs millimètres. Un colloïde est une particule que le petit diamètre, de l'ordre du nanomètre au micromètre, rend mobile et non sédimentable. Les colloïdes ont un pouvoir

d'adsorption très élevé du fait d'une grande surface spécifique et d'une forte capacité d'échange d'ions et peuvent donc fortement influencer le transport des contaminants et pathogènes dans l'environnement (McCarthy and Zachara, 1989).

Les particules et colloïdes des milieux hydriques environnementaux sont de nature abiotique ou biotique. Les particules abiotiques sont en majorité issues de l'érosion des roches. On trouve dans la classe des colloïdes des oxydes métalliques, des argiles, des limons et des grains de quartz. Les argiles en particulier sont ubiquitaires et fréquemment associées à des micro-organismes. Le quartz est le minéral principal des sédiments inorganiques (Rao and Melnick, 2019). Certaines particules abiotiques comme les microplastiques sont d'origine anthropique. Les particules biotiques incluent les matières organiques associées à des particules, des débris de plantes, animaux et micro-organismes, ou encore des particules issues de rejets d'effluents domestiques et industriels (Tadros and Gregory, 1993).

3.3.5.2. Forces impliquées

Les associations entre les virus et les autres particules sont premièrement régies par des interactions électrostatiques qui dépendent du point isoélectrique des virus et des autres particules. Les virus tendent à s'associer avec des particules chargées plus positivement, dont le pHi est supérieur au leur. Selon cette considération, les virus s'adsorbent par ordre d'affinité décroissante avec les métaux, les composés soufrés, certains oxydes métalliques, la silice (quartz) et la matière organique (Gerba, 1984; Moore *et al.*, 1981). De plus, les virus peuvent s'adsorber sur les sites négatifs échangeurs de cations des argiles, malgré un apparent paradoxe. En effet, le pH à proximité des argiles peut être localement très inférieur au pH global du milieu, ce qui conduit à la protonation locale des virus venant se loger sur les sites échangeurs de cations des argiles (Lipson and Stotzky, 1984). Les virus et les particules négativement chargées peuvent également se complexer par l'intermédiaire de cations divalents (Ca^{2+}, Mg^{2+}) formant des ponts cationiques entre des groupements carboxylates (Gutierrez and Nguyen, 2013; Pham *et al.*, 2009).

D'autre part, des liaisons hydrophobes s'établissent via certains résidus de la surface des particules virales. Bien que les virus soient considérés comme globalement hydrophiles, ils portent localement des groupements apolaires en plus ou moins grand nombre (Armanious *et al.*, 2016). Des liaisons hydrophobes sont possibles avec des particules inorganiques comme des oxydes métalliques et des argiles, ou des matières organiques comme des protéines, certains acides humiques et fulviques, ainsi que des hydrocarbures et surfactants (Larry B. Barber *et al.*, 2001; Imai *et al.*, 2002a).

Enfin, d'autres forces agissant à courte distance sont susceptibles de moduler les interactions, comme les forces de van der Waals attractives (Moore *et al.*, 1981) ou des effets de répulsion

stérique lorsque des irrégularités de surface limitent le rapprochement des particules (Armanious *et al.*, 2016).

3.3.5.3. Facteurs modulant les interactions

L'adsorption varie considérablement d'un virus à l'autre mais aussi en fonction de la température et de l'état statique ou dynamique. L'adénovirus humain 35 s'associe davantage aux argiles (bentonite et kaolinite) à 4 °C qu'à 25 °C, et également plus en condition statique que dynamique. L'agitation du milieu inhiberait donc son adsorption aux argiles ou augmenterait sa désorption. En revanche dans le cas des bactériophages MS2 et φX174 l'adsorption est globalement supérieure à 25 °C qu'à 4 °C et aussi bien en condition dynamique que statique malgré des différences liées au type d'argile. Cet effet de la température peut s'expliquer par une meilleure stabilité des interactions hydrophobes à température plus élevée (Bellou *et al.*, 2015).

Dans les eaux de surface, la matière organique dissoute (MOD) est une classe de composés particulièrement abondante dont la concentration est de l'ordre de quelques milligrammes de carbone par litre. Selon une définition opérationnelle généralement admise, la MOD comprend les composés organiques de taille inférieure à 0,45 µm. La MOD est amphiphile et amphotère mais peut être qualifiée respectivement d'hydrophile ou d'hydrophobe et d'acide ou basique selon les propriétés prédominantes (Leenheer and Croué, 2003; Perdue and Ritchie, 2003). La MOD est généralement chargée négativement aux pH des milieux aquatiques du fait de la déprotonation des groupements carboxyles et phénols, si bien que les virus interagissent théoriquement peu avec (Moore *et al.*, 1981). Des interactions sont néanmoins possibles avec les virus les moins électronégatifs (Zhuang et Jin, 2003 ; Armanious *et al.*, 2016a). De plus, la répartition des charges de la MOD peut être inégale et favoriser des interactions locales avec le virus. La MOD peut par ailleurs modifier les interactions entre les virus et les autres particules, et notamment entrer en compétition pour certains sites d'interaction (Cao *et al.*, 2010). Armanious *et al.*(2016b) ont montré que la MOD affecte de différentes façons l'adsorption des virus sur une surface chargée positivement : elle peut entrer en compétition avec les virus pour les sites d'adsorption et ainsi diminuer leur adsorption ou même induire leur désorption, ou bien ne pas affecter l'adsorption si la MOD et les virus s'adsorbent également entre eux. Dans d'autres situations, la MOD peut favoriser l'adhésion des virus aux autres particules via des interactions hydrophobes (Bales *et al.*, 1993) (Figure 23). Pour résumer, l'adsorption dépend des caractéristiques physico-chimiques du virus et de la surface considérés (taille, pHi, charge nette, hydrophobicité…) ainsi que de celles du milieu (pH, température, concentration et type d'ions, matière organique dissoute…).

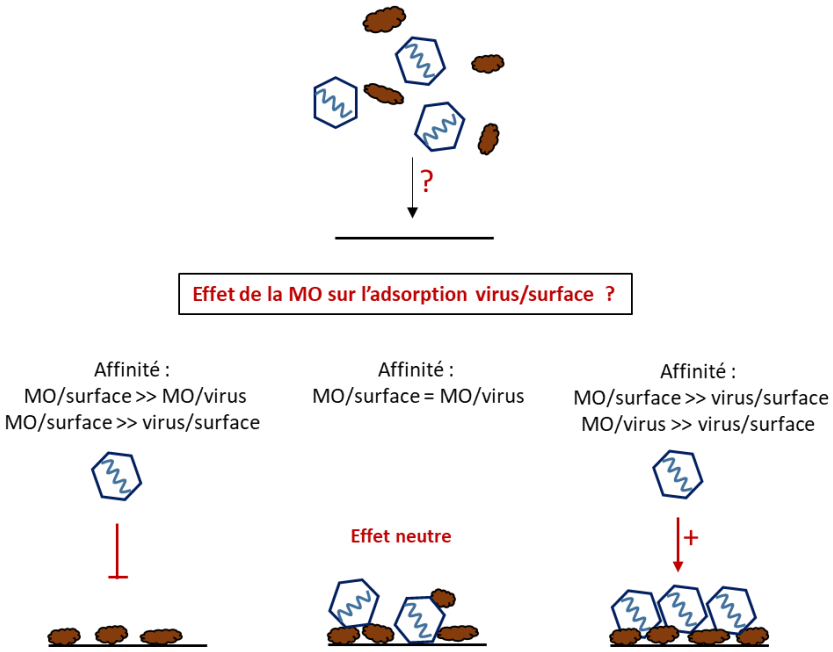


Figure 23 : Effets de la matière organique dissoute sur l'adsorption des virus à une surface.

3.3.5.4. Part des virus associés aux particules dans les environnements hydriques

Quelques études ont déterminé la part des virus associés à des particules sédimentables dans les milieux hydriques. En revanche, aucune information ne semble disponible sur les interactions physiques avec des composés dissous, plus difficiles à mettre en évidence. Des taux d'absorption aux particules de 37 % à 100 % ont été mesurés après contamination artificielle en laboratoire de sédiments de diverses origines et compositions par des entérovirus (Bitton *et al.*, 1982; Gerba *et al.*, 1977; Johnson *et al.*, 1984; LaBelle and Gerba, 1980). Cette importante capacité d'adsorption et d'accumulation a été confirmée par des analyses environnementales (Elmahdy *et al.*, 2016; Farkas *et al.*, 2018a; Fauvel *et al.*, 2017b). Par exemple, dans une étude de Payment *et al.*(1988), la majorité des virus entériques (77 %) contaminant des rivières étaient associés à des particules en suspension. Par ailleurs, dans une rivière impactée par des rejets domestiques, des adénovirus humains infectieux ont été détectés dans 58 % (14/24) des échantillons d'eau à des concentrations de 4.10^3 à 10^4 PFU/L, et dans 25 % (6/24) des échantillons de sédiments à des concentrations de 10^3 à 8.10^4 PFU/kg (Elmahdy *et al.*, 2016). D'autre part, dans la colonne d'eau d'une rivière en milieu urbain 15,5 % à 54,9 % des FRNAPH infectieux étaient associés à des particules sédimentant à 3000 x*g* (10 min). De plus les concentrations moyennes de FRNAPH infectieux dans la colonne d'eau et le lit de la rivière, analysées sur une période d'un an, étaient respectivement de 2,8 log PFU/mL dans l'eau et 1,4 log PFU/g de sédiments (Fauvel *et al.*, 2017b).

3.3.6. Interactions avec d'autres micro-organismes

Dans l'environnement, les virus peuvent interagir avec d'autres types de micro-organismes comme des bactéries ou des amibes, sous forme planctonique ou au sein de biofilms. La première relation est le parasitisme exercé par différents types de virus sur tous ces micro-organismes. Ainsi, de nombreuses relations ont par exemple été démontrées entre des protozoaires et des virus géants (Scheid, 2015). S'agissant des virus entériques, il existe aussi plusieurs preuves d'interactions avec des amibes libres et des biofilms.

En 1981, Dane et Cerva (1981) ont observé l'adsorption de particules virales à la surface d'amibes après avoir infecté une culture *Acanthamoeba Castellanii* avec quatre sérotypes de PV et d'échovirus. Toujours *in vitro*, Mattana *et al.*(2006) ont montré que le coxsackievirus B3 s'adsorbe à la surface de trophozoïtes d'*Acanthamoeba Castellanii* avant d'y être internalisé. Les virus peuvent y demeurer infectieux pendant un cycle complet d'enkystement et dékystement de six mois. Une étude plus récente de co-culture a aussi constaté la persistance du coxsackievirus B5 dans l'amibe *Vermamoeba vermiformis* souvent isolée de l'eau de distribution, que celle-ci soit sous forme de trophozoïte comme de kyste (Atanasova *et al.*, 2018). L'internalisation des adénovirus 40 et 41 dans différentes espèces d'*Acanthamoeba* a enfin été constatée *in vitro* (Scheid and Schwarzenberger, 2012). Les associations entre amibes et adénovirus ont été mises en évidence dans de l'eau de distribution. Parmi 236 souches d'*Acanthamoeba* isolées d'eau du robinet, 34 (14 %) étaient positives pour la présence d'adénovirus humain détecté par PCR. De plus, une certaine spécificité d'association de génotype amibien et de sérotype viral a été établie (Lorenzo-Morales *et al.*, 2007).

Un biofilm est une communauté de micro-organismes associée à une surface et incluse dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (Donlan, 2002). Les biofilms forment des surfaces hydratées globalement anioniques avec des domaines hydrophobes. Quelques travaux ont étudié les interactions entre des virus et des biofilms en conditions artificielles. Dans un réacteur à biofilm artificiellement contaminé avec un virus de plante, le virus de la chlorose du piment ou *capiscum chlorosis virus* (CaCV) à une charge d'environ 9.10^6 unités génome/mL, les virus ont été rapidement intégrés au biofilm puis lentement relargués dans l'eau circulante. Au sein du biofilm des concentrations supérieures à 10^5 unités génome/cm^2 ont été quantifiées sur une période de trois semaines (Lehtola *et al.*, 2007). Cependant, la détection de génome viral peut correspondre à du génome libre ou correspondant à des particules non infectieuses. De fait, Helmi *et al.*(2008) ont constaté une diminution plus rapide de PV1 infectieux que du génome correspondant dans des biofilms produits en réacteur. À l'échelle d'une usine pilote, Quignon *et al.*(1997) ont quantifié deux fois plus de PV1 associé un biofilm d'un mois sur du PVC que dans le flux d'eau. En revanche, selon Helmi *et al.*(2010) moins de 1 % des particules d'adénovirus 5 ou phages MS2 et φX174 adhèrent à

un biofilm de deux mois sur du PVC dans des conditions hydrodynamiques semblables à celles des usines de potabilisation. Comme pour les autres types de surfaces, l'adsorption aux biofilms dépend des caractéristiques des virus. Pelleieux *et al.*(2016) ont par exemple montré qu'un biofilm de deux mois produit sur une surface de polyéthylène haute densité (un matériau fréquent au sein des réseaux de distribution) peut soit augmenter, soit diminuer l'adhésion des bactériophages MS2, GA, et Qβ en fonction de leurs propriétés de surface.

3.4. Impact des interactions sur le transport, la persistance et l'élimination des virus

3.4.1. Transport

Le transport des virus dans les eaux superficielles détermine leur répartition spatiale et leur capacité à se disséminer à distance du point initial de contamination. Les virus libres ou associés à des particules colloïdales sont les plus mobiles, en particulier lorsque le flux est élevé. Fauvel *et al.*(2017a) ont analysé la dynamique des FRNAPH sur un tronçon de rivière et ont ainsi estimé que les virus ont parcouru une distance de 2,8 km à 9,5 km avant que leur infectivité ne décroisse d'un log. De plus, l'inactivation des FRNAPH infectieux le long de leur transit dans la rivière a été le mécanisme principal de l'élimination des virus, la sédimentation étant par comparaison un phénomène négligeable sur la période étudiée. À plus long terme, les mêmes auteurs ont observé une accumulation des bactériophages dans les sédiments.

L'adhésion aux particules sédimentables rend les virus moins mobiles car elle favorise leur dépôt. La sédimentation impacte surtout le devenir des virus dans les milieux peu agités comme les lacs. Une analyse de la répartition des rotavirus en milieu estuarien a montré que les virus infectieux étaient plus fréquemment détectés dans la phase particulaire (> 0,45 µm) que dans la phase dissoute et qu'ils pouvaient être transportés sur plus de 1,8 km. Les virus étaient aussi fréquemment détectés dans la couche superficielle de sédiments peu dense et facilement remobilisable. La sédimentation ne constitue ainsi pas nécessairement une immobilisation durable car les virus associés aux sédiments les moins denses peuvent être facilement remis en suspension. De plus, l'adsorption aux sédiments est un mécanisme réversible et les virus peuvent dans certaines conditions se désorber et réintégrer la colonne d'eau (Hassard *et al.*, 2016).

Dans le sol, en milieu poreux saturé, les colloïdes jouent un rôle déterminant sur le transport des virus. Ils peuvent être considérés comme une troisième phase en plus des phases solide et aqueuse (McCarthy and Zachara, 1989). L'association à divers colloïdes facilite le transport des virus en milieu saturé, mais certains colloïdes très peu mobiles peuvent au contraire limiter le transfert des virus (Jin *et al.*, 2000; Walshe *et al.*, 2010). En présence de colloïdes minéraux, le transfert des virus dans le sol est favorisé par un flux élevé, la présence de MOD, un pH élevé et une faible salinité

(Pieper *et al.*, 1997; Walshe *et al.*, 2010). Le transport des virus dans le sol, et donc leur transfert dans les ressources hydriques souterraines peut ainsi être facilité par l'association à des colloïdes eux-mêmes fortement mobiles.

3.4.2. Persistance dans l'environnement

Dans l'environnement, l'association aux sédiments peut allonger la durée d'infectivité des virus. Smith *et al.*(1978) ont mesuré la persistance de quatre entérovirus dans des sédiments ou de l'eau prélevés en zone estuarienne sur différents sites. Dans chaque cas, les virus infectieux ont persisté plus longtemps en présence de sédiments que dans l'eau seule. Par ailleurs, la persistance la plus longue a été observée avec des sédiments issus d'une zone fortement polluée par des indicateurs fécaux bactériens, indiquant un effet protecteur de l'adsorption aux bactéries ou à de la matière MOD. Les bactéries et la MOD favorisent en effet la persistance de virus infectieux (Bitton and Mitchell, 1974; Mitchell and Jannasch, 1969). LaBelle et Gerba (1980) ont de même rapporté une persistance accrue des entérovirus dans les sédiments, avec un abattement de 1 log d'infectivité du PV1 en 1,4 jours dans l'eau de mer contre 6 jours dans les sédiments prélevés sur le même site. Cet effet a été attribué à une augmentation de la thermorésistance virale car les sédiments marins confèrent aussi une protection aux entérovirus lors d'une inactivation à 55 °C (Liew and Gerba, 1980). L'immobilisation et la persistance des virus dans les sédiments expliquent qu'ils puissent s'y accumuler (Skraber *et al.*, 2009).

Par ailleurs, la très grande majorité des études visant à évaluer la persistance virale ne distinguent pas la contribution des phénomènes d'adhésion ou d'agrégation, ce qui peut conduire à une surestimation de l'inactivation virale. Réciproquement, lorsque les virus s'adsorbent aux surfaces, la diminution résultante dans la phase liquide peut être improprement attribuée à une inactivation. D'autre part, lorsque les virus sont quantifiés par culture, les agrégats constitués de plusieurs virus infectieux sont comptabilisés comme des unités infectieuses au même titre que les virus individualisés. En effet, Gassilloud et Gantzer qui ont analysé la persistance du PV1 dans de l'eau souterraine placée dans un contenant en propylène hydrophobe pendant 20 jours, ont démontré que sur 2,8 log d'abattement d'infectivité apparent, 1,5 log et 0,66 à 0,92 log de diminution étaient en réalité les conséquences respectives de l'adhésion et de l'agrégation. Ainsi, l'inactivation virale seule n'était responsable que de 0,34 à 0,68 log de diminution d'infectivité. Enfin, en plus de diminuer le nombre apparent d'unités infectieuses ce qui peut conduire à sous-estimer le nombre réel de particules virales, les agrégats rendent les virus résistants à la température et finalement à leur dégradation naturelle dans l'environnement (Tuladhar *et al.*, 2012b).

3.4.3. Élimination

Une eau turbide impacte négativement l'efficacité des traitements de désinfection en exerçant une demande en agent oxydant ou en occultant les pathogènes des rayons UV, deux cas conduisant à une diminution de la dose d'exposition à laquelle ceux-ci sont effectivement soumis (Haas *et al.*, 1996). Par comparaison avec des pathogènes de plus grande tailles, les virus entériques sont du fait de leur petite taille, mieux protégés à faible turbidité ou des petites particules, car celles-ci occultent plus complètement les petits virus que les autres micro-organismes pathogènes plus volumineux (Templeton *et al.*, 2008).

Les premières étapes de traitement incluent généralement une coagulation, ce qui implique que les virus sont vraisemblablement agrégés et associés à des flocs (hydroxydes d'aluminium ou de fer principalement) lorsqu'ils atteignent les étapes de désinfection. L'association à certains types de particules est susceptible de protéger les virus de la chloration, et ce indépendamment de la demande additionnelle en chlore résultante. Cette protection a été observée dans le cas d'association avec des argiles ou des agrégats de matière organique (Hejkal *et al.*, 1979; Stagg *et al.*, 1977), ainsi qu'avec des flocs d'hydroxydes d'aluminium tels qu'il peut réellement s'en trouver dans les usines (Ohgaki and Mongkonsiri, 1990). Plusieurs études n'ont pourtant pas rapporté de modification de l'inactivation virale par ozonation ou chloration en présence de particules organiques ou inorganiques (Barbeau *et al.*, 2004; Boardman and Sproul, 1977). Ainsi, les conséquences en matière de désinfection chimique semblent être intrinsèquement liées aux caractéristiques de chaque virus et type de particule. La nature des particules définit également leur capacité à conférer une protection vis-à-vis des UV. En effet, Templeton *et al.*(2005) ont observé une protection des bactériophages en présence de matières organiques mais pas avec des particules inorganiques, les doses ayant été ajustées et normalisées pour tenir compte dans chaque cas de la diminution de la transmittance des UV. De même, Passentino *et al.*(2004) ont montré qu'à turbidité égale des particules de nature organique ou minérale affectent différemment la cinétique d'inactivation du MS2 par les UV.

Les conséquences de l'agrégation virale sur l'efficacité des traitements de désinfection ont été extensivement étudiées. En présence d'agrégats, de nombreux auteurs ont observé des profils d'inactivations virales non linéaires caractérisés par une décroissance de la pente d'inactivation au cours du temps (Figure 24). La présence d'agrégats augmente les doses de traitements oxydants nécessaires pour atteindre des abattements cibles, quel que soit le virus considéré (entérovirus, rotavirus, adénovirus, VHA, FCV, MS2) (Pancorbo *et al.*, 1987; Sobsey *et al.*, 1991; J. A. Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). De plus, l'effet protecteur est d'autant plus manifeste que l'agent oxydant est

réactif. En effet, les oxydants les moins réactifs (monochloramines, anion hypochlorite) seraient les plus efficaces car ils diffuseraient à l'intérieur des agrégats à la différence des oxydants les plus réactifs (ozone, acide hypochloreux) qui réagiraient entièrement en surface (Mattle et al., 2011). Parfois, le traitement génère par lui-même des agrégats en modifiant les propriétés de surface des virus comme cela a pu être observé sur le phage MS2 avec le dioxyde de chlore mais non le chlore libre (Barbeau *et al.*, 2005, 2004).

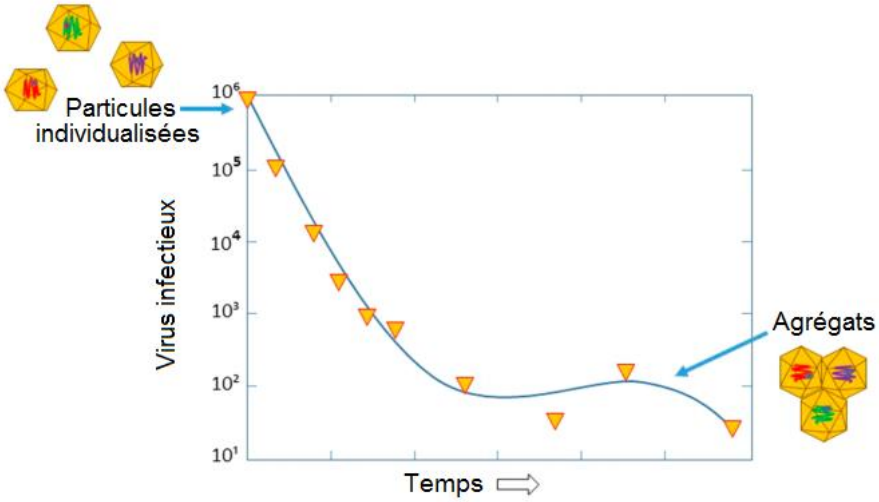


Figure 24 : Inactivation d'une suspension de PV1 contenant des agrégats par un désinfectant chimique. D'après les observations de Young et Sharp (1977) schématisées par Gerba et Betancourt (2017)**.**

L'agrégation ou l'association à d'autres particules peut au contraire favoriser l'élimination des virus lors de la décantation, coagulation-floculation ou au cours des différentes étapes de filtration (van Voorthuizen *et al.*, 2001). L'évaluation des performances des membranes de microfiltration et d'ultrafiltration doit donc être réalisée sur des suspensions virales monodispersées afin de ne pas surestimer leurs capacités de rétention (Herath *et al.*, 1999). Les travaux de Langlet *et al.*(2008) ont montré que l'agrégation n'est pas systématiquement prédictible sur la base des propriétés physico-chimiques des virus et du milieu.

Enfin, les interactions engageant d'autres micro-organismes pourraient affecter l'élimination des virus selon plusieurs mécanismes comme l'accumulation des virus dans les biofilm, l'internalisation dans des amibes ou encore l'association à certaines bactéries ou composants bactériens. L'incorporation des virus dans du biofilm observée à l'échelle d'une usine pilote (Quignon *et al.*, 1997) implique qu'ils pourraient constituer un réservoir de virus. Les biofilms forment en effet des matrices protectrices au sein desquelles peuvent s'incorporer et persister une grande variétés de

micro-organismes pathogènes (Wingender and Flemming, 2011). Le principal risque à l'échelle des usines de potabilisation est le décrochement soudain de biofilm qui peut s'accompagner d'une libération de pathogènes dans le réseau (Dawley and Gibson, 2019). Les amibes libres sont un autre vecteur potentiel de micro-organismes pathogènes incluant les virus entériques. Elles sont en effet ubiquitaires dans toutes les ressources hydriques environnementales, et sont particulièrement résistantes aux traitements de désinfection, notamment sous la forme de kystes, si bien qu'elles sont très fréquemment retrouvées dans l'eau produite (Loret and Greub, 2010). Différents auteurs leur ont donc attribué un potentiel rôle de « cheval de Troie » pour la transmission des virus entériques infectieux à travers les filières de traitement (Atanasova *et al.*, 2018; Loret and Greub, 2010; Scheid and Schwarzenberger, 2012). Enfin, Amarasiri *et al.* (2016), ont constaté que les interactions physiques entre les bactéries possédant des motifs pseudo-HBGA et des VLP de norovirus favorisent leur rétention par des membranes de 0,45 µm. De plus, en présence de ces bactéries, la rétention des VLP était génotype-dépendante, le GII.4 étant davantage retenu que le GII.3 et GII.6 du fait de sa capacité à reconnaître un spectre d'épitopes plus large. Ces interactions ont surtout des implications dans le traitement des eaux usées, chargées en matières organiques et bactéries (Miura *et al.*, 2015).

3.5. Conclusion

Le devenir des virus entériques dans l'hôte et dans les environnements hydriques est directement sous la dépendance des interactions qu'ils établissent avec les éléments qui les entourent. Dans l'hôte, la pathogénèse et l'infectivité de certains d'entre eux est directement sous la dépendance de leur capacité à établir des interactions physiques spécifiques avec des polysaccharides bactériens. Ces interactions sont par ailleurs fréquemment associées à une augmentation de la thermorésistance virale. Dans les milieux aquatiques, les virus interagissent entre eux ou avec d'autres colloïdes et particules, ce qui impacte notamment leur dynamique spatiale et temporelle. Enfin, plusieurs études suggèrent que de telles interactions pourraient faciliter le passage des virus à travers les filières de traitements, bien que cela n'ait pas été confirmé en conditions réelles (Figure 25).

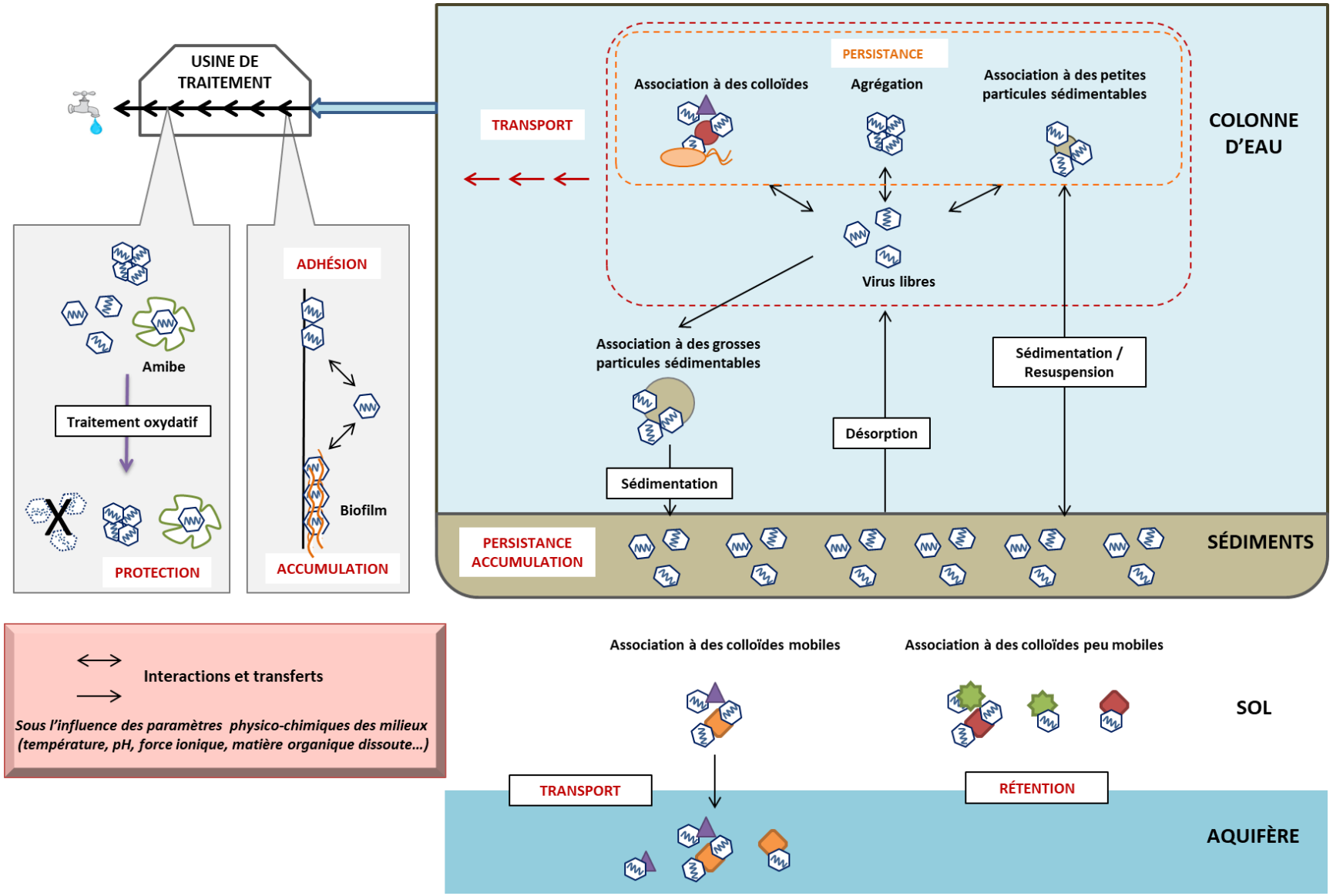


Figure 25 : Exemple d'interactions pouvant affecter le transport, la persistance et l'inactivation des virus entériques dans les milieux hydriques.

Objectifs de la thèse

Si la contamination manuportée des virus entériques est la principale voie de transmission interhumaine des virus entériques, des épidémies de gastro-entérites virales liées à la consommation d'eau contaminée sont toutefois régulièrement rapportées. Dans ce cas, leur transmission implique que les virus aient conservé leur potentiel infectieux au cours de leur transit à travers les matrices hydriques. Entre deux cycles infectieux, les virus entériques transmis par voie hydrique entrent au voisinage de nombreux micro-organismes dans les différents milieux qu'ils traversent tels que les eaux usées ou les eaux de surface. Il est par ailleurs connu que les propriétés de surface des virus entériques permettent leur association avec des matières sédimentables ou colloïdales des rivières. Les récentes découvertes relatives aux interactions virus-bactéries au sein de l'organisme et à leurs conséquences sur la stabilité virale justifient de s'interroger sur l'existence et les enjeux de telles interactions dans l'environnement. Par analogie, ces interactions seraient en effet susceptibles de moduler la persistance des virus, voire leur résistance vis-à-vis de conditions adverses, deux paramètres cruciaux conditionnant la survie des virus dans l'environnement et donc la probabilité d'atteindre un hôte, d'initier un nouveau cycle infectieux avant de se propager à nouveau.

Ces travaux de thèse portent sur l'étude des interactions entre les virus entériques et les composés organiques, et plus spécifiquement sur leurs conséquences en termes de stabilité, résistance aux traitements d'inactivation, et enfin dynamique d'évolution. L'objectif général de ce travail est d'apporter des éléments permettant de mieux comprendre le rôle de la matière organique sur la persistance virale. Considérant la diversité des virus entériques, le choix a été fait de concentrer ce travail de recherche sur un genre facilement cultivable dont les caractéristiques structurales et génétiques ont été extensivement analysées, le genre *Enterovirus*.

Le premier objectif de la thèse a été de décrire comment certains composés organiques microbiens interagissent avec les entérovirus et affectent leur stabilité thermique ou l'efficacité de la chloration et des rayonnements UV, deux traitements de désinfection couramment appliqués dans les usines de production d'eau potable. Il est connu que la matière organique diminue l'efficacité des traitements oxydatifs ou l'irradiation aux UV en diminuant l'exposition réelle des virus par consommation de l'agent désinfectant ou absorption des rayonnements. Les doses de traitement ont donc été ajustées afin de s'affranchir de ces effets triviaux. Plusieurs sérotypes viraux et composés microbiens ont été considérés ce qui a permis de rechercher une potentielle spécificité d'interaction.

Dans un second temps, l'existence d'interactions analogues dans l'environnement a été envisagée afin de déterminer dans quelle mesure la matière organique particulaire ou dissoute naturellement présente dans les rivières urbaines peut influencer la stabilité des virus. Les résultats obtenus ont notamment fourni des éléments sur la nature des interactions impliquant les virus et la matière organique dissoute. Cette partie a permis de se rapprocher expérimentalement des conditions auxquelles les virus sont naturellement confrontés dans les environnements hydriques.

La troisième partie s'est intéressée à l'influence des interactions virus-matière organique sur la dynamique de l'évolution des populations virales soumises à une pression de sélection. L'évolution des quasi-espèces à la suite d'un stress thermique a été analysée afin d'évaluer si la sélection des virus au cours de plusieurs générations s'effectue principalement sur leur thermostabilité intrinsèque ou bien également sur leur capacité à s'associer à de la matière organique stabilisatrice. Les phénotypes de sensibilité thermique des différentes populations virales ayant évolué en présence ou en absence de matière organique ont été comparés et leurs génotypes ont été analysés par séquençage haut débit.

Matériel et méthodes

1. Cellules, virus et quantification du titre viral

1.1. Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires ont été utilisées : des cellules de rein de singe vert Buffalo BGMK (Buffalo Green Monkey Kidney) et des cellules humaines embryonnaires de rein 293A. Les cellules BGMK ont été utilisées pour les productions virales initiales et la détermination des titres infectieux avant et après les traitements d'inactivation. Les cellules 293A ont été utilisées pour les productions virales successives au cours de l'expérience d'évolution (troisième partie).

Les cellules ont été maintenues à 37°C en atmosphère régulée à 5 % de CO_2 dans un milieu composé de Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose medium (Dutscher, no. L0103) supplémenté avec 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) (PanBiotech, no. 3301-P113103), 1 % d'acides aminés non essentiels (Dutscher, no. X0557), et 1 % d'une solution de pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/ mL) (PanBiotech, no. P06-07100).

Ce milieu a été utilisé comme milieu de base pour toutes les étapes impliquant la culture cellulaire, mais la teneur en SVF a été diminuée à 2 % pour les titrations virales par dilution limite (milieu de titration). Pour limiter la quantité de protéines dans les productions virales destinées à être utilisées dans les expériences de chloration, les virus ont été produits dans un milieu sans SVF.

1.2. Production et purification des virus

Quatre entérovirus ont été utilisés dans ces travaux : coxsackievirus A21 (CV-A21), coxsackievirus B5 (CV-B5), échovirus 30 (E30) et poliovirus 1 souche Sabin (PV1). Ces virus sont des isolats environnementaux gracieusement fournis par le laboratoire LABEO (Caen). Ils ont été génotypés par séquençage de la région VP1. Les virus ont été cultivés sur des cellules BGMK à confluence dans du milieu de production décrit ci-dessus. Après manifestation de l'effet cytopathogène, soit environ six jours, les cellules ont été lysées par trois cycles de congélation-décongélation et le surnageant de culture a été clarifié par centrifugation durant 15 min à 2000 x *g*. Pour chaque virus, le surnageant a été ultracentrifugé 2h à 4°C et à 150 000 x *g* sur 1,5 mL de sucrose (40 %). Le culot a été repris dans 1 mL de sucrose puis dilués dans 19 mL de tampon phosphate salin pH 7.4 (PBS) et centrifugés sur des unités de filtration (Vivaspin 20 centrifugal concentrators 10,000 MWCO, Sartorius) selon les recommandations du fournisseur. Cette étape a été répétée deux fois puis le volume a été ajusté à 500 µL avec du PBS 1 X.

Pour étudier la stabilité des particules par Particle Stability Thermal Release Assay (PASTRY), le volume de 500 µL a été déposé sur 10 mL d'un gradient de chlorure de césium (1,2 g/L à 1,5 g/L) et a

subi une étape additionnelle d'ultracentrifugation pendant 18h à 4 °C à 100 000 x *g*. Des fractions de 500 µL ont été récupérées, et celle contenant les particules virales a été identifiée par RT-qPCR. Cette fraction a été dessalée sur des unités de filtration Vivaspin 20, comme décrit précédemment pour l'élimination du sucrose. Les virus ont été conservés à -80°C. Chaque production virale a été aliquotée (25 µL) et conservée à -80 °C jusqu'à utilisation.

1.3. Détermination du titre viral infectieux par dilution limite

Après purification, les suspensions de virus ont été titrées par dilutions décimales en plaques 96 puits sur cellules BGMK (environ 10^4 cellules/puits) dans 200 µL de milieu de dénombrement. Après 6 jours d'incubation correspondant au délai d'apparition des effets cytopathogènes et de lyse des tapis cellulaires, les cellules ont été fixées avec une solution d'acide chlorhydrique (0,1M), elles ont été colorées par une solution de cristal violet (4 g/L), et les puits ont été rincés à l'eau déionisée. Les puits positifs pour la présence de virus ont été dénombrés, et le titre viral a été estimé par la méthode de Spearman-Kärber (Hierholzer and Killington, 1996). Les résultats sont exprimés en $TCID_{50}$/ml (nombre de virus infectant 50% des cellules en culture par mL).

2. Pré-incubation avec des composés organiques

Pour étudier l'impact des interactions virus-matière organique sur l'efficacité de l'abattement viral, les traitements d'inactivation ont été précédés de 2 heures à 9 jours d'incubation à température ambiante avec des composés organiques commerciaux, des fractions d'eau de rivière séparées selon leur densité, ou des fractions de matières organiques dissoutes purifiées et séparées selon leurs propriétés hydrophobes. Pour cela, des suspensions virales ont été préparées dans du PBS 1X à une concentration finale d'environ 10^6 à 10^7 $TCID_{50}$/ml et ont été incubées avec des volumes d'échantillons représentant 10 à 20 % du volume final selon les expériences, ou un volume correspondant d'eau ultrapure (contrôle).

2.1. Composés organiques commerciaux

Les composés testés sont des petites molécules ou des polymères appartenant à différents groupes de molécules biologiques (saccharides et dérivés, acides aminés et dérivés, lipides et dérivés). Certains sont des constituants communs de la paroi des bactéries, et d'autres entrent dans la composition des biofilms (Mann and Wozniak, 2012) et sont susceptibles d'être retrouvées dans l'environnement ou les réseaux d'eau. Les composés testés sont listés dans le Tableau 18. Ils ont été dissous ou remis en suspension dans de l'eau ultra pure à une concentration de 10 mg/mL (solutions stocks), et ajoutés aux suspensions virales une concentration finale de 1 mg/L (rapport 1 : 9).

Tableau 18 : Composés organiques commerciaux

Molécule	Fournisseur	Référence	Origine
Alanine	Sigma	A7377	n.i.*
Arabinogalactane	Sigma	10830	Bois de mélèze
Arginine	Sigma	A5131	n.i.
Asparagine	Sigma	A0884	n.i.
Cellulose	Sigma	C6429	n.i
Chitine	Sigma	C9752	Exosquelette de crevette
Cysteine	Sigma	C7755	n.i.
Dextran	Sigma	31424	*Leuconostoc mesenteroides*
Acide glutamique	Sigma	G2128	n.i.
Glycine	Dominic Dutscher	P1013	n.i.
Glycogène	Sigma	G1767	*Mytilus edulis*
Heparane sulfate	Sigma	H7640	Rein de bovin
Acides humiques	Sigma	53680	Matière organique décomposée
Acide hyaluronique (sel de sodium)	Sigma	41897	*Streptococcus equi*
Levan	Sigma	L8657	*Erwinia herbicola*
Lipopolysaccharide	Sigma	L4268	*Klebsiella pneumoniae*
Lipopolysaccharide	Sigma	L9143	*Pseudomonas aeruginosa*
N-acétyl-D-glucosamine	Sigma	A8625	n.i.
N-acétyl-D-mannosamine	Sigma	A8176	n.i.
Acide N-acétylnuraminique	Sigma	A2388	*Escherichia sp.*
Peptidoglycane	Sigma	69554	*Bacillus subtilis*
Peptidoglycane	Sigma		*Saccharomyces cerevisiae*
Acide polygalacturonique	Sigma	P3889	Orange (fruit)
Polylysine	Sigma	P8920	n.i.
Rhamnolipide	Sigma	R90	*Pseudomonas aeruginosa*
Alginate de sodium	Sigma	W201502	Algue brune
β-glucane	Sigma	89862	*Euglena gracilis*

* n.i. : non indiqué par le fabricant

2.2. Fractions dissoutes et particulaires d'eau de surface

De la matière organique naturelle a été isolée d'échantillons d'eau de surface. Pour cela, des fractions dissoutes, particulaires et colloïdales ont été obtenues par centrifugation différentielle d'eau de la Seine collectée à limite Est de Paris en amont de la ville. Un volume de 500 mL a été échantillonné et immédiatement laissé à décanter à température ambiante pendant 30 min. Le surnageant a été séquentiellement centrifugé pendant 15 min à 4°C à 100 x *g*, 1000 x *g* et 6000 x *g.* Entre chacune des trois centrifugations, le culot a été récupéré et re-suspendu dans 50 mL de PBS. Le dernier surnageant contenant les particules non sédimentables dans les conditions de la dernière centrifugation a été filtré sur unité de filtration (Vivaspin 20 centrifugal concentrators 100,000 MWCO, Sartorius) et le retentât contenant les particules et molécules de tailles supérieures à 100 kDa a été conservé. La fraction particulaire fait référence à la fraction sédimentable par décantation ou centrifugation, et la fraction dissoute renvoie aux colloïdes et aux éléments non sédimentables dans les conditions expérimentales appliquées.

2.3. Matières organiques dissoutes (MOD) naturelles

Des matières organiques dissoutes naturelles issue d'eaux de rivières ont été purifiées par Pernet-Coudrier *et al. (*2011) et fractionnées sur des colonnes de résine non polaires sur la base de leur polarité (Figure 26). Deux échantillons d'eau de rivière ont été prélevés, le premier (1) issu de la Marne en amont de Paris, et le second (2) issu de la Seine en aval de Paris (Tableau 19).. On distingue les fractions hydrophobes (HPO) et transphiliques (TPI) retenues respectivement sur les résines DAX-8 et XAD-4 à pH acide et les MOD hydrophiles (HPI) non retenues sur ces deux résines dans les mêmes conditions expérimentales. Les six fractions ont été lyophilisées et conservées dans un dessiccateur à l'obscurité.

Les MOD ont été dissoutes dans de l'eau ultra-pure à une concentration finale de 5 mg/mL. La solubilisation a été effectuée sous agitation continue en ajustant très progressivement le pH avec une solution à 0,1 M de NaOH jusqu'à stabilisation à pH 7,5. Une fraction HPO a été refractionnée selon le poids moléculaire. Pour cela, 10 mL d'une solution à 5 mg/mL ont été séquentiellement filtrés sur des unités de filtration avec un seuil de coupure à 30 kDa, puis 10 kDa (Vivaspin 20 centrifugal concentrators, Sartorius). Le dernier perméat contenant les molécules inférieures à 10 kDa a été conservé, ainsi que les deux concentrats (molécules supérieures à 30 kDa et molécules comprises entre 10 kDa et 30 kDa). Les volumes des trois fractions ont été réajustés à 10 mL avec de l'eau ultra-pure.

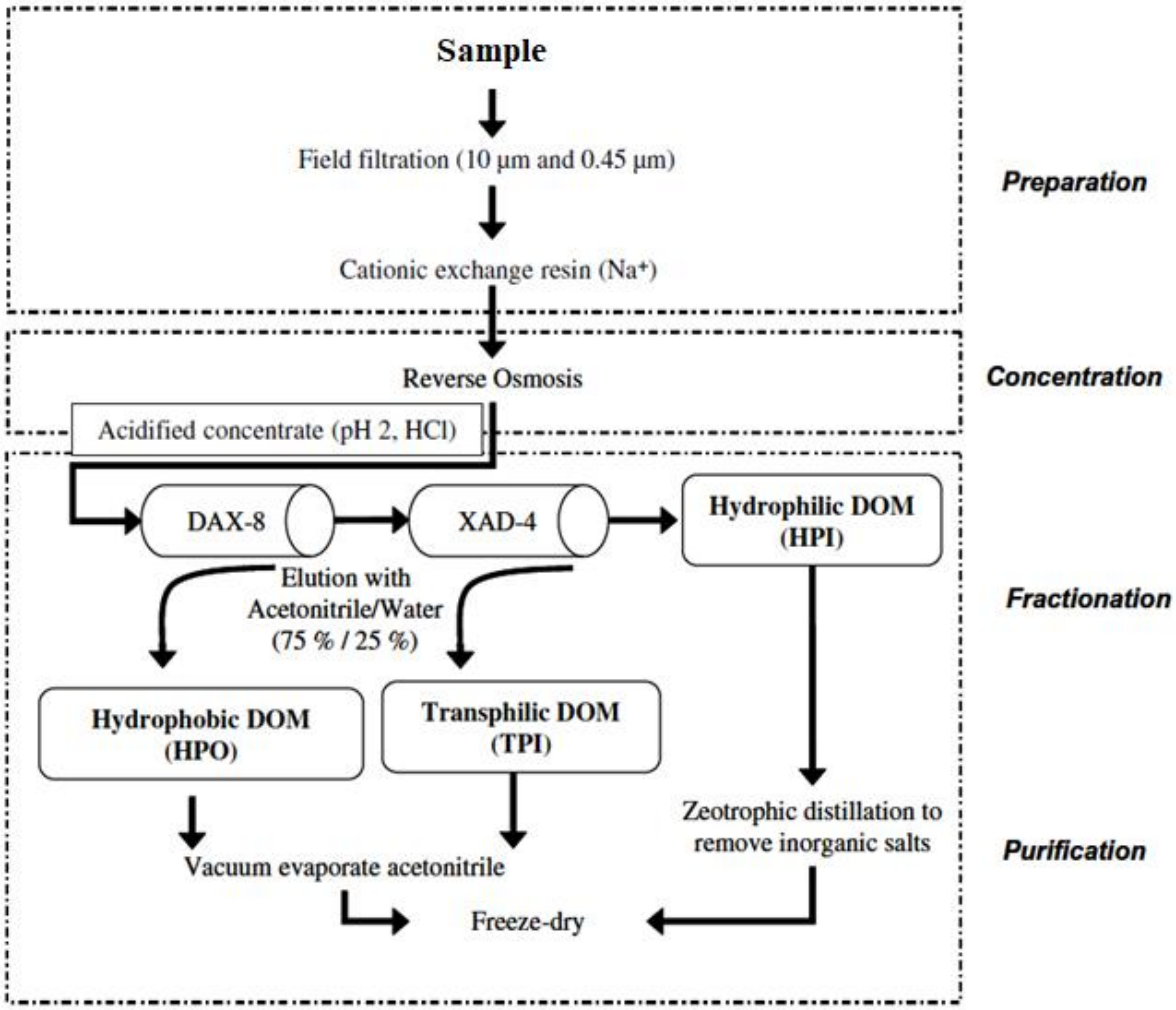


Figure 26 : Protocole de purification et de fractionnement de la matière organique dissoute présente dans les échantillons d'eau de rivière. Issue de Pernet-Coudrier *et al.* (2011).

Tableau 19 : Origine et composition des échantillons d'eau de rivière (Pernet-Coudrier *et al.*(2011)).

			Distribution du COD*		
Echantillon	**Origine**	**COD ($mgC.L^{-1}$)**	**Fraction HPO (%)**	**Fraction TPI (%)**	**Fraction HPI (%)**
1	Méry-sur-Marne	2,0	69	21	10
2	Méricourt	4,0	51	18	31

* COD : carbone organique dissous

3. Traitements d'inactivation

Les virus pré-incubés avec les différents échantillons organiques décrits ci-dessus ont été soumis à différents traitements d'inactivation : traitement thermique, exposition aux rayons ultra-violets (UV) et chloration. Après traitement, les échantillons ont été filtrés sur membrane de 0.22 µm (Millipore, #SLGV01352) avant quantification du titre infectieux (section 1.3) pour limiter les effets potentiateur/inhibiteur de l'infection ou cytotoxiques induits par les échantillons organiques.

Les inactivations thermiques ont également été effectuées à différentes températures en l'absence d'échantillons organiques afin de caractériser la sensibilité intrinsèque des quatre sérotypes d'entérovirus décrits dans la section 1.2.

3.1. Inactivation thermique

Les inactivations ont été effectuées dans un thermocycleur (LightCycler 96, Roche) en microplaques de 96 puits ou en microtubes (50 µl par puits). Des incubations de 1 h à 50 °C ont été effectuées pour évaluer l'effet protecteur des différents échantillons organiques, et des incubations de 1 h à 48°C ont été effectuées dans le cadre de l'expérience d'évolution (section 6). Les échantillons ont été placés sur glace immédiatement après traitement.

Afin de caractériser la sensibilité intrinsèque des quatre sérotypes d'entérovirus, des incubations de 1 h à des températures comprises entre 44 °C et 52 °C ont été effectuées. Un modèle de dose–réponse sigmoïde a été sélectionné pour représenter les données d'abattement avec le logiciel GraphPad Prism version 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA), selon l'équation suivante :

$$log\left(\frac{Nx}{No}\right) = Max + \frac{Max - Min}{(1 + 10^{X50-X})}$$

Avec X, la température (°C) et N_0 et Nx les titres viraux ($TCID_{50}$/ml) initial et après 1 h d'incubation à la température X°C. Min est la valeur de Log (Nx/N0) au plateau minimum ; Max est la valeur de Log (Nx/N0) au plateau maximum et X50 est la température pour laquelle la réponse est la moyenne de Max et Min.

3.2. Traitement aux ultra-violets (UV)

Deux cents microlitres de suspensions ont été exposés à des doses de 40 mJ/cm^2 UV (dose communément appliquée dans les usines de potabilisation) ou 80 mJ/cm^2 sous une lampe de longueur d'onde 253,7 nm (Phillips, Amsterdam, Netherlands) à température ambiante. Un photomètre UV (IL Metronic Sensortechnik GmbH, Germany) a été utilisé pour les mesures de fluence. Le temps d'exposition a été déterminé avec la relation :

$temps\ (s) = \frac{dose(mJ/cm^2)}{fluence(mW/cm^2)}$, et l'équivalence $1J = 1\ W.s$

L'absorbance à 254 nm des composés (1 mg/ml) a été mesurée par un spectrophotomètre Ultrospec 3000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) dans des cuves en quartz avec un chemin optique de 1 cm afin de vérifier que les composés n'altéraient pas la transmittance.

3.3. Chloration

La verrerie a été mise à tremper durant la nuit dans une solution à 50 mg/L de chlore libre, rincée à l'eau ultra pure (PURELAB Ultra, ELGA Labwater, Antony, France) et autoclavée 1h à 135 °C. Une solution stock d'hypochlorite de sodium (100 mg/L) a été préparée extemporanément. Les dosages de chlore ont été réalisés avec un colorimètre colorimeterTMII (HACH LANGE, Dusseldorf, Germany) après ajout de diéthyl-p-phénylènediamine en excès. Les cinétiques de consommation du chlore en présence des composés organiques ont d'abord été déterminées et ont permis de calculer le temps d'exposition au chlore nécessaire pour atteindre une dose de chlore libre correspondant à une valeur de Ct de 3 mg.min.L^{-1}. Le Ct est la valeur résultant du temps de contact t (min) multiplié par la concentration résiduelle en agent oxydant C (mg/L). Pratiquement, le temps d'exposition T a été déterminé pour chaque échantillon en calculant le temps correspondant à une aire sous la courbe de la fonction C=f(t) égale à 3 mg.min.L^{-1}.

A la fin des temps de contact correspondant (compris entre 3 min et 12 min), une solution de thiosulfate de sodium a été ajoutée à une concentration finale de 4 mg/L pour neutraliser le chlore libre actif et stopper la réaction.

4. Particle stability thermal release assay (PASTRY)

Les suspensions virales ont été graduellement chauffées en présence de SyBR Green II, qui fluoresce spécifiquement lorsqu'il se lie à des structures d'ARN double brin. La mesure en temps réel de la fluorescence permet de suivre l'accès du fluorochrome au génome viral, permis par la déstructuration des capsides. L'expérience a été réalisée dans un thermocycleur ViiA 7 (Life Technologies, Carlsbad, CA) dans un volume de 20 µl. Du SyBR Green II (Molecular Probe, Life Technologies) a été utilisé pour suivre l'accessibilité de l'ARN. Une solution mère à 200 x dans de l'eau RNase free (Sigma-Aldrich) a été préparée et stockée à -20 °C. Le SyBR green II a été utilisé à une concentration finale de 10 x en mélangeant 1 µl de solution mère à 19 µl de suspension virale à une concentration d'environ 10^{10} $TCID_{50}$/mL. Les échantillons ont été soumis à gradient thermique s'étendant de 22 °C à 95 °C avec une vitesse d'augmentation de 0,05°C/s et une lecture de fluorescence chaque seconde.

5. Microscopie électronique à transmission

Les échantillons qui ont été visualisés par microscopie électronique à transmission sont des suspensions de CV-B5 (10^8 TCID50/ml) incubées pendant 2 h avec du PBS 1X, du LPS de *P. aeruginosa* (1 mg/ml) ou du PG de *B. subtilis* (1mg/ml). Une goutte de poly-L-lysine (0,1 %) a été déposée sur des grilles de cuivre de 200 mesh recouvertes d'un film de carbone/formvar (Oxford Instruments, réf. S162). Les échantillons (10 µl) ont ensuite été déposés sur les grilles pendant 5 min puis rincés trois fois avec une goutte d'eau ultra pure. Les grilles ont enfin été contrastées avec de l'acide phosphotungstique (Oxford Instruments, réf. R1213) préparé à 2% et ajusté à pH 7, pendant 1 min puis séchées à l'air libre. Les grilles ont été analysées avec un appareil Jeol-100 CXII à 100 keV à un grossissement x 72 000.

6. Expérience d'évolution par sélection thermique

6.1. Évolution expérimentale sous pression de sélection thermique sur 20 cycles

Une population initiale de virus CV-B5, notée N0, a été exposée à 10 cycles de traitement thermique en présence ou en absence de LPS (1 mg/mL), ou de dilution sans traitement d'inactivation pour le contrôle non traité. Les trois conditions ont été réalisées en triplicats : les populations correspondantes sont notées T1 à T3 pour les populations traitées en l'absence de LPS, LT1 à LT3 pour les populations traitées en présence de LPS et NT1 à NT3 pour les populations contrôle non traitées (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Chaque cycle a été constitué d'une tape de traitement thermique (ou de dilution au millième pour la condition contrôle) et d'une étape de culture sur cellules 293A.

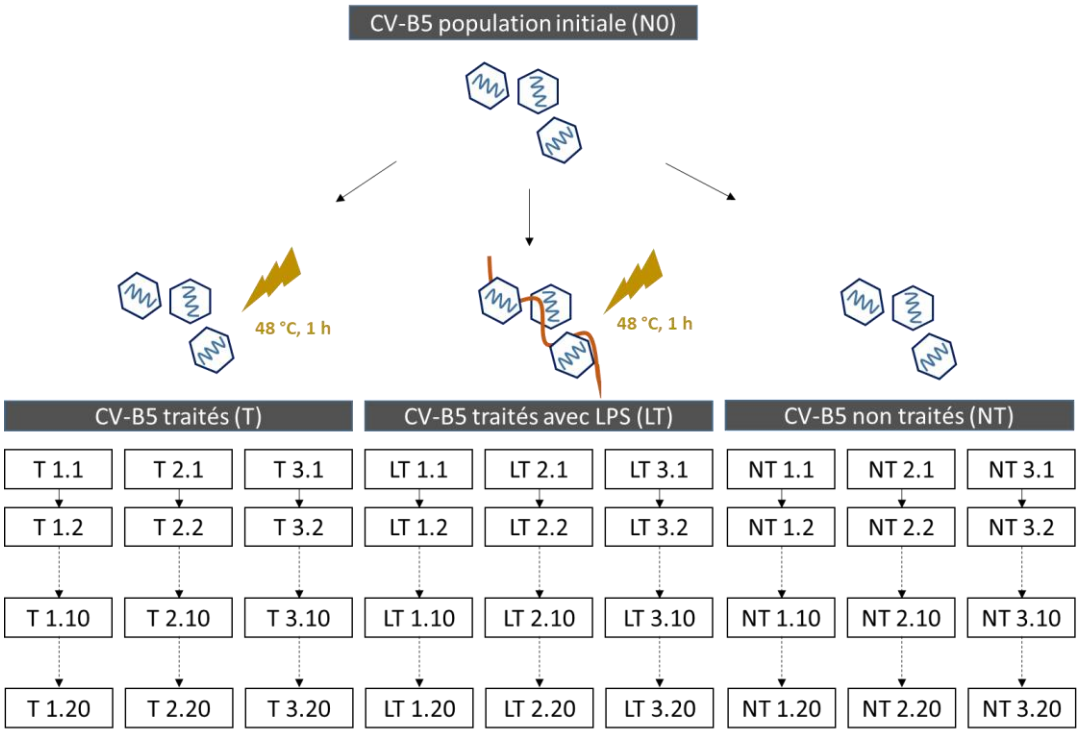


Figure 27 : Populations virales issues de la sélection thermique

Les traitements thermiques ont été effectués comme décrit dans la section 3.1 pendant 1 h à 48 °C dans un volume de 50 µL. Les populations NT ont été diluées dans du PBS (1 : 1000) dans un volume final de 50 µL.

Les échantillons (50 µL) ont ensuite été ajoutés aux milieux de culture de cellules 293A confluentes cultivées en plaques 24 puits (environ 2.10^5 cellules/puits). Après 1 h d'incubation à 37 °C, les milieux ont été aspirés, les cellules ont été rincées à trois reprises avec du PBS 1X afin d'éliminer les virus non adhérés aux cellules, et du milieu de production a été ajouté. Après 3 jours d'incubation, les milieux contenant les lysats cellulaires ont été récupérés et clarifiés par

centrifugation pendant 10 min à 10000 x *g*. Les surnageants ont été concentrés sur des unités de filtration Vivaspin 500 (10 000 MWCO, Sartorius) selon les recommandations du fournisseur et les virus ont été rincés avec du PBS 1X sur ces unités, et les volumes ont été ajustés à 500 µL avant un nouveau cycle. À la fin des cycles 10 et 20, les phénotypes et génotypes des populations ont été caractérisés.

6.2. Caractérisation des phénotypes

6.2.1. Sensibilité à l'inactivation thermique

Les virus issus des passages 10 et 20 et la population initiale de virus N0 ont été inactivés pendant 1 h à 48°C comme décrit dans la section 3.1, et les titres infectieux ont été déterminés comme décrit dans la section 1.3.

6.2.2. Test de l'efficacité de liaison aux cellules cibles

Les virus issus du passage 10 et la population initiale NT0 ont été inoculés sur des cellules 293A confluentes en plaques 24 puits à une MOI de 1. Les cellules ont été incubées pendant 2 h à 4°C pour permettre aux particules virales d'adhérer aux cellules tout en empêchant leur réplication. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS 1X puis ont été détachées et lysées dans 400 µL de TRIzol (Invitrogen).

6.2.3. Fitness replicative sur un cycle

Les virus issus du passage 10 et 20 et la population initiale N0 ont été inoculés sur des cellules 293A confluentes en plaques 24 puits à une MOI de 0,001. Après 1 h d'incubation à 37 °C, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS 1X puis soit lysées avec 400 µL de TRIzol (Invitrogen) (t0 post-infection), soit recouvertes de 0,5 mL de milieu et incubées à 37 °C jusqu'à à 8 h post infection avant d'être lysées dans 400 µL de TRIzol (Invitrogen).

6.2.4. Vitesse de production de nouveaux virus

Les virus issus des passages 10 et 20 et la population initiale N0 ont été inoculés sur des cellules 293A confluentes en plaques 6 puits à une MOI d'environ 0,001. Après 1 h d'incubation à 37 °C, les cellules ont été rincées deux fois avec du PBS 1X et 3 mL de milieu ont été ajoutés. Après 24 h et 48 h d'incubation à 37 °C, 400 µL de milieu de culture ont été prélevés.

6.2.5. Quantification des ARN viraux par biologie moléculaire

À l'issue des expériences décrites en 6.2.2 à 6.2.4, les acides nucléiques (échantillons de 400 µL) ont été extraits et élués dans 50 µL avec un extracteur automatique QIAsymphony (Qiagen) et un kit de réactifs QIAsymphony DSP Virus/Pathogen. Les génomes viraux ont été quantifiés par réaction de polymérisation en chaîne quantitative précédée d'une étape de transcription inverse (RT-qPCR). Les amplifications ont été effectuées avec le mix enzymatique TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies) en suivant les recommandations du fabricant, dans un volume de 20 µL contenant 5 µL de mix enzymatique, 10 µL d'échantillon, et 5 µL d'un pré-mix concentré 4X contenant les amorces et la sonde (Tableau 20). Les réactions ont été réalisées dans un thermocycleur en temps réel ViiA 7 (Life Technologies) avec un profil thermique incluant une étape de transcription réverse à 50 °C pendant 5 min, suivie d'une dénaturation initiale à 95 °C pendant 20 s, et de 45 cycles comprenant une dénaturation de 5 s à 95 °C et une étape de d'hybridation/élongation de 40 s à 60 °C. La fluorescence a été mesurée à la fin de chaque élongation sur le canal FAM. Un contrôle négatif et un contrôle positif ont systématiquement été inclus. Une courbe standard a été réalisée à l'aide d'un vecteur pGEM-T-easy (Promega) contenant la séquence cible. La concentration du plasmide a été mesurée par spectrophotométrie et une courbe standard a été établie par dilutions décimales (10^1 à 10^7 à copies/réaction) (Wurtzer *et al.*, 2014).

Tableau 20 : Amorces et sondes de RT-qPCR pour la quantification des entérovirus (cible : région 5'NTR)

	Séquence	Concentration finale
Amorce sens	**5'** GCCCCTGAATGCG **3'**	900 nM
Amorce antisens	**5'** TGTCACCATAAGCAGY **3'**	900 nM
Sonde	**5'** FAM-CCAAAGTAGTCGGTTCC-NFQ MGB **3'**	100 nM

6.3. Caractérisation des génotypes par séquençage haut débit (NGS)

Les populations virales ont été séquencées par une approche de séquençage des ARN (RNA-seq) après un pré-traitement des échantillons visant à exclure les acides nucléiques libres d'origine cellulaire ou virale et les particules virales non intègres. Les différentes étapes sont résumées sur la Figure 28.

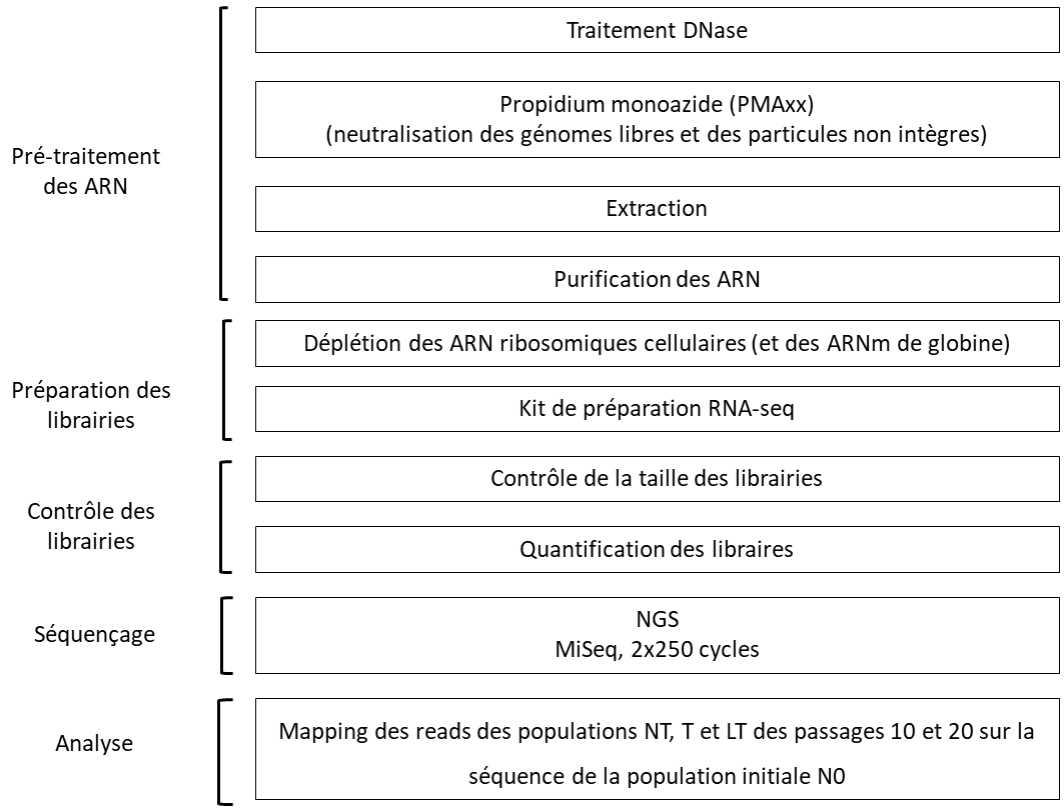


Figure 28 : Étapes de la stratégie de séquençage

6.3.1. Pré-traitement des échantillons et extraction

Pour éliminer l'ADN des cellules hôtes, un traitement à la DNase (Ambion, Life Technologies) a été effectué. Pour cela, 5 µL de DNase I buffer 10X et 1 µl rDNase I (2U) ont été ajoutés aux échantillons de virus dans un volume final de 50 µL, qui a été incubé à 37°C for 30 min. Après incubation, 5 µL de DNase inactivation reagent ont été ajoutés et la réaction a été incubée 2 min à température ambiante. Pour finir, les échantillons ont été centrifugés à 10000 x *g* pendant 1 min 30 s et les surnageants ont été récupérés.

Pour réduire dans les échantillons la proportion de génomes viraux correspondant à des particules non infectieuses, les extractions ont été précédées d'un traitement avec un agent intercalant qui inhibe la réplication des acides nucléiques auquel il se lie de façon covalente sous l'action des rayons UV. À cette fin, les échantillons ont été incubés dans la glace à l'obscurité pendant 30 min avec 0,2 mM de propidium monoazide PMAxx (Molecular Probes, Life Technologies). L'étape de photo activation permettant de former des liaisons covalentes entre les acides nucléiques libres et le monoazide a été effectuée avec un système PhaST Blue (IUL, Barcelona, Spain) pendant 15 min à température ambiante.

Les volumes ont été ajustés à 100 µL avec de l'eau RNase-free et les acides nucléiques ont été extraits avec un extracteur automatique MagNA Pure Compact (Roche) et un kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche). Les acides nucléiques ont ensuite été purifiés par précipitation à l'éthanol : les volumes des extraits ont été ajustés à 180 µL avant d'ajouter 18 µL d'acétate de sodium (3 M) et 2 µL de glycogène (10 mg/mL). Un volume de 600 µL d'éthanol absolu a été ajouté et les échantillons ont été conservés sur la nuit à -20 °C. Ils ont ensuite été centrifugés 30 min à 10000 x *g* à 4 °C, puis les culots ont été rincés 2 fois par ajout d'éthanol à 70 % suivi d'une centrifugation de 5 min à 10000 x *g.* Les culots d'ARN ont enfin été dissous dans 12 µL d'eau RNase-free.

6.3.2. Préparation et contrôle des librairies

Les ARN ribosomaux (et les ARNm de globine) provenant des cellules hôtes ont été déplétés avec un kit QIAseq FastSelect RNA Removal (Qiagen), qui inclue également l'étape de fragmentation des ARN. Le protocole a été adapté pour être combiné avec un kit de préparation des librairies NEXTflex Rapid RNA-Seq Kit (Bioo Scientific) en suivant les recommandations du fabricant. À cette fin, 5 µL de NEXTflex RNA fragmentation buffer, 1 µl de Globin Removal et 1 µl de rRNA Removal ont été ajoutés à 12 µL d'ARN. La réaction a été incubée dans un thermocycleur en suivant les indications du protocole (Qiagen). Le protocole du kit NEXTflex Rapid RNA-Seq a ensuite été suivi à partir de l'étape de synthèse du premier brin (étape B). Deux étapes de lavage ont été réalisées avec 0,8 X de billes Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter). La distribution de la taille des librairies a ensuite été contrôlée avec un Bioanalyzer 2100 et un kit DNA High Sensitivity (Agilent).

6.3.3. Normalisation des librairies et séquençage

Les librairies ont été quantifiées avec du Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent (Thermo Fisher Scientific), puis normalisées à 4 nM. Les séquençages ont été réalisés avec un séquenceur MiSeq utilisant des réactifs MiSeq Reagent Nano kits v2, 2 x 250 cycles.

6.3.4. Analyse des données

Les données générées par RNA-seq ont été analysées sur la plate-forme Galaxy (https://usegalaxy.org/). Les principaux outils sont listés dans le Tableau 21. La séquence consensus de la population N0 a été obtenue en mappant les reads correspondants sur la séquence de la souche 7A4 (genbank MF973166.1). Parmi l'ensemble des séquences complètes de CV-B5 déposées dans la base de données BLAST, cette souche est celle avec laquelle une séquence partielle de la population N0, initialement obtenue via une approche ciblée par amplicons non décrite ici (3368 nucléotides correspondant aux protéines de capside) avait le pourcentage d'homologie le plus élevé (93,5 %). Les reads issus des neuf populations issues des passages 10 et 20 ont été mappés sur la séquence de N0 (outil FreeBayes). Les séquences consensus ont été extraites (outil Bcftools consensus) et alignées avec l'éditeur BioEdit. Seules les mutations non synonymes ont été conservées dans la séquence codante.

Tableau 21 : Principaux outils utilisés sur Galaxy

Outils	Objectif	Paramètres
FastQC (Version 0.72)	Visualisation et contrôle visuel de la qualité des reads	-
Trimmomatic (Version 0.36.5)	Nettoyage et tri des reads	Score de qualité phred (Q) > 28
Map with BWA-MEM (Version 0.7.17.1)	Mapping des reads sur une séquence de référence	Référence : - CVB5 souche 7A4 (MF973166.1) pour l'échantillon N0 - séquence consensus N0 pour les autres échantillons
FreeBayes (Version 1.1.0.46-0)	Détection de variants	Ploïdie = 1 Probabilité d'un polymorphisme > 0,4
VCFfilter (Version 1.0.0_rc1)	Filtrage des variants détectés	- Profondeur de séquençage (DP) > 10 - Score de qualité phred (référence/polymorphisme) (QUAL) > 20
Bcftools consensus (Version 1.4.1)	Extraction de la séquence consensus incluant les variants filtrés	-

Chapitre 1 : Conséquences des interactions entre des entérovirus et des composés microbiens sur l'efficacité des traitements d'inactivation

Introduction

Les eaux de surface sont une ressource majeure pour la production d'eau potable, en particulier dans les grandes agglomérations urbaines. D'importants volumes d'eau peuvent en effet être facilement pompés afin d'assurer un approvisionnement constant des populations en eau. Toutefois la qualité microbiologique des eaux de rivières urbaines est généralement médiocre du fait de la proximité des activités humaines, et est susceptible d'être confrontée à des pics de pollution liés aux conditions climatiques. Les rivières urbaines sont en particulier presque systématiquement contaminées par des virus entériques, plus résistants que la plupart des bactéries, et dont les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milliers de génomes par litre. Dans les usines de potabilisation l'élimination des virus pathogènes est, en conditions normales, assurée par des traitements multi-barrières basés sur des méthodes de rétention et de désinfection.

Les virus humains ne font actuellement pas partie des paramètres microbiologiques de référence requis pour assurer la qualité de l'eau potable, et leurs méthodes de détection sont relativement complexes par comparaison avec celles des indicateurs bactériens. Aussi ne sont-ils pas systématiquement recherchés dans les eaux brutes ou produites. Les abattements viraux attendus des étapes de désinfections sont estimés à partir d'études souvent menées à petite échelle, dans des solutions salines tamponnées ou de l'eau ultra pure, et sur un nombre restreint de modèles viraux entretenus en laboratoire. Ces conditions sont relativement éloignées de la réalité des usines de production d'eau potable qui prennent en charge des flux massifs d'eau pouvant contenir plus d'une dizaine d'espèces virales pathogènes. De plus, bien que les premières étapes de clarification éliminent la plus grande part des matières organiques et particules en suspension, l'eau atteignant les étapes finales de désinfection est susceptible de contenir des bactéries libres ou associées à du biofilm.

Les objectifs de ce chapitre sont d'une part de décrire l'effet de la présence de composés d'origine microbienne sur l'efficacité de différentes méthodes d'inactivation d'entérovirus, et d'autre part de rechercher s'il existe une spécificité d'interaction liée au sérotype viral ou au type de composé microbien. Ce chapitre se présente sous la forme d'un article scientifique publié dans le journal *Environmental Science & Technology*.

Article publié dans *Environmental Science & Technology* le 8 novembre 2017

[ACS Editors' Choice]

Interaction of human enteric viruses with microbial compounds: Implication for virus persistence and disinfection treatments.

Prunelle Waldman[1], Alba Meseguer[2], Françoise Lucas[1], Laurent Moulin[2* Δ] & Sébastien Wurtzer[2 Δ]

[1] Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains (LEESU UMR MA 102), Faculté des Sciences et Technologie, Université Paris-Est, 61 avenue du Général de Gaulle, 94000 Créteil, France

[2] Eau de Paris, DRDQE, 33 Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry-sur-Seine, France

[Δ] Contributed equally to this work

* Corresponding Author: laurent.moulin@eaudeparis.fr

ABSTRACT

Although the interaction between phages and bacteria has already been well described, it only recently emerged that human viruses also interact with bacteria in the mammalian gut. We studied whether this interaction could occur in tap water and thus confer enteric viruses a protection against temperature and the classical disinfection treatments used in drinking water production. We demonstrated that the addition of lipopolysaccharide or peptidoglycan of bacterial origin to enterovirus provides thermal protection through stabilization of the viral capsid. This interaction plays a role when viruses are exposed to disinfection that targets the capsid, but less so when the virus genome is directly targeted. The interaction seems to be serotype-specific, suggesting that capsid protein sequence could be important. The protection is linked to a direct association between viral particles and bacterial compounds as observed by microscopy. These results show that bacterial compounds present in the environment can affect virus inactivation.

INTRODUCTION

Enteric viruses are one of the major causes of water-borne diseases resulting from fecal pollution and malfunctions of water distribution systems. In numerous countries, drinking water is produced from waters contaminated by enteric viruses [1, 2] usually because of human pollution of surface and underground waters. The viral quality of urban rivers is mainly affected by treated effluents issued by wastewater treatment plants (WWTP). Several studies analyzing both clinical and water samples demonstrated that the viral diversity was richer in raw sewage, treated effluents and finally urban rivers than in clinical samples. These environmental samples probably reflected better the health status of the inhabitants [3-5]. When assessing the risk level for human contamination, human enteric virus persistence in aquatic environments (i.e. waste, surface and even treated water) is another important feature to consider. These non-enveloped viruses which are resistant to environmental conditions and do not sediment can contaminate wide areas and be detected far away from their emission sources.

As the supply of safe drinking water is essential for ensuring the health of populations, water produced from polluted resources goes through various disinfection barriers established in drinking water treatment plants (DWTP). After physical removal (mostly by filtration, coagulation and sedimentation), the most frequently used disinfection and inactivation treatments are ozone, ultraviolet (UV) radiations, and chlorine. The processes applied in DWTP are adapted to the quality of the water resource. Disinfection steps are systematically required since pathogens, including viruses, are always found during the early stages in “clarified” waters [6].

Whatever the treatment and disinfection process, various efficiency results, expressed in log of virus inactivation, have been published. When assessed in laboratory under controlled conditions, disinfection treatments generally prove quite efficient [7, 8], even if some specific viruses show greater relative resistance to particular treatments (adenovirus for UV disinfection for example [9, 10]).

However, despite these disinfection steps, outbreaks occur [11-14] and some authors reported the detection of virus particles in drinking water, demonstrating that viruses can sometimes go through disinfection processes [15, 16]. This could result from inadequate treatment (technical failure, high viral concentration or viral resistance) and suggests that virus inactivation might be overestimated in laboratory conditions. An explanation could be that the efficiency of treatments is usually evaluated using purified viruses, cell culture-adapted strains and sometimes virus surrogates like bacteriophages. In fact, in addition to their differing sizes (from about 30 to 80 nm), viruses present various surface properties (structure, electrostatic charges, hydrophobicity) which may drive interactions with other compounds in the environment or during disinfection treatments. As an example, such interactions could explain why bacteriophages persist longer in sediments than in the water column [17].

Virus aggregation has been widely described [18] [19] and more generally viruses can form aggregates with organic matter in surface waters [20, 21]. Previous works have shown that particle-associated viruses present an enhanced survival in water [22] and a stronger resistance to disinfection treatments [23], but typically the apparent resistance was directly linked with the consumption/absorption of the disinfecting agent.

A recent work has demonstrated that human norovirus can bind to different intestinal bacteria [24]. It is also known that virus-bacteria interactions are specific and drive the infection in mammal guts [25-27]. Although such interactions are not well described, these results indicate that interactions with bacterial compounds, like surface lipopolysaccharides, can improve the thermal stability of poliovirus particles. The authors highlighted the importance of the amino acid in position 99 of VP1 protein in mediating this interaction [26]. However, it remains unclear whether enteric viruses could interact with various bacteria strains with different affinities.

Altogether these results suggest that close interactions with organic matter originating from micro-organisms could impair virus inactivation during disinfection treatments. Although treated waters are poor in organic matter, the presence of bacteria in planktonic or biofilm states implies the presence of microbial compounds with unknown consequences.

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of virus inactivation against thermal and disinfection treatment (free chlorine and UV radiation) in the presence of purified microbial compounds. The study was focused on enteroviruses as representative models of human enteric viruses.

MATERIALS AND METHODS

Virus stocks preparation

Coxsackievirus A21 (CV-A21), coxsackievirus B5 (CV-B5), echovirus 30 (E30) and poliovirus 1 strain Sabin (PV1), were kindly provided by Dr. Houssin (LABEO, Caen, France). They were cultivated on confluent monolayer cultures of Buffalo Green monkey Kidney (BGMK) cells at 37°C with 5% CO_2. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose medium (Dutscher, #L0103) supplemented with 2% fetal bovine serum (PanBiotech, #3301-P113103), non-essential amino acids (Dutscher, #X0557), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (PanBiotech, #P06-07100). To collect viruses, cells were lysed by three freeze-thaw cycles, and the supernatants were clarified by centrifugation at 2000 x g for 15 min. Viral suspensions were then ultracentrifugated at 150,000 x g at 4 °C for 2 hours through a 40 % sucrose cushion. To remove sucrose, pellets were resuspended in 1x phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 and concentrated on Vivaspin 20 centrifugal concentrators (10,000 MWCO) (Sartorius). This step was repeated twice. For particle stability thermal release assay, an additional step of ultracentrifugation on cesium chloride gradient (from 1.2 g/L to 1.5 g/L) at

100,000 x g for 18 hours was added and the fraction containing the viruses was desalted as described above for sucrose removal. Viruses were stored at - 80 °C before using.

Virus quantification by endpoint dilution assay

Viruses were titrated by standard 10-fold dilutions in 96-well plates on BGMK cells (10^4 cells per well). After 6 days of incubation (time for visualizing cytopathic effects), the supernatants were discarded and cells were fixed with 0.1 M HCl for 5 min. The HCl solution was removed, cells were stained with a 4 g/L crystal violet solution for 10 min and finally rinsed with deionized water. Positive wells were counted and viral titer was estimated using the Spearman-Kärber method. Results are expressed as 50% tissue culture infective dose (TCID50) per ml [28].

When treatments were performed, we referred to protection as the difference of titers between treated viruses with and without polysaccharides. It traduced the reduction of the treatment efficiency.

Microbial compounds

Organic compounds considered in this study included lipopolysaccharides (LPS) from *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma, #L9143) and peptidoglycans (PGs) produced from *Bacillus subtilis* (Sigma, #59564) and *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, #72789). Both are important components of the bacterial cell envelope. LPS are made of a lipid moiety and a glyosidic part and are the major components of the outer membrane of Gram-negative bacteria. PG consists in a polymer of sugars and amino acids and is the major component of the cell wall of most Gram-positive bacteria. *P. aeruginos*a and *B. subtilis* are commonly found in environmental waters and drinking water networks. Stock suspensions (10 mg/ml) were prepared by dilution in 1x PBS pH 7.4 and stored at – 20 °C. For each experiment they were diluted in PBS to achieve different concentrations (0.01 to 1 mg/ml).

Virus pretreatment

Inactivation treatments were preceded by a 2-hours incubation with microbial compounds (1 mg/ml in disinfection treatment experiments and 0.01 to 1 mg/ml for dose-response in thermal inactivation) or an equal volume of 1x PBS pH 7.4 at room temperature. After the treatments described below, each sample was filtered with a low-binding protein 0.22 µm membrane filter (Millipore, #SLGV01352) prior to infectivity titration to determine the efficacy of the inactivating treatment.

Heat exposure

Virus suspensions were prepared to a final concentration of about 10^6 TCID50/ml in 1x PBS pH 7.4. Experiments were performed using a thermal cycler (LightCycler 96, Roche) in 96-well microplates (50 µl per well). For heat inactivation curves of the four virus strains (Figure 1), samples were incubated for 1 hour at various temperatures ranging from 44°C to 52°C. For heat treatments in the presence of microbial compounds, samples were incubated for 1h at 50°C, a temperature allowing a substantial (but not full) inactivation of the four strains. Heat exposures were immediately followed by a cooling down step on ice to prevent further inactivation.

Ultraviolet (UV) exposure

Virus suspensions were prepared to a final concentration of about 10^6 TCID50/ml in 1x PBS pH 7.4. Two hundred microliters of virus suspension was exposed to 40 mJ/cm^2 UV dose (a dose commonly applied in DWTP) or 80 mJ/cm^2 using a 253.7 nm UV lamp (Phillips, Amsterdam, Netherlands) at room temperature. A digital UVC radiometer (IL Metronic Sensortechnik GmbH, Germany) was used to monitor UV irradiation. The absorbance of microbial compounds (1 mg/ml) was measured by an Ultrospec 3000 spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

Chlorine treatment

Glassware was prepared by soaking overnight in 50mg/L chlorine solution followed by thorough rinsing with chlorine demand-free (CDF) water and, finally, autoclaving for 1h at 135°C. All solutions and buffers were made with reagent-grade CDF water which was prepared from drinking water using a PURELAB Ultra device (ELGA Labwater, Antony, France). A stock solution of sodium hypochlorite (100mg/L) was prepared with CDF water. Chlorine concentrations were measured with a Pocket colorimeter™ II (HACH LANGE, Dusseldorf, Germany). Viral suspensions were prepared to a final virus concentration of about 10^7 TCID50/mL in 1x PBS pH 7.4. The free chlorine concentration was measured before and after addition of microbial compounds (1mg/ml). The concentration of free chlorine remained at least to 0.2 mg/L during the study. The exposure time to free chlorine was calculated from kinetics of chlorine consumption and adjusted in order to maintain a CT-value equal to 3 mg.min/L, corresponding to the time (min) of treatment multiplied by efficient oxydant concentration (mg/L). Practically, we selected the time for which the area under the free chlorine concentration-time curves (see Figure S2) was 3 mg.min/L. Times ranged from 3 to 12 min. Then, sodium thiosulfate was added to 4 mg/L final concentration in order to quench any remaining free chlorine and stop immediately the inactivation treatment. After treatment with chlorine, each sample was analyzed by viral titration.

Modelling of virus inactivation

All virus reduction data were fitted with a sigmoidal dose-response model, amongst various dose-response models tested. This model was determined using GraphPad Prism version 6.01 software (GraphPad, La Jolla, CA), according to the following equation:

$$Log\ (\frac{Nx}{N0}) = Top + \frac{Top - Bottom}{(1 + 10^{X50-X})}$$

X is the temperature (°C). N0 is the initial viral titer and Nx is the viral titer after the 1-hour heat treatment at X °C, each expressed in TCID50/ml. The variable Bottom is the $Log\ \left(\frac{Nx}{N0}\right)$ value at the bottom plateau; Top is the $Log\ \left(\frac{Nx}{N0}\right)$ value at the top plateau, and X50 is the X value when the response is halfway between Bottom and Top.

Particle stability thermal release assay (PaSTRy)

PaSTRy was used to estimate the thermal stability of viral capsid. Viruses are gradually heated in the presence of a nucleic acid dye that can reach the viral genome when the capsid loses its integrity. The experiments were performed with a ViiA 7 real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA) in 96-well plates with 20 µl reaction volume. SyBR Green II (Molecular Probe, Life Technologies) was used to monitor RNA accessibility. A working stock of 200x SyBR green II was produced by dilution in 1x PBS pH 7.4 and stored at -20°C. SyBR green II was used at final concentration of 10x by mixing 1 µl of working stock with 19 µl of virus suspension at a concentration of 10^{10} TCID50/mL in PBS. The experiments were ramped from 22°C to 95°C at a scan rate of 0.05°C/s and taking a fluorescence reading every 0.05°C.

Transmission electron microscopy (TEM)

TEM was used to visualize virus interaction with LPS and PG. Samples consisted in coxsackievirus B5 suspension in PBS (10^8 TCID50/ml) incubated for 2h at room temperature with PBS, LPS (1 mg/ml) and PG from *B. subtilis* (1mg/ml). A drop of 0.1 % poly-L-lysine was placed on formvar/carbon-coated 200 mesh copper grids (Agar Scientific) for 5 min and the excess was blotted off with filter paper. This step was performed to increase grids hydrophilicity. 10 µl of sample were then placed on the grid for 5 min, the excess was removed as previously described and the grid was washed three times with molecular grade water. Finally, grids were negatively stained with 2% phosphotungstic acid pH 7 for 1 min and air-dried. Grids were analyzed with a Jeol-100 CXII operating at 100 keV at a magnification of x72.000.

RESULTS

Thermal stability of enteroviruses

The thermal stability of various enterovirus serotypes was evaluated by exposing purified virus suspensions to different temperatures. The log_{10} reduction of infectivity is shown in Figure 1. None of the four enterovirus serotypes tested remained infectious after an exposure to 52°C for 1 hour. Since the slopes of each curve in the exponential decay phase were very close, we chose to characterize the sensitivity by the temperature at which the second derivative reaches its minimum value. This value was called temperature of initial inactivation (Ti). These values were very close for E30 (48.5°C) and PV-1 (48.8°C) serotypes and lower for CV-A21 (44.5°C) and CV-B5 (45.3°C). The sensitivity curves to temperature are shown in Figure 1. They led us to select 50°C for experiments combining heat inactivation and polysaccharides, because this temperature induced a substantial inactivation of the four strains.

Figure 1

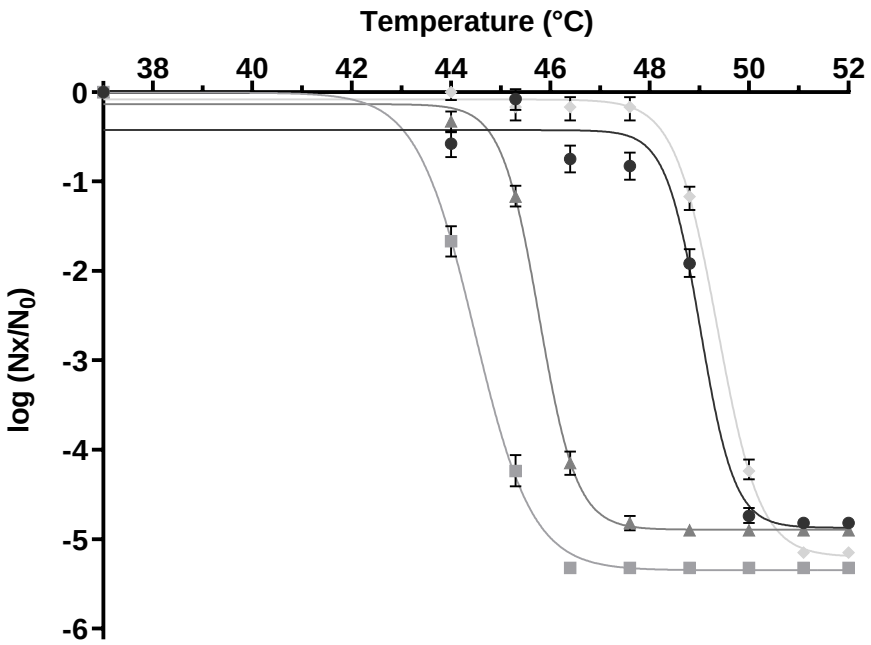


Figure 1: Thermostability profile of four enterovirus serotypes. CV-A21 (grey squares), CV-B5 (dark grey triangles), E30 (black dots) and PV1 (light grey diamonds) were heat-inactivated for 1 hour at the specified temperatures. Results are expressed as log inactivation of viruses evaluated by cell culture. The error bars represent the standard deviation given by the Spearman & Kärber algorithm of a

single representative experiment. The data were fitted with the sigmoidal dose-response equation with no constraint.

Furthermore, a particle stability thermal release assay (PaSTRy) was performed in order to monitor the viral RNA accessibility. The SyBR green II accessibility to viral RNA reflects the initial destabilization of virus capsid structure. The results presented in Figure 2C showed an initial increase of CV-B5 capsid permeability at about 44°C with a maximum RNA accessibility at 52°C. These data were in agreement with virus infectivity measured by cell culture-based assay.

Protective effect of microbial compounds against heating

The impact of virus interactions with microbial compounds on thermal stability was assessed, firstly taking E30 serotype, exposing a BC loop amino acid sequence different from that of PV strain Mahoney (see Figure S2). Based on thermal stability profiles of the four viruses, an inactivation for 1 hour at 50°C was performed after a 2-hour incubation step with lipopolysaccharides from *P. aeruginosa* or peptidoglycans from *S. cerevisiae* or *B. subtilis*. The results are shown in Figure 2A. No noticeable difference was observed at 20°C between virus suspensions incubated with polysaccharides and control condition. The one-hour inactivation step induced a 5-log reduction in E30 titer in agreement with Figure 1. However a 2-log reduction was noticed when E30 was pre-incubated with polysaccharides. Polysaccharides thus conferred to E30 a 3-log relative protection against heating.

The protective effect of polysaccharides against heat inactivation depended on the concentration (Figure 2B). The protection was observed at 50°C from 0.05 mg/mL PGs and 0.5 mg/mL LPSs and reaches its maximum with 0.1 mg/mL PGs and 1 mg/mL LPSs.

In the PaSTRy assay (Figure 2C), the incubation of CV-B5 suspension with LPS induced a thermal shift of RNA accessibility. The initial destabilization of the capsids occurred at 50°C, compared to 44°C in the control. This thermal shift induced by LPS was in agreement with the virus protection against inactivation at 50°C (Figure 2A).

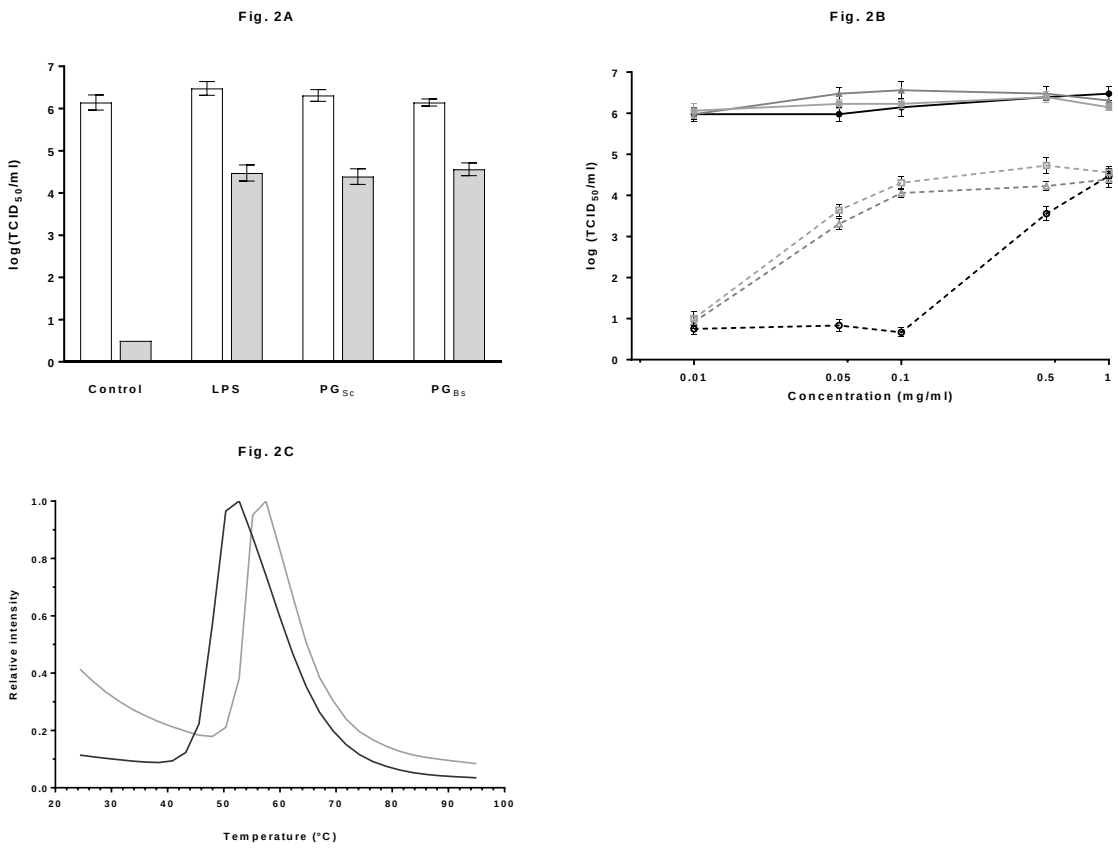


Figure 2: (A) Thermal stabilization of E30 by bacterial compounds. Virus infectivity was evaluated by cell culture after a 1-hour incubation at 25°C (white) and 50°C (grey) in the presence of bacterial compounds (1 mg/ml). **(B) Concentration-dependent heat-stabilization of E30 by bacterial compounds.** Infectivity was measured after a 1-hhour incubation at 25°C (solid lines) and 50°C (dotted lines) with LPS (black), PGN from *S. cerevisiae* (dark grey) and PGN from *B. subtilis* (light grey). In A and B the error bars represent the standard deviation of one representative experiment given by the Spearman & Kärber algorithm. **(C) Monitoring of RNA accessibility using SYBR green II.** Particle Stability Thermal Release Assay (PaSTRy) was performed on CV-B5 (black) and CV-B5 + LPS (grey). The data shown are from one representative experiment.

Protective effect of microbial compounds against free chlorine

The effect of free chlorine on E30 was tested after a 2-hours incubation with microbial compounds (Figure 3). Infectivity was measured after an exposure at a CT (concentration x time) of free chlorine equal to 3 mg.min.L^{-1}. The exposure time was adjusted to maintain a steady CT. Degradation kinetics of free chlorine induced by microbial compounds are presented in Supporting Information (Figure S1). E30 infectivity was strongly reduced by 5.3-log in control condition, but was not modified by chlorination in the presence of polysaccharides. Thus E30 protection was almost total with LPS and PG in these experimental conditions (Figure 3).

Fig. 3

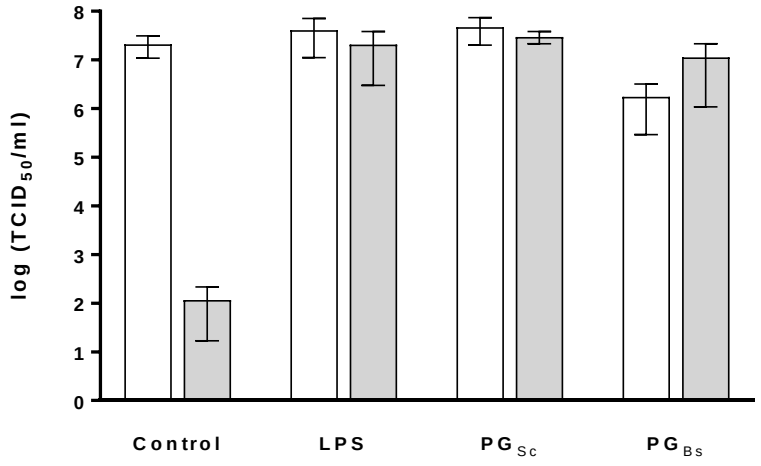


Figure 3: Effect of bacterial compounds on E30 sensibility to chlorination. Virus infectivity was evaluated by cell culture before (white) and after (grey) chlorination at the same Ct (3 mg.min.L^{-1}). The error bars represent the standard error from 3 experiments.

Protective effect of microbial compounds against UV exposure

The effects of microbial compounds on E30 inactivation by low pressure UV exposure were also analyzed. The UV transmittance at 254 nm was not affected by any of the bacterial compounds (data not shown). Without pre-incubation with microbial compounds, the UV dose of 40 mJ/cm² gave rise to a 3-log reduction of E30 infectious titer, whereas a 5-log reduction was observed after the 80 mJ/cm² UV dose. After pre-incubation with PG from *S. cerevisiae*, a 2-log reduction of E30 was observed at 40 mJ/cm². The other compounds did not induce any protection at this UV dose. At the 80 mJ/cm² dose, incubation with both PGs induced a 4-log reduction of infectious virus, resulting in avirus protection close to 1-log compared to control (Figure 4).

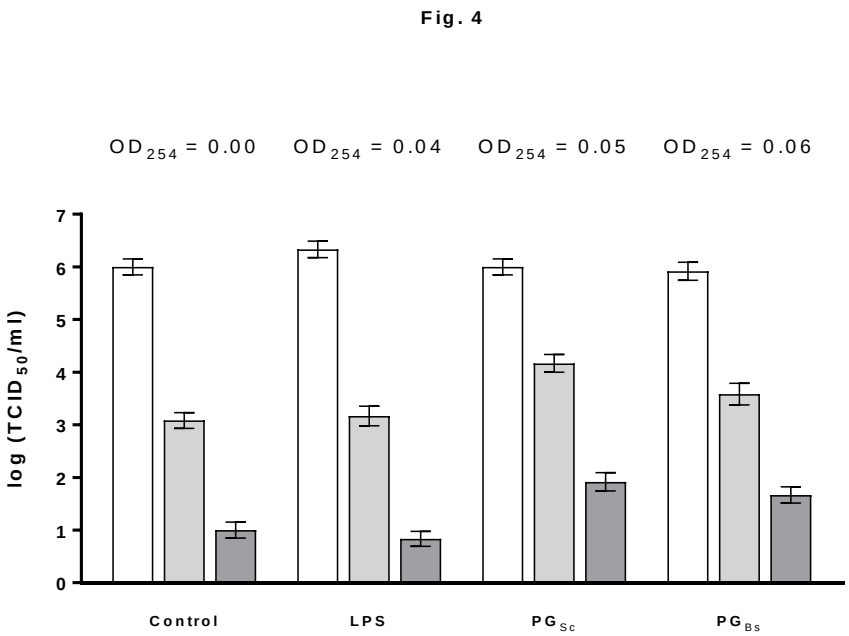


Figure 4: Effect of bacterial compounds on E30 inactivation by UV irradiation. Infectivity was measured before treatment (white) and after exposure to 40 mJ/cm^2 (light grey) and 80 mJ/cm^2 (dark grey) UV irradiation. The error bars represent the standard deviation given by the Spearman & Kärber algorithm of a single representative experiment.

Protection of different enterovirus serotypes against heating

We investigated whether the protection from heating induced by microbial compounds also occurred with other enterovirus serotypes. The BC loop which is a highly exposed region of the VP1 protein has previously been identified as being implicated in LPS mediated protection [26]. We focused on three other serotypes for which the temperature sensitivity is described in Figure 1. Numerous polymorphisms have been reported in the BC loop protein sequence of these serotypes (Figure S2). Suspensions of each serotype were exposed to heat inactivation after a pre-incubation with polysaccharides. For CV-A21, a 3-log infectivity protection was noted with LPS and PG from *B. subtilis* while no protective effect was observed with PG from *S. cerevisiae* compared to control. For CV-B5, PV-1 and E30 serotypes, a protection of about 5-log, 3-log, and 2-log, respectively, was induced by all polysaccharides (Figure 2A, 5). Similar results were obtained with all tested serotypes regarding UV exposure or free chlorine treatment (data not shown).

Fig. 5

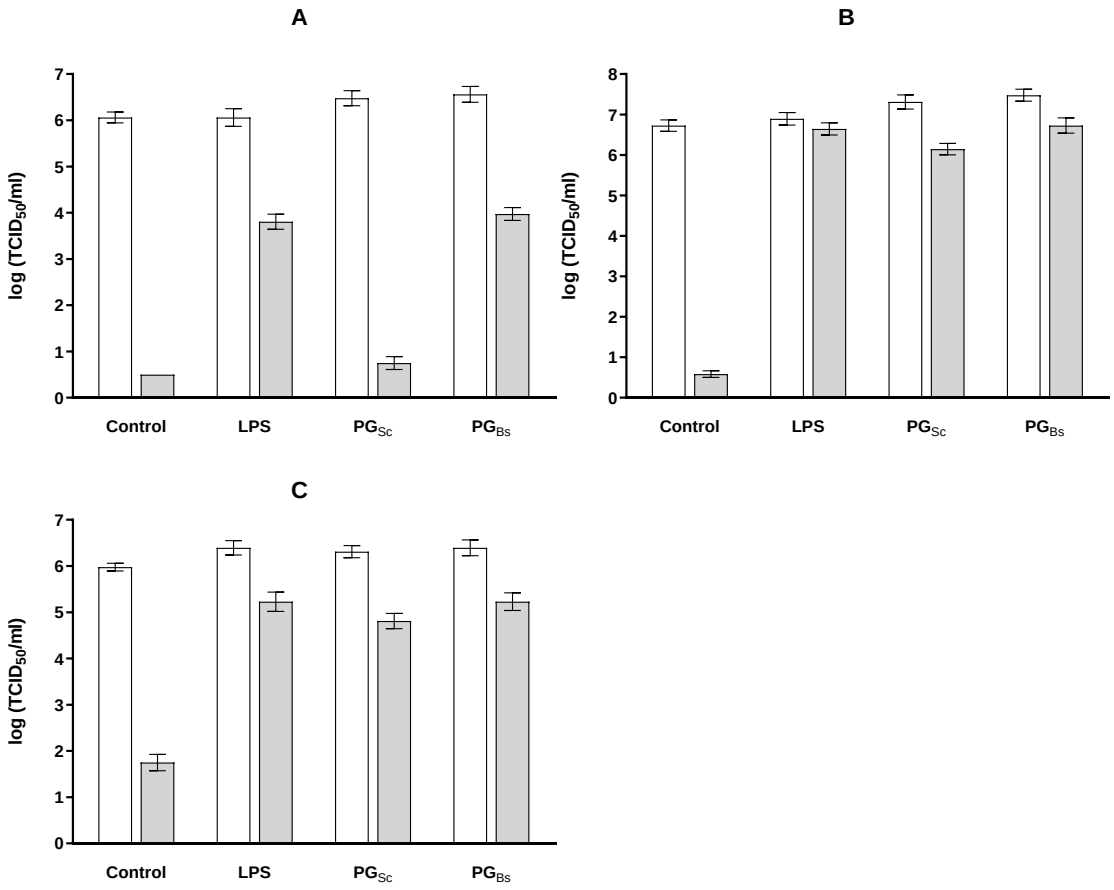


Figure 5: Thermal sensitivity of CV-A21 (A), CV-B5 (B) and PV1 (C) by bacterial compounds. Virus infectivity was measured by cell culture after a 1-hour incubation at 25°C (white) and 50°C (grey). The error bars represent the standard deviation given by the Spearman & Kärber algorithm of a single representative experiment.

Microscopic observation of microbial compounds/virus interactions

The establishment of physical interactions between viruses and microbial compounds is the simplest hypothesis to explain the protective effects. To visualize these interactions, CV-B5 was observed by transmission electron microscopy after incubation with PBS, LPS and PG_{BS} (Figure 6). In the first case, virus particles did not form aggregate (Figure 6A). However, in the presence of bacterial compounds, particles agglomerated around LPS (Figure 6B) and bound to PG_{Bs} (Figure 6C), implying a physical interaction between the virus and the bacterial compound.

Fig. 6

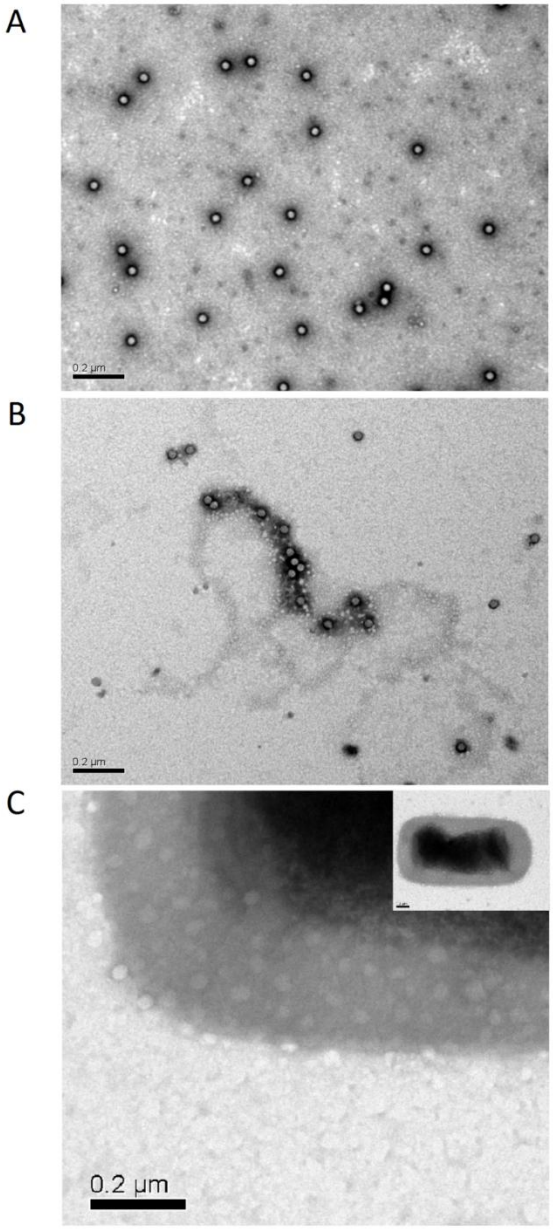


Figure 6: Transmission electron micrographs of CV-B5 incubated with PBS (A), LPS (B) and PG_{Bs} (C) and negatively stained with 2% phosphotungstic acid (x72.000 magnification).

DISCUSSION

In this study, we observed that interactions with purified microbial compounds stabilized and/or protected viruses against various inactivation treatments (heat, chlorine, UV).

Contrary to a previous work [26], in our experimental conditions the incubation of viral particles with polysaccharides did not enhance virus infectivity at 25°C. After determination of the initial inactivation temperature (T_i) (Figure 1) we heat-treated enteroviruses with different microbial compounds. Coupled with a thermal scanning method (PaSTRy) which has previously proved efficient in assessing the thermal stability of various viruses [29-32], this approach demonstrates that the addition of microbial compounds increases virus resistance to heat. More precisely, the destabilization of CV-B5 particles started at 44°C in the control condition, allowing SyBR green II accessibility to the viral RNA (Figure 2C). The incubation with LPS shifted this temperature threshold to 50°C suggesting that the interaction virus/LPS resulted in the stabilization of the capsid structure. As a consequence, viruses heat-treated at 50°C remained infectious when incubated with polysaccharides (Figure 2A).

This stabilizing effect was concentration-dependent and was observed on E30 at concentrations of 0.05 mg/ml or over for both PGs. In the case of LPS, a concentration of at least 0.5 mg/ml was required (Figure 2B), indicating that the protection was probably driven by a specific effect related to the nature of the interaction. This concentration-dependent relationship was previously reported by Kuss and collaborators who have shown that poliovirus strain Mahoney particles were stabilized by 0.1 mg/ml of LPS [25].

In order to assess if this stabilizing effect could also be involved during usual drinking water treatments, we first studied the impact of polysaccharides during chlorine treatment. Free chlorine was monitored at the end of each experiment in order to avoid bias due to consumption of free chlorine reacting on the added organic compounds. In these conditions, all the three tested compounds provided an important protective effect (Figure 3). Thereafter, we investigated whether these compounds could also confer protection against UV. In that case, we did not observe such an effect since only the PG from *S. cerevisiae* gave a marginal protection (Figure 4). This distinction between the two inactivation modes could reflect the mechanisms involved. Whereas chlorine damages the viral structure by oxidizing firstly the capsid proteins, low pressure UV radiations induce mostly genomic damages [33]. We can assume that the protective effects are driven by interactions between the virus capsid and microbial compounds.

The impact of natural organic matter on efficiency of inactivation treatments has already been described. Haas and his collaborators investigated the effectiveness of various oxidizing agents on the elimination of microbes in natural waters [34] and showed that water quality influenced disinfection effectiveness by reducing the quantity of reactive agents [35]. In our study, protection was also observed against heating and with a residual free chlorine, suggesting that the phenomenon was

not the result of the diminution of the inactivating agent, but was rather induced by the stabilization of the capsids.

The direct stabilization hypothesis relies on a close interaction between polysaccharides and viral particles. To test this hypothesis, we performed microscopic observations which showed that viruses aggregated around microbial compounds (Figure 6, B and C). These direct interactions involving viruses and polysaccharides were probably responsible for the stabilization of the particle and protection against inactivation treatments. Almand *et al.*have also observed such interactions with living bacterial cells [24]. However, the molecular mechanisms are not fully known.

Other authors have shown that the amino acid in position 99 of VP1 protein of poliovirus, located in the BC loop, is crucial for promoting the interaction with LPS at temperatures below 40°C [26]. The underlying hypothesis is that the accessibility to the LPS binding-site depends on this amino acid and that the binding-site mechanically opens at higher temperatures. The four serotypes considered in this study have various polymorphisms at this position and more generally in the BC loop (Figure S3) and were all protected by LPS at 50°C. However, the protection with PGs was not systematic since PG from *S. cerevisiae* increased the thermal stability of all tested serotypes except CV-A21. This suggests the existence of specific requirements for heat stabilization by PG.

All these results emphasize the impact of usual water microbial contaminants when disinfection processes are performed. At the tested concentrations, microbial compounds provided substantial protections against treatments targeting the capsid, and more specifically to free chlorine, with up to 5-log of reduction in inactivation efficiency compared to purified viruses. This leads to the idea that the assessment of virus reduction usually performed in pure or clean water (such as molecular grade water) may overestimate the actual efficiency of disinfection in DWTP. We must add that even though we observed this protection at concentrations that are likely higher than in water resources or drinking water networks, local conditions (i.e. inside biofilms, or other microorganisms such as amoeba) may lead to important concentrations of microbial compounds close to viruses.

Our results can help to understand the discrepancy between the predicted and observed treatment efficacies in DWTP. From an evolutionary point of view, human enteric virus interactions with other kingdoms of life and specifically with commensal bacteria of the human gut, could have resulted in selection pressure [36]. The protective effects reported in this study may illustrate such mechanism. Nevertheless, whatever the mechanisms of the interactions, their real impact on virus inactivation during drinking water production needs to be further investigated.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1. Model parameters for the thermal inactivation of viral particles.

	Bottom	Top	X50 (°C)	T_i (°C)
E30	-4.936	-0.3995	49.04	48.5
CV-A21	-5.282	-0.1145	44.46	44.4
CV-B5	-4.917	-0.08676	45.77	45.3
PV-1	-5.202	-0.0827	49.37	48.8

Fig. S1

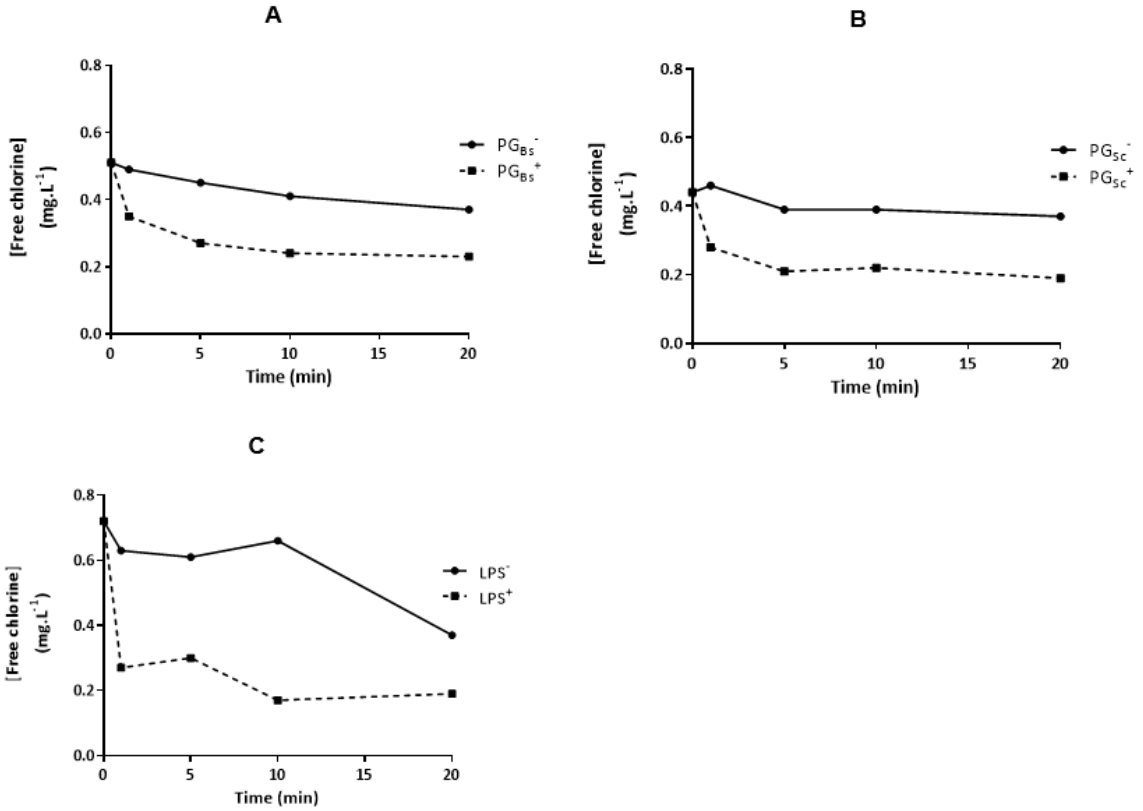


Figure S1. Free chlorine consumption kinetics in the presence of 1 mg/ml PG_{Bs} (A), PG_{Sc} (B) and LPS (C). The exposure time to free chlorine was adjusted in order to maintain a CT-value equal to 3 mg.min.L^{-1}.

Fig. S2

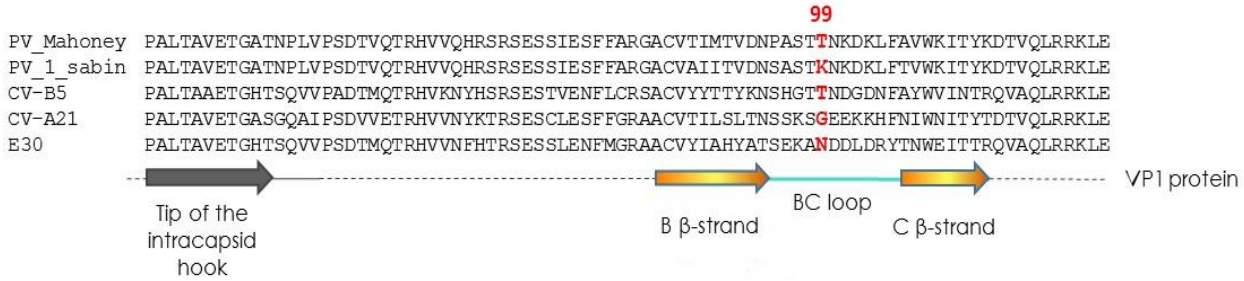


Figure S2. **Alignment of VP1 protein sequences suspected to be implicated in interaction with LPS.**

References

1. Lodder, W. J.; van den Berg, H. H.; Rutjes, S. A.; de Roda Husman, A. M., Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands. Appl Environ Microbiol 2010, 76, (17), 5965-71.
2. Prevost, B.; Lucas, F. S.; Goncalves, A.; Richard, F.; Moulin, L.; Wurtzer, S., Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. Environ Int 2015, 79, 42-50.
3. Prevost, B.; Lucas, F. S.; Ambert-Balay, K.; Pothier, P.; Moulin, L.; Wurtzer, S., Deciphering the Diversities of Astroviruses and Noroviruses in Wastewater Treatment Plant Effluents by a High-Throughput Sequencing Method. Appl Environ Microbiol 2015, 81, (20), 7215-22.
4. Aw, T. G.; Gin, K. Y.; Ean Oon, L. L.; Chen, E. X.; Woo, C. H., Prevalence and genotypes of human noroviruses in tropical urban surface waters and clinical samples in Singapore. Appl Environ Microbiol 2009, 75, (15), 4984-92.
5. Iwai, M.; Hasegawa, S.; Obara, M.; Nakamura, K.; Horimoto, E.; Takizawa, T.; Kurata, T.; Sogen, S.; Shiraki, K., Continuous presence of noroviruses and sapoviruses in raw sewage reflects infections among inhabitants of Toyama, Japan (2006 to 2008). Appl Environ Microbiol 2009, 75, (5), 1264-70.
6. Foliguet, J., Virus et eaux - évolution des idées. Questions en suspens. Techn. Sci. Munic. Eau 1983, 78, 3-9.
7. Foliguet, J.; Doncoeur , F., Elimination des enterovirus au cours du traitement des eaux d'alimentation par coagulation-floculation-filtration. Water Research 1975, 9, (11), 953-961.
8. Hijnen, W. A.; Beerendonk, E. F.; Medema, G. J., Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. Water Res 2006, 40, (1), 3-22.
9. Gerba, C. P.; Gramos, D. M.; Nwachuku, N., Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. Appl Environ Microbiol 2002, 68, (10), 5167-9.
10. Shin, G.; Linden, K.; Sobsey, M., Low pressure ultraviolet inactivation of pathogenic enteric viruses and bacteriophages. Journal of Environmental Engineering and Science 2005, 4, (Supplement 1), S7-S11.
11. Beer, K. D.; Gargano, J. W.; Roberts, V. A.; Hill, V. R.; Garrison, L. E.; Kutty, P. K.; Hilborn, E. D.; Wade, T. J.; Fullerton, K. E.; Yoder, J. S., Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water - United States, 2011-2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2015, 64, (31), 842-8.

12. Braeye, T.; K, D. E. S.; Wollants, E.; van Ranst, M.; Verhaegen, J., A large community outbreak of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010. Epidemiol Infect 2015, 143, (4), 711-9.
13. Sezen, F.; Aval, E.; Agkurt, T.; Yilmaz, S.; Temel, F.; Gulesen, R.; Korukluoglu, G.; Sucakli, M. B.; Torunoglu, M. A.; Zhu, B. P., A large multi-pathogen gastroenteritis outbreak caused by drinking contaminated water from antique neighbourhood fountains, Erzurum city, Turkey, December 2012. Epidemiol Infect 2015, 143, (4), 704-10.
14. van Alphen, L. B.; Dorleans, F.; Schultz, A. C.; Fonager, J.; Ethelberg, S.; Dalgaard, C.; Adelhardt, M.; Engberg, J. H.; Fischer, T. K.; Lassen, S. G., The application of new molecular methods in the investigation of a waterborne outbreak of norovirus in Denmark, 2012. PLoS One 2014, 9, (9), e105053.
15. Altzibar, J. M.; Zigorraga, C.; Rodriguez, R.; Leturia, N.; Garmendia, A.; Rodriguez, A.; Alkorta, M.; Arriola, L., Outbreak of acute gastroenteritis caused by contamination of drinking water in a factory, the Basque Country. J Water Health 2015, 13, (1), 168-73.
16. Ruchusatsawat, K.; Wongpiyabovorn, J.; Kawidam, C.; Thiemsing, L.; Sangkitporn, S.; Yoshizaki, S.; Tatsumi, M.; Takeda, N.; Ishii, K., An Outbreak of Acute Hepatitis Caused by Genotype IB Hepatitis A Viruses Contaminating the Water Supply in Thailand. Intervirology 2016, 59, (4), 197-203.
17. Fauvel, B.; Ogorzaly, L.; Cauchie, H. M.; Gantzer, C., Interactions of infectious F-specific RNA bacteriophages with suspended matter and sediment: Towards an understanding of FRNAPH distribution in a river water system. Sci Total Environ 2017, 574, 960-968.
18. Young, D. C.; Sharp, D. G., Poliovirus aggregates and their survival in water. Appl Environ Microbiol 1977, 33, (1), 168-77.
19. Gassilloud, B.; Gantzer, C., Adhesion-aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. Appl Environ Microbiol 2005, 71, (2), 912-20.
20. Bettarel, Y.; Motegi, C.; Weinbauer, M. G.; Mari, X., Colonization and release processes of viruses and prokaryotes on artificial marine macroaggregates. FEMS Microbiol Lett 2016, 363, (1), fnv216.
21. Weinbauer, M. G.; Bettarel, Y.; Cattaneo, R.; Luef, B.; Maier, C.; Motegi, C.; Peduzzi, P.; Mari, X., Viral ecology of organic and inorganic particles in aquatic systems: avenues for further research. Aquat Microb Ecol 2009, 57, (3), 321-341.
22. Gerba, C. P.; Schaiberger, G. E., Effect of particulates on virus survival in seawater. J Water Pollut Control Fed 1975, 47, (1), 93-103.
23. Templeton, M.; Andrews, R.; Hofmann, R., Particle-Associated Viruses in Water: Impacts on Disinfection Processes. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 2008, 38, (3), 137-164.
24. Almand, E. A.; Moore, M. D.; Outlaw, J.; Jaykus, L. A., Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota. PLoS One 2017, 12, (3), e0173124.
25. Kuss, S. K.; Best, G. T.; Etheredge, C. A.; Pruijssers, A. J.; Frierson, J. M.; Hooper, L. V.; Dermody, T. S.; Pfeiffer, J. K., Intestinal microbiota promote enteric virus replication and systemic pathogenesis. Science 2011, 334, (6053), 249-52.
26. Robinson, C. M.; Jesudhasan, P. R.; Pfeiffer, J. K., Bacterial lipopolysaccharide binding enhances virion stability and promotes environmental fitness of an enteric virus. Cell Host Microbe 2014, 15, (1), 36-46.
27. Kane, M.; Case, L. K.; Kopaskie, K.; Kozlova, A.; MacDearmid, C.; Chervonsky, A. V.; Golovkina, T. V., Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. Science 2011, 334, (6053), 245-9.

28. Hierholzer, J.; Killington, R., Virus isolation and quantitation. Virology Methods Manual 1996, 25-46.
29. Brie, A.; Bertrand, I.; Meo, M.; Boudaud, N.; Gantzer, C., The Effect of Heat on the Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2. Food Environ Virol 2016, 8, (4), 251-261.
30. Kissmann, J.; Ausar, S. F.; Foubert, T. R.; Brock, J.; Switzer, M. H.; Detzi, E. J.; Vedvick, T. S.; Middaugh, C. R., Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. J Pharm Sci 2008, 97, (10), 4208-18.
31. Rayaprolu, V.; Kruse, S.; Kant, R.; Movahed, N.; Brooke, D.; Bothner, B., Fluorometric Estimation of Viral Thermal Stability. Bio Protoc 2014, 4, (15).
32. Walter, T. S.; Ren, J.; Tuthill, T. J.; Rowlands, D. J.; Stuart, D. I.; Fry, E. E., A plate-based high-throughput assay for virus stability and vaccine formulation. J Virol Methods 2012, 185, (1), 166-70.
33. Mayer, B. K.; Yang, Y.; Gerrity, D. W.; Abbaszadegan, M., The Impact of Capsid Proteins on Virus Removal and Inactivation During Water Treatment Processes. Microbiol Insights 2015, 8, (Suppl 2), 15-28.
34. Haas, C.; Joffe, J.; Anmangandla, U.; Jacangelo, J.; Heath, M., Water quality and disinfection kinetics. American Water Works Association 1996, 88, (3), 95-103.
35. Kahler, A. M.; Cromeans, T. L.; Roberts, J. M.; Hill, V. R., Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. Appl Environ Microbiol 2010, 76, (15), 5159-64.
36. Li, D.; Breiman, A.; le Pendu, J.; Uyttendaele, M., Binding to histo-blood group antigen-expressing bacteria protects human norovirus from acute heat stress. Front Microbiol 2015, 6, 659.

Conclusion du chapitre 1

Ce premier chapitre a tout d'abord permis de montrer que des entérovirus peuvent s'associer physiquement à des polymères constitutifs de la paroi des micro-organismes, et que ces interactions leurs confèrent une protection conséquente de plusieurs log d'infectivité - vis-à-vis de l'inactivation thermique et de la chloration. Ces deux modes d'inactivation agissent sur les capsides virales : le premier en déstabilisant la structure et le second en altérant entre autres des motifs en surface des capsides nécessaires à la liaison aux cellules cibles et au maintien de la structure de la particule. Ces composés permettent donc tout d'abord de stabiliser les capsides lors d'une élévation de température, ce qui a été confirmé par la mise en place d'une évaluation de l'accessibilité du génome. À l'aide de cette approche expérimentale, le LPS a en effet permis de d'augmenter d'environ six degrés la température d'initiation de déstabilisation du coxsackievirus B5. Ensuite les composés microbiens confèrent une protection de capsides face au chlore libre actif. Aucun effet protecteur comparable n'a été observé dans le cadre de la désinfection par traitement UV_{254}, ce qui est en cohérence avec le mode d'action des UV_{254} qui provoquent majoritairement des dommages aux génomes viraux.

L'étude a de plus mis en évidence des différences d'effet protecteur et donc d'interaction dépendant conjointement du sérotype viral et de l'origine du polymère microbien. En effet, l'un des PG stabilisant trois sérotypes d'entérovirus n'a pourtant montré aucun effet protecteur sur le coxsackievirus A21, lui-même stabilisé par les deux autres composés. Ainsi, les interactions présentent une certaine spécificité qui n'est pas partagée par tous les sérotypes d'entérovirus. Cette observation suggère que les interactions entre les entérovirus et les polymères microbiens ne résulteraient pas uniquement de leurs caractéristiques physico-chimiques globales, mais qu'elles seraient dans une certaine mesure médiée par des motifs spécifiques des polymères et des capsides.

Les résultats ont apporté la preuve de concept que des composants bactériens stabilisent et protègent les capsides virales. Dans les conditions expérimentales appliquées les composés bactériens ont conféré une protection à partir de 0,05 mg/mL, mais la complexité à estimer leur masse moléculaire précise n'a pas permis d'évaluer la correspondance en termes de proportions stœchiométriques de particules et molécules. On sait néanmoins grâce aux observations par microscopie que plusieurs virus se lient à une structure filamentaire de LPS ou une enveloppe de PG.

Pour conclure, la stabilisation des virus par les composants bactériens apporte de nouveaux éléments de réflexion sur deux aspects concernant l'évaluation et la gestion du risque viral. D'une part, les abattements viraux pourraient être largement surestimés dans le cas de désinfection d'eaux chargées en micro-organismes et en matières organiques. Ce fait devrait être notamment considéré dans le cadre de la désinfection et réutilisation des eaux usées. D'autre part, les virus associés à des

molécules stabilisatrices seraient capables de persister particulièrement longtemps dans l'environnement, et donc d'être disséminés loin de leur point initial de contamination.

Chapitre 2 : Effet de la matière organique dissoute sur la persistance virale

Introduction

Depuis l'isolement et l'observation des différents virus entériques au cours de la seconde moitié du siècle dernier, de nombreuses études ont été conduites pour évaluer leur résistance à la chaleur et déterminer les températures permettant d'atteindre des valeurs cibles d'abattement. Les inactivations thermiques sont utilisées dans le domaine agro-alimentaire, mais non comme traitement de désinfection de l'eau. En revanche, l'inactivation par la chaleur a souvent été utilisée pour mimer une inactivation naturelle accélérée. Ces données renseignent sur la stabilité des capsides, et donc indirectement sur les capacités de persistance des virus. De fait, la température est considérée comme le principal facteur responsable de leur inactivation dans l'environnement. La stabilité des virus vis-à-vis de la chaleur est modulée par des paramètres tels que le pH, dont les valeurs extrêmes accélèrent la dénaturation des protéines de capsides, ou encore la force ionique. Les conséquences de la composition des matrices alimentaires complexes sur l'abattement viral ont été suffisamment documentées pour démontrer qu'une teneur élevée en nutriments de nature lipidique ou saccharidique peut dans certaines conditions diminuer l'efficacité des traitements thermiques. Par comparaison, peu de travaux ont analysé de façon approfondie l'effet de matières organiques sur la persistance ou l'inactivation thermique des virus dans les matrices hydriques environnementales.

La matière organique désigne l'ensemble des composés hydrocarbonés d'un écosystème. Elle existe sous forme dissoute ou particulaire. La forme dissoute est communément distinguée de la forme particulaire par une filtration de 0,45 µm, mais cette distinction repose avant tout sur un critère de séparation expérimental. Les eaux de surface contiennent une variété extrêmement importante de matières organiques particulaires (micro-organismes, débris végétaux) ou dissoutes (molécules d'origine anthropique, métabolites et produits de dégradation, acides organiques). Il en résulte une importante diversité de propriétés physico-chimiques. Du fait de la complexité de la matière organique il serait inenvisageable d'essayer d'identifier précisément les potentiels composés pouvant impacter la stabilité virale. Les composants peuvent en revanche être séparés en différents groupes selon des critères physico-chimiques. Le chapitre précédent a démontré que certains composés organiques microbiens stabilisent les capsides virales à des températures induisant normalement leur déstructuration.

Cette étude s'est intéressée à l'effet de la matière organique présente dans les eaux de surface sur l'inactivation thermique, simulant les effets naturels sur la persistance virale. Différentes

méthodes ont permis de fractionner les matières particulaires et dissoutes présentent dans des échantillons d'eau de rivière prélevés en milieu urbain. Les effets protecteur d'infectivité et stabilisateur de la capside de ces fractions ont été étudiés sur un entérovirus, le coxsackievirus B5. Cette étude apporte notamment de nouveaux éléments sur la nature et la persistance des interactions mettant en jeu les virus et la matière organique naturelle dissoute. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article publié dans le journal *Food and Environmental Virology*.

Article publié dans *Food and Environmental Virology*

Hydrophobic organic matter promotes Coxsackievirus B5 stabilization and protection from heat

P. Waldman[1], F.S. Lucas[1], G. Varrault[1], L. Moulin[2*] and S. Wurtzer[2]

[1] Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains (LEESU UMR MA 102), Faculté des Sciences et Technologie, Université Paris-Est, 61 avenue du Général de Gaulle, 94000 Créteil, France

[2] Eau de Paris, DRDQE, 33 Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry sur Seine, France

*Corresponding author: laurent.moulin@eaudeparis.fr

ABSTRACT

In urban rivers, many of which are used for drinking water production, viruses encounter a range of particulate, colloidal and dissolved organic and inorganic compounds. To date, the impact of environmental organic matter on virus persistence in the environment has received little attention. In the present study, fresh water was fractioned to separate particulate natural organic matter from dissolved forms. Each fraction was tested for its ability to promote coxsackievirus B5 resistance to heat inactivation. Our results demonstrate that, at natural concentrations, environmental waters contain particulate or dissolved compounds that are able to protect viruses from heat. We also show that hydrophobic compounds promote an efficient protection against heat inactivation. This study suggests that local conditions encountered by viruses in the environment could greatly impact their persistence.

Keywords

Viruses, stability, persistence, organic matter, hydrophobic interactions

INTRODUCTION

Human enteric viruses encompass a wide variety of viruses that share several properties and constitute a risk of acute gastroenteritis (AGE) associated with the ingestion of contaminated water. Water can be a source of disease outbreaks either directly via recreational activities and drinking water (Maunula et al. 2005; Sinclair et al. 2009) or indirectly via consumption of vegetables contaminated during irrigation, washing or handling. Viral outbreaks resulting from recreation or drinking water contamination are generally underestimated due to the difficulty of reporting sporadic AGE cases and the lack of systematic identification of the etiological agent. In addition, because of low virus concentrations in water and methodological difficulties for detecting such viruses (virus concentration from large volume, cultivation for evaluating infectivity when possible, limits of molecular methods), the risk to public health is often not taken into consideration. Nevertheless, recent work has shown that human enteric viruses are frequently detected in environmental surface waters that are impacted by wastewater effluents and used for drinking water production or for recreational activities (Farkas et al. 2018; Kiulia et al. 2010; Prevost et al. 2015). Released viruses can persist in water for long periods of time (up to several months or years) and infectious viruses can spread over long distances from their emission source (Fauvel et al. 2017; Gerba et al. 2018).

Temperature is considered as the major factor for determining virus inactivation in the environment (Bertrand et al. 2012), and sunlight UV can also affect virus persistence (Wommack et al. 1996). Heat inactivation of viruses is commonly used for studying the fate of viruses in water. Numerous studies have evaluated the rate of virus inactivation after heat exposure within a range from 0°C to 100°C and in different matrices. The synthesis of Bertrand et al. (2012) used a statistical analysis to develop a predictive tool for virus inactivation after heat exposure. The linearity of heat inactivation observed in low temperature range ($<$ 50°C) was different from that observed in high temperature range ($\geq$ 50°C), suggesting that different inactivation mechanisms are involved. A drastic increase of inactivation after exposure to temperatures above 50°C for poliovirus, hepatitis A virus or various bacteriophages was observed. In addition, water quality impacts inactivation. In the lower temperature range (< 50°C), virus inactivation due to temperature occurred regardless of the matrix. In contrast, in the higher temperature range ($\geq$ 50°C) the degree of inactivation was higher in “simple matrices” (like culture media or drinking water) than in “complex matrices” (sewage or fresh water), suggesting a temperature-matrix interaction. However, very few data are available for virus inactivation above 50°C probably because the mechanisms involved in inactivation process are multiple and thus more complex to describe. Brié et al. (2016) noticed a transient exposition of hydrophobic domains of remaining infectious MS2 phage particles after a 60°C heat treatment, and

observed an irreversible capsid disruption at 72°C. Similar modifications of murine norovirus capsid were shown at 55°C (Brié et al. 2017), and a significant increase of poliovirus particles hydrophobicity was also observed after heating at 50°C (Curry et al. 1996; Fricks et Hogle 1990).

The water quality plays a significant part in virus persistence. Virus aggregation involving virus-virus interactions and virus association with organic matter or sediment are two possible mechanisms increasing virus persistence (Thurston-Enriquez et al. 2003). Indeed the formation of viral aggregates, depending on the virus type due to their specific hydrophobicity and electric charge, has been reported to increase viral persistence in the environment and even to improve their resistance to free chlorine disinfection (Gerba et Betancourt 2017; Kahler et al. 2016). The presence of particulate organic matter, including other micro-organisms, can also influence virus persistence. For example several studies have reported the presence of infectious coxsackievirus or adenovirus inside free-living amoeba (Atanasova et al. 2018; Maisonneuve et al. 2017; Mattana et al. 2006; Verani et al. 2016). Additionally, recent work has described interactions between enteric viruses and bacteria, making the viruses more resistant to various stressors. Berger et al. (2017) reported the enhancement of human reoviruses thermostability (at 37°C) by direct interactions with bacteria. Norovirus binds to enteric bacteria through histo-blood group antigen-like substances (Almand et al. 2017; Miura et al. 2013a) and these specific interactions can protect norovirus from acute heat stress (90°C)(Li et al. 2015). Robinson et al. (2014) observed that lipopolysaccharides and peptidoglycans originating from bacteria promote poliovirus infection and resistance to heat (42°C). We previously reported that purified microbial compounds (lipopolysaccharide and peptidoglycan) protect different enteroviruses serotypes from inactivation by heat (50°C) and free chlorine (Waldman et al. 2017). So far, all the studies mentioned have focused on specific bacteria strains or purified bacterial compounds, which are organic in nature. To our knowledge, data is lacking on the impact of complex dissolved organic matter from urban surface waters on virus persistence.

The present study aims at (*i*) investigating whether interactions between virus and natural organic matter (NOM) could also be established in urban river waters; (*ii*) studying more specifically the interactions with the dissolved organic matter; (*iii*) confirming the nature of the interactions using additional purified compounds, some of which are naturally found in the environment; and (iv) finally examining whether such interactions could improve the virus persistence when exposed to heat. To this end, we studied the thermal stabilization of a model enterovirus, CV-B5, after exposure to different fractions of particulate matter, dissolved natural organic matter (DNOM) purified from river waters and commercially available organic compounds. To evaluate the protective effect, two approaches were used: the measurement of the remaining infectivity after inactivation at 50°C (temperature already shown to drastically decrease virus infectivity and capsid integrity) (Waldman

et al. 2017), and the particle stability thermal release assay (PaSTRy) consisting in monitoring the capsid disruption of virus particles during heat exposure.

MATERIALS AND METHODS

Virus stock preparation

Coxsackievirus B5 (CV-B5) was cultivated on confluent monolayer cultures of Buffalo Green Monkey Kidney (BGMK) cells at 37°C with 5% CO_2. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose medium (Dutscher, #L0103) supplemented with 2% fetal bovine serum (PanBiotech, #3301-P113103), non-essential amino acids (Dutscher, #X0557), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (PanBiotech, #P06-07100). The supernatant was clarified by centrifugation at 2,000 *x g* for 15 min, then ultracentrifuged at 150,000 *x g* at 4 °C for 2 hours through a 40 % sucrose cushion. The pellet was resuspended in 1x phosphate-buffered saline (PBS) (1.5 mM KH_2PO_4, 2.7 mM NaH_2PO_4, 155 mM NaCl, pH 7.4) and concentrated on Vivaspin 20 centrifugal concentrators (10,000 MWCO) (Sartorius). Further purification was performed by ultracentrifugation on cesium chloride gradient at 100,000 *x g* for 18 hours. The fraction containing the viruses was desalted with Vivaspin 20 concentrators (10,000 MWCO). Viruses were stored at - 80 °C before using.

Virus quantification by endpoint dilution assay

Infectious viruses were titrated by standard 10-fold dilutions in 96-well plates on BGMK cells (10^4 cells per well), with twelve replicates per dilution level. After a 6-day incubation (time for visualizing cytopathic effects), supernatants were discarded, and cells were fixed with 0.1 M HCl for 5 min. The HCl solution was removed, cells were stained with a 4 g/L crystal violet solution for 10 min and finally rinsed with deionized water. Positive wells were counted, and viral titer was estimated using the Spearman-Kärber method. The results are expressed as 50% tissue culture infective dose ($TCID_{50}$) per ml.

Incubation with organic samples

The heat inactivation was preceded by 2hours, 24 hours or 9 days of incubation with organic matter or an equal volume of 1x PBS pH 7.4 at room temperature. The organic samples considered in this study include:

(i) Commercially available organic compounds.

Most commercial compounds originated from plants or microorganisms. Some of them were selected because they were described as biofilms components (Mann et Wozniak 2012) and are likely

present in rivers. They are listed in Supplementary Data 1. Each one was suspended in ultrapure water at a concentration of 10 mg/ml before using and tested at a final concentration of 1 mg/ml.

(ii) Fresh river water fractions of different density.

Fractions from fresh river water were obtained by differential centrifugation of samples collected from the Seine River (Paris area, France). To that end, 500 mL of the Seine River was sampled and immediately settled for 30 min, before being sequentially centrifuged for 15 min at 100 *x g*, 1,000 *x g* and 6,000 *x g*. Each of the three pellets was suspended in 50 mL PBS, and the last supernatant was filtered on a Vivacell concentrator (Sartorius) to keep the molecules higher than 100 KDa. In the present study, we refer to as “particulate” the fraction either sedimentable or that can be pelleted by centrifugation, and “dissolved” the non sedimentable fraction, including colloidal matter.

(iii) Dissolved natural organic matter (DNOM) purified from river waters.

The DNOMs originated from urban river waters of the Parisian area (Pernet-Coudrier et al., 2011). They were purified based on their hydrophobic and hydrophilic properties on non-polar resins as detailed by Pernet-Coudrier et al. (2011). Two samples of environmental organic matter (from the Seine and the Marne Rivers, collected in the cities of Méricourt (1) and Méry-sur-Marne (2)) were fractionated in three parts: hydrophilic (HPI), transphilic (TPI) and hydrophobic (HPO). To dissolve each fraction, 5 mg/ml solutions were prepared in ultrapure water and the pH was adjusted to 7.5 with 0.1 M NaOH. One HPO fraction was fractionated based on the molecular weight. To that end 10 ml of solution was sequentially concentrated with 30,000 MWCO and 10,000 MWCO Vivaspin 20 centrifugal concentrators (Sartorius). The fraction lower than 10 kDa was collected and the two concentrates (higher than 30 kDa and between 10 and 30 kDa) were adjusted to 10 mL with ultrapure water (pH 7.5).

Heat exposure

Virus suspensions were prepared to a final concentration of about 10^6 $TCID_{50}$/ml in 1x PBS pH 7.4. Experiments were performed in 96-well plates (50 µl per reaction) using a thermal cycler (Eppendorf) as a highly precise incubator. The samples were incubated for 1 hour at 50°C and transferred immediately on ice to prevent further inactivation.

Particle stability thermal release assay (PaSTRy)

PaSTRy was used to estimate the thermal stability of viral capsids after a 2-hour incubation with DNOMs at 0.5 mg/ml, following Waldman et al. (2017). The viruses were gradually heated in the presence of SYBR Green II (Molecular Probe, Life Technologies) while collecting fluorescence data. As

the temperature increased, capsids became permeable, RNA genomes became accessible to the dye and the emission of fluorescence was recorded. The experiments were performed with a ViiA 7 real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA) in 96-well plates with 20 µl reaction volume. A working stock of 200x SyBR green II was produced by dilution in 1x PBS pH 7.4 and stored at -20°C. SyBR green II was used at final concentration of 10x by mixing 1 µl of working stock with 19 µl of virus suspension at a concentration of 10^{11} $TCID_{50}$/mL in PBS. The experiments were ramped from 22°C to 95°C at a scan rate of 0.05°C/s and taking a fluorescence reading every 0.05°C.

Dissolved natural organic matter characterization

Several analyses were performed to characterize the fractionated hydrophobic DNOM. Total organic carbon was measured with a Shimadzu TOC-V WS analyzer. Before analysis the samples were acidified to pH<2 with 85% H_3PO_4. Specific UV absorbance was determined by dividing the UV absorbance determined at 254 nm by the organic carbon content. UV absorbance was determined with a Secomam UviLine 9400 spectrophotometer. Samples were also examined by excitation−emission matrix (EEM) fluorescence spectroscopy. This technique consists in scanning a water sample over a range of excitation and emission wavelengths to produce three-dimensional matrix. Fluorescence EEMs were measured in a 1 cm quartz cuvette using an Agilent Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer. Fluorescence EEMs were measured for excitation wavelengths of 220-400 nm with 5 nm increments and emission range of 280-580 nm with 2 nm increments. The samples were placed in a water bath at 23°C at least one hour before analysis. Blank samples consisted in MilliQ water. Raman and Rayleigh scatter regions were removed prior to further analysis. Three fluorescence regions linked to humic-like, fulvic-like and protein-like fluorescences were identified (Bieroza et al. 2010; Stedmon et al. 2003).

RESULTS

Effect of fresh river water fractions on CV-B5 stability

To investigate whether natural aquatic environments contain some elements able to promote virus stability, four fractions originating from river water were separated by differential centrifugation and incubated for 2h with CV-B5 before a 1-hour inactivation at 50 °C (**Figure 1**). The absence of infectious virus in the raw fractions (non-spiked and non-heated) was checked beforehand (data not shown). In the control condition represented by CV-B5 incubated with PBS only, heat exposure inactivated all infectious particles, corresponding to a reduction of infectivity by at least 5.8-log. Comparing the remaining infectivity after heating and the infectivity at 25°C, the log reduction values were 6.3-log in the 100 x *g* fraction, 3.1-log the 1000 x *g* fraction, 5.8-log with the

6000 x *g* fraction and 1.1-log in the remaining dissolved fraction > 100 kDa. After heat treatment, $7.6x10^3$ and $1.4x10^6$ $TCID_{50}$/mL infectious particles were titrated in the samples respectively incubated with the 1000 x *g* fraction and the unsedimentable/dissolved fraction superior to 100 kDa, compared, with none in the control. Thus, in our experimental conditions, these two extracts from river water conferred to CV-B5 a protection against the thermal inactivation.

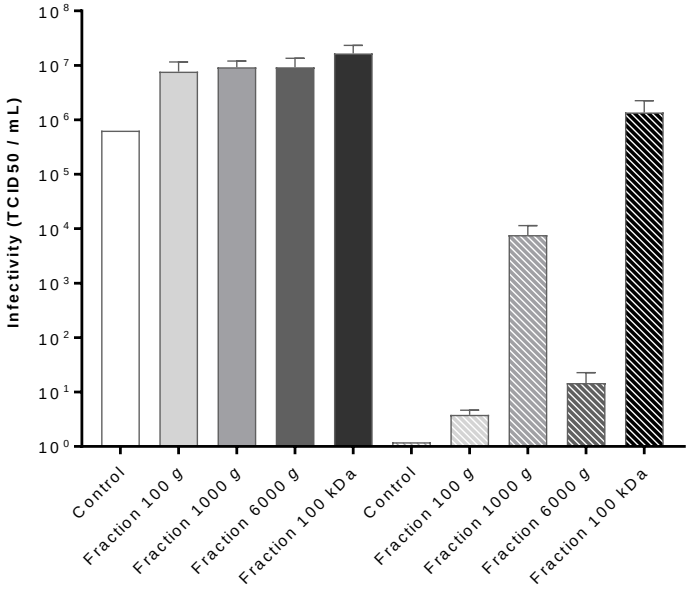


Figure 1: Thermal stabilization of CV-B5 by river water extracts. Virus infectivity was measured by cell culture after incubation for 1 h at 25°C (solid bar) and 50°C (hatched bars) in the presence of PBS (control) or four river water extracts. The error bars represent the standard deviation of one representative experiment given by the Spearman and Kärber algorithm.

Effect of dissolved organic matters from river on CV-B5 stability

Role of the hydrophobicity

The protecting effect induced by the dissolved fraction was then examined in further details. For this purpose, the DNOM from several river water samples was extracted, fractionated and purified on nonpolar resins. This process allowed to separate the DNOM in three fractions: hydrophobic (HPO), transphilic (TPI) and hydrophilic (HPI). CV-B5 was incubated for 2h with each fraction normalized at a concentration of 1 mg/mL before heat inactivation for 1h at 50°C. The infectivity after heat inactivation in the presence of six different DNOM fractions originating from two distinct water samples was measured (**Figure 2A**). In the control condition as well as in the hydrophilic fractions, heat inactivation induced a 6-log reduction of infectivity and no remaining infectious particle was detected. In contrast, there was only 1 to 2-log reduction with the transphilic

fractions (1.3 and 1.7-log) and no significant reduction (0.6-log) was noticed with the hydrophobic fractions.

To confirm these observations with a complementary method, the particle stability thermal release assay (PaSTRy) that allows monitoring of capsid integrity of capsids (**Figure 3**). In the control condition, the peak of fluorescence was reached at 50°C reflecting the full disruption of capsid. The same pattern was registered with the hydrophilic DNOM. In contrast, in the presence of the transphilic and hydrophobic DNOMs, the peaks shifted toward higher temperatures at 56°C. Therefore, contrary to the hydrophilic fractions, the transphilic and hydrophobic fractions had a stabilizing effect on the capsid, in agreement with the virus infectivity assays.

Figure 2

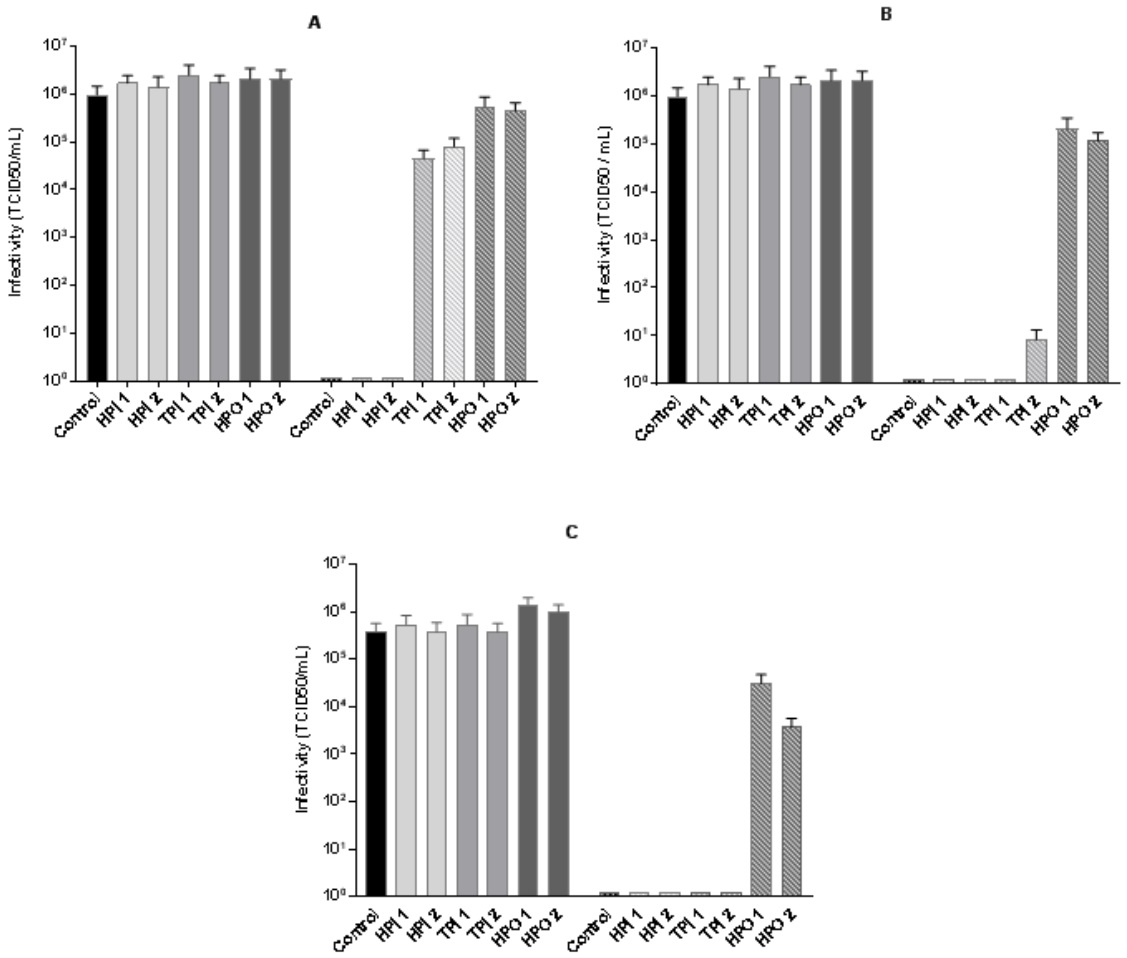


Figure 2: Thermal stabilization of CV-B5 by dissolved natural organic matters. Virus infectivity was measured by cell culture after incubation for 1 h at 25°C (solid bar) and 50°C (hatched bars) in ultrapure water (control) or in the presence of hydrophilic (HPI), transphilic (TPI) and hydrophobic (HPO) natural dissolved organic matters originating from two different river samples. The 50°C inactivation was performed after incubation for 2 h (**A**), 24 h (**B**) and 9 days (**C**). The error bars represent the standard deviation of one representative experiment given by the Spearman and Kärber algorithm. The experiments were performed at least in triplicate.

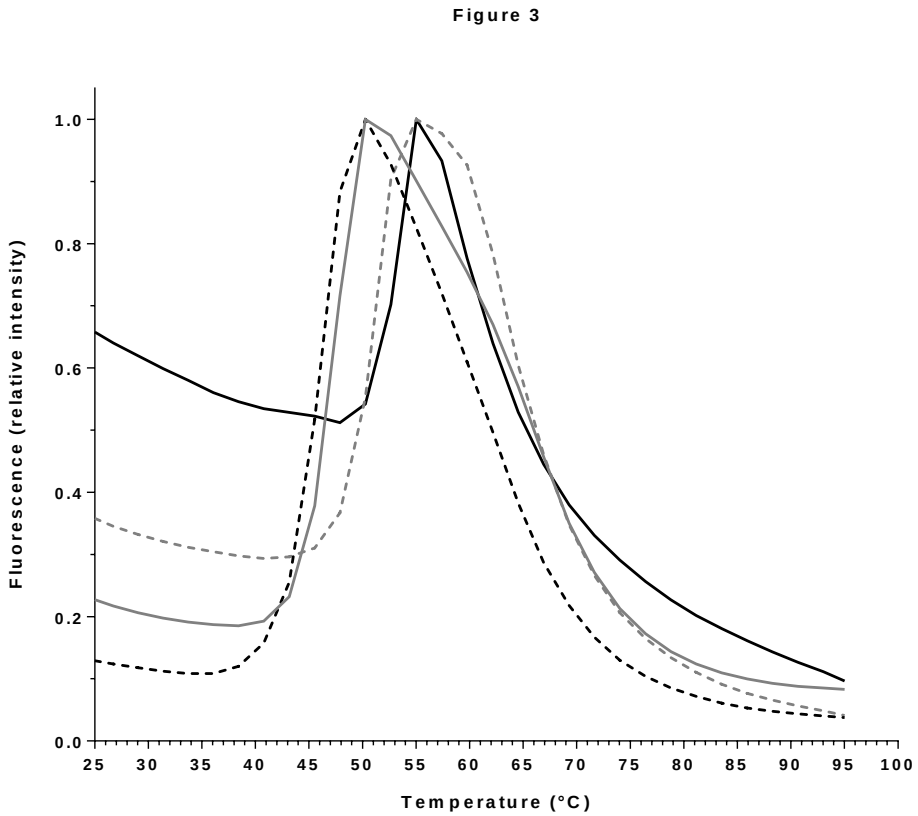


Figure 3: Particle stability thermal release assay (PaSTRy). The accessibility of CB-B5 RNA was monitored using SYBR green II in ultrapure water (black dotted line) or with 0.5mg/ml hydrophilic DNOM (grey), transphilic DNOM (grey dotted line) and hydrophobic DNOM (black). Three experiments at least were performed. The data shown are from one representative experiment.

Persistence of the protection

To evaluate the persistence of the interaction with the transphilic and hydrophobic DNOMs, the durability of the protective effect induced by these DNOMs was studied by prolonging the preincubation time to 24h before inactivation and titration (**Figure 2B**). No decrease in infectivity was noticed in the non-treated samples. However, contrary to the incubation of 2 hours, higher log reduction values were observed with the transphilic fractions (5.0 and 6.0-log). Nevertheless, the log reduction values with the hydrophobic fractions were still low (1.0 and 1.3-log). Finally, the incubation time was extended to nine days before heat inactivation (**Figure 2C**). While the inactivation was complete in the control condition and with hydrophilic and transphilic DNOM, infectious viruses were still recovered in the presence of the hydrophobic fractions, and the log reduction values slightly increased (1.7 and 2.4-log). To summarize, the protective effect conferred by the transphilic DNOM lasted less than 24h, whereas the protection by the hydrophobic DNOM was still observed after several days.

Role of the DNOM concentration

The impact of the DNOM concentration was also investigated. CV-B5 was incubated with 0.1 to 2 mg/mL hydrophobic DNOM before inactivation at 50°C for 1h and titration (**Figure 4**). The efficacy of protection depended clearly on the DNOM concentration, starting at 0.1 mg/mL with 1-log infectivity recovery after treatment, and reaching a maximum effect at 1 mg/mL with a full recovery of infectivity.

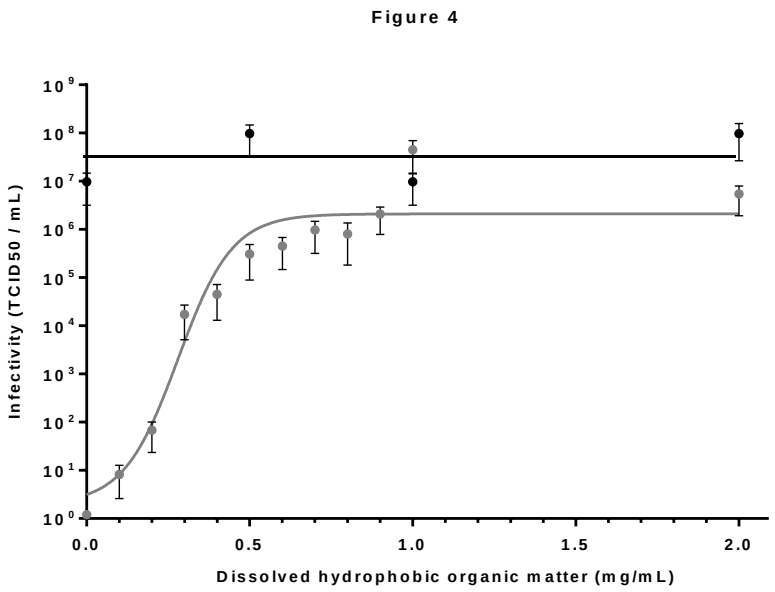


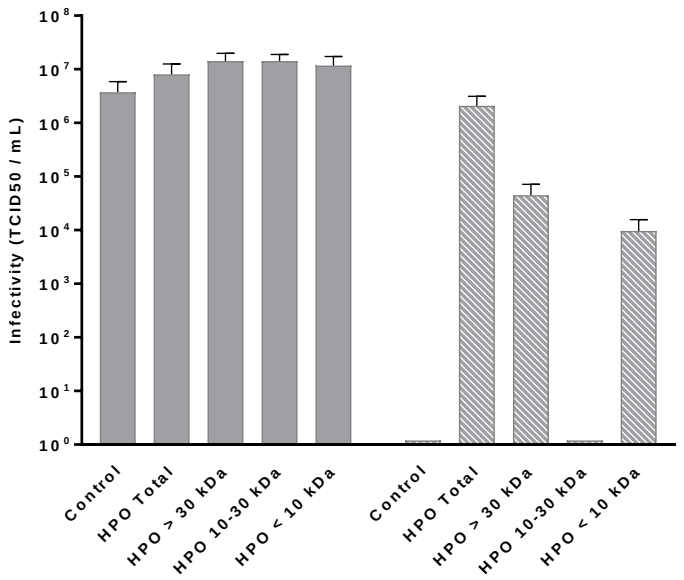
Figure 4: Concentration-dependent heat stabilization of CV-B5 by hydrophobic natural dissolved organic matter. The infectivity was measured by cell culture after incubation for 1h at 25°C (black) or 50°C (grey). The error bars represent the standard deviation of one representative experiment given by the Spearman and Kärber algorithm.

Focusing on the protection by the hydrophobic dissolved organic matter

To further understand the mechanism involved with hydrophobic DNOM, one HPO sample was fractionated into three separate fractions according to molecular weight by sequential ultrafiltration with successive exclusion limits of 30 kDa and 10 kDa. The three fractions were characterized by measuring the total organic carbon content, the specific ultraviolet absorbance and by spectrofluorometry. As previously described, they were tested for their ability to protect CV-B5 against a 1-hour inactivation at 50°C and to stabilize the capsid structure in the PaSTRy assay. The results are shown in the **Figure 5**.

Figure 5

A



B

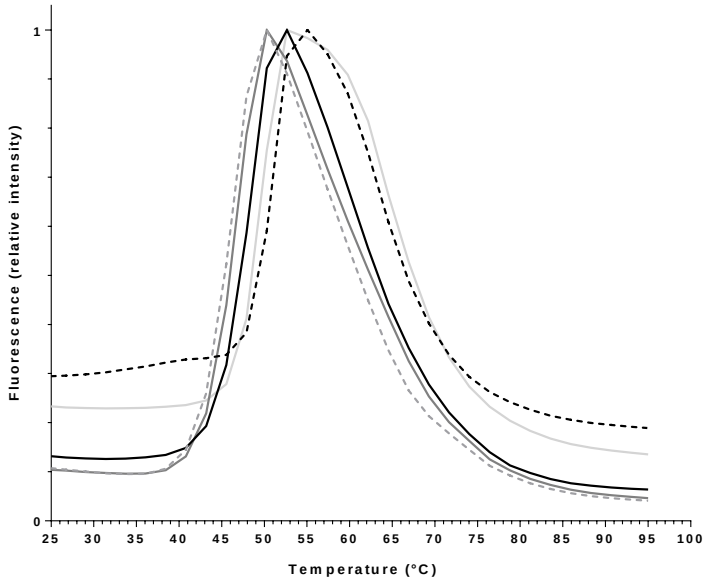


Figure 5: Thermal stabilization of CV-B5 by a fractionated hydrophobic DNOM. Virus infectivity was measured by cell culture after incubation for 1 h at 25°C (solid bar) and 50°C (hatched bars) in the presence of PBS (control) or four river water extracts. The error bars represent the standard deviation of one representative experiment given by the Spearman and Kärber algorithm (**A**). PaSTRy: The accessibility of CV-B5 RNA was monitored in ultrapure water (grey dotted line), with a total hydrophobic DNOM (black dotted line), the fraction lower

than 10 kDa (light grey line), the fraction 10-30 kDa (medium grey line) and the fraction higher than 30 kDa (black line).

With the fractions higher than 30 kDa and lower than 10 kDa, respectively 2.5 and 3.1-log reduction values were reached compared to 6.1-log in the control condition. The log reduction value with the 10-30 kDa fraction was similar to the control. The PaSTRy assay was in accordance with these observations, since the peaks corresponding to the incubation with the fractions higher than 30 kDa and lower than 10 kDa shifted to 53°C, which is an intermediary temperature between that of the control (50°C) and that obtained with the total HPO organic matter (56°C). The content of organic carbon in each condition is given in **Table 1**. Most of the carbon was recovered in the fraction lower than 10 kDa (0.3 mg/mL versus 0.43 mg/mL in the total solution), and a low concentration was found in the 10-30 kDa fraction (0.01 mg/ml). The fractions were also analyzed by fluorescence spectroscopy. The excitation-emission matrices are presented in the **Figure 6**. Three regions corresponding to humic-like, fulvic-like and protein-like fluorescences were identified. This method allows to compare the relative abundance of the three fluorescence regions in the different fractions. The corresponding intensities are given in **Table 2**. In the total HPO fraction, the humic-like region constituted most of the fluorescence (243 139 AU), followed by the fulvic-like region (78 996 AU) and the protein-like region (21 205 AU). The quantitative aspect was preserved since, for each fluorescence region, the sum of the intensities in the three fractions was close to that of the total HPO sample. Most of the humic-like (60 %), fulvic-like (65 %) and protein-like (49 %) fluorescences were in the fraction lower than 10 kDa. The 10-30 kDa fraction and the fraction higher than 30 kDa presented similar protein-like fluorescence profils. This result suggested that proteins may not be responsible for the protective effect.

Table 1: DNOM characterization. The total organic carbon values correspond to the experiment presented in **Figure 5.** A peak temperature higher than 50 °C (control) traduces a stabilizing effect.

Fraction	Total organic carbon (mgC/mL)	Specific UV absorbance ($m^{-1}.L.mgC^{-1}$)	Peak temperature in the PaSTRy assay (°C)
HPO total	0.43	2.9	56
HPO > 30 kDa	0.07	3.7	53
HPO 10-30 kDa	0.01	2.9	50
HPO < 10 kDa	0.30	2.4	53

Figure 6

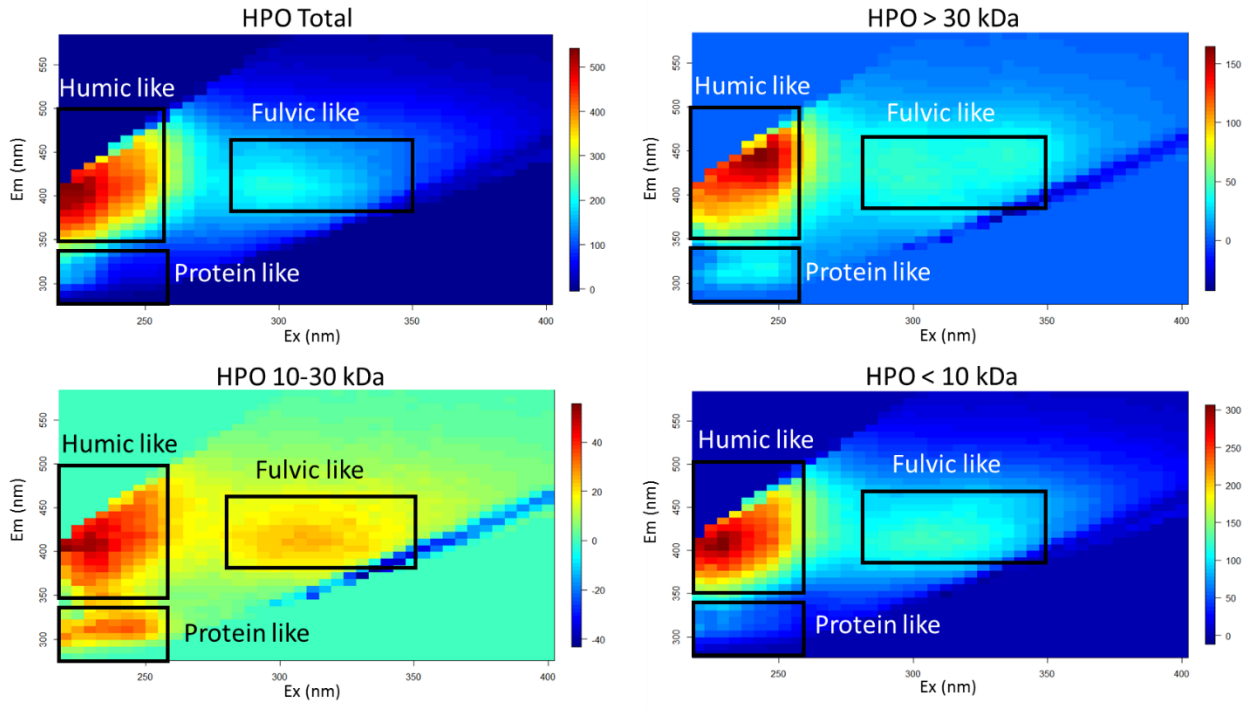


Figure 6: Fluorescence excitation-emission matrices of a raw hydrophobic DNOM (HPO Total) and the three resulting fractions. Three fluorescence regions are indicated by dark squares.

Table 2: Fluorescence intensities in the HPO fraction. Three regions were considered: Humic-like (ex: 220-260 nm, em: 350-500 nm), fulvic-like (ex: 280-350 nm, em: 390-460 nm), protein-like (ex: 220-260 nm, em: 290-340 nm). For each fluorescence region, the percentages refer to the distribution of the fluorescence in the three fractions.

	Fluorescence intensity (a.u.)		
	Humic-like	**Fulvic-like**	**Protein-like**
HPO total	243 139	78 996	21 205
HPO > 30 kDa	69 351 (31 %)	17 595 (23 %)	4 724 (24 %)
HPO 10-30 kDa	19 865 (9 %)	8 963 (12 %)	4 470 (22%)
HPO < 10 kDa	132 515 (60 %)	49 669 (65%)	10 821 (49 %)

Effect of commercial organic compounds on CV-B5 stability

DNOM composition is extremely variable depending on the sampling location and the sampling time. We also tested different commercial organic compounds, commonly identified in DNOM, for their ability to maintain the infectivity against heating or to stabilize the capsid: glycolipids, carbohydrates and derivatives, amino acids and derivatives, glycosaminoglycans and humic acids. They were incubated with CV-B5 for 2h at 1 mg/mL before the PaSTRy assay or heat inactivation for 1h at 50°C followed by titration. The results are presented in **Table 3**. Importantly, some of them generated a background signal preventing the interpretation of the PaSTRy assay. The three glycolipids tested, i.e. lipopolysaccharides from *Pseudomonas* or *Klebsiella* and rhamnolipids, induced a protection to heat ranging from 4 to 6-log compared to the control. The capsid stabilization effect was also observed in the PaSTRy assay with LPS from *Pseudomonas,* but a too high fluorescent background made the signal uninterpretable with the two others. Among the carbohydrates and derivatives tested, a protection of infectivity was only observed with peptidoglycan, but the β-glucan and the polygalacturonic acid induced a capsid stabilization in the PaSTRy assay with a peak 2°C-higher than the control. The amino acids and derivatives and glycosaminoglycans tested did not show any protective effect or capsid stabilization. Conversely, polylysine induced a destabilization of capsid, since the peak of fluorescence was 10°C lower than the control. No protective effect was noticed with the commercial humic acids. Fluorescence spectroscopy measurements showed a pattern different to the humic-like fluorescence of the environmental HPO fractions tested previously (Supplementary Data 2).

Table 3: Effect of organic compounds on CV-B5 thermal stability. CV-B5 was incubated with different compounds at 1mg/ml for 2h and inactivated for 1h at 50°C before titration or submitted to a PaSTRy assay. The infectivity difference and peak lag are given compared to the control (*n.i.: not interpretable).* The experiments were performed at least in triplicates.

		HEAT INACTIVATION		PaSTRy assay	
	Compound	Effect	Infectivity difference (TCID50/ml)	Effect on capsid integrity	Fluorescent peak lag
Glycolipids	LPS (*P. aeruginosa)*	protection	4 log	stabilization	+4°C
	LPS (*K. pneumoniae)*	protection	6 log	*n.i.*	*n.i.*
	Rhamnolipid	protection	5 log	*n.i.*	*n.i.*
Carbohydrates and derivatives	Dextran	none	-	none	-
	Arabinogalactan	none	-	none	-
	Glycogen	none	-	none	-
	Chitin	none	-	none	-
	β-Glucan	none	0	stabilization	+2°C
	Glucose	none	-	none	-
	Polygalacturonic acid	none	-	stabilization	+2°C
	N-Acetylneuraminic acid	none	-	none	-
	N-Acetylmannosamine	none	-	none	-
	N-Acetylglucosamine	none	-	none	-
	Alginate	none	-	none	-
	Cellulose	none	-	none	-
	Levan	none	-	none	-
	Peptidoglycan	protection	4 log	*n.i.*	-

Table 3 (continued)

		HEAT INACTIVATION		PaSTRy assay	
	Compound	**Effect**	**Infectivity difference (TCID50/ml)**	**Effect on capsid integrity**	**Fluorescent peak lag**
Amino acids and derivatives	Bovine serum albumine	none	-	none	-
	Asparagine	none	-	none	-
	Cysteine	none	-	none	-
	Glycine	none	-	none	-
	Alanine	none	-	none	-
	Arginine	none	-	none	-
	Glutamic acid	none	-	none	-
	Polylysine	none	-	destabilization	-10°C
Glycosaminoglycans	Hyaluronic acid	none	-	none	-
	Heparan sulfate	none	-	none	-
Others	Humic acids	none	-	*n.i*	*n.i.*

DISCUSSION

This study investigated whether environmental organic matter can confer protection against thermal stress to CV-B5. To the best of our knowledge, this is the first study highlighting a protection of viruses by dissolved natural organic matter.

Previous work has shown that interactions between virus and purified exopolysaccharides were able to promote a protection of viral particles from heat inactivation (Robinson et al. 2014; Waldman et al. 2017). Such organic compounds were used in laboratory conditions with higher concentrations than those in natural fresh waters. Here, we made the decision to analyze the impact of complex NOM from fresh water and to fractionate NOM based on molecular weight. On one side, sedimentable NOM at natural concentration produced a clear protection of both infectivity and integrity of CV-B5 against heat. This fraction probably contained a variety of micro-organisms (algae, bacteria, fungi), since a similar centrifugal force is applied to recover micro-organisms from environmental water samples. These results are in accordance with previous studies that highlighted a protective effect of microorganisms against heat (Berger et al. 2017; Li et al. 2015). The protection was probably due to binding to cell walls or exopolysaccharides. Different cell wall compounds are likely involved in these interactions such as virus-binding carbohydrates, lipopolysaccharides or peptidoglycans (Esseili et al. 2012; Miura et al. 2013b; Robinson et al. 2014).

In a similar manner, colloidal or dissolved NOM was also able to protect virus particles from heat inactivation. The fraction of DNOM components with molecular weight higher than 100 kDa, isolated from river water, provided a strong thermostability regarding infectivity and integrity of the virus. In freshwater, this fraction relates to the humic fraction including mainly humic acids, fulvic acids and humin (Fan et al. 2001). Some authors have reported humic structures with molecular weights of up to 1.300 kDa (de Melo et al. 2016). Humic substances have been described as amphiphilic supramolecular self-assembling small molecules able to aggregate and form structures of apparent high molecular sizes (Lipczynska-Kochany 2018; Piccolo 2002).

The characterization of DNOM properties highlighted the major role of hydrophobic interactions established with CV-B5 for promoting protection from heat. Unlike the hydrophilic compounds, the hydrophobic ones were able to preserve the virus infectivity and integrity for at least nine days. In comparison, the interaction with the transphilic fraction seemed relatively labile since there was no protection anymore after 24 h of incubation. The purification method of the transphilic fraction relies on its intermediate hydrophobic behavior. We can therefore assume that the relative hydrophobic portion of transphilic organic matter was responsible for the interaction. The analysis of hydrophobic DNOM by spectrofluorimetry demonstrated the importance of humic and fluvic acids in this protection phenomenon. The protective effect was dose dependent, meaning that climatological

conditions like rainfall runoff-events could impact the importance of this virus protection in natural conditions. Since rainfall-runoff or flooding events may deeply impact the quality of water, additional samples collected during wet weather should be considered in further studies.

Humic and fluvic acids are molecules isolated from various origins (soil, water or sediments). Their chemical composition is highly variable depending on many parameters such as geographical origin, age, biological activity. Hence, the quality of DNOM could impact the ability to interact with viruses and finally to protect them from inactivation. This high diversity of DNOM could explain the absence of protection conferred by the commercial humic acids tested. Other compounds of DNOM can also interact with viruses. Gutierrez et al. (2013) observed an attraction of rotaviruses with nonhumic river organic matter but not with humic organic matter. This non-exhaustive study including purified organic compounds likely found in freshwater DNOM highlighted the predominance of hydrophobic molecules (glycolipids such as lipopolysaccharides and rhamnolipids) conferring a protection.

In addition to the role of organic matter properties, virus surface properties probably play an important role (Gutierrez et Nguyen 2012). It was previously reported that viruses exposed to elevated temperatures express transiently hydrophobic domains before the complete and irreversible disruption of the capsid (Brié et al. 2016, 2017; Curry et al. 1996; Fricks et Hogle 1990). Such an increase of capsid hydrophobicity induced by thermal denaturation could facilitate the interaction with surrounding hydrophobic compounds. Furthermore, some authors observed that viral capsids are not static but have a certain mobility which is temperature-dependent and noticeable at 37°C (Broo et al. 2001). Consequently, depending on the environment, viruses could perhaps adopt specific capsid conformations facilitating the interaction with organic matter. Perhaps even virus evolution has favored the interaction with the surrounding environment, allowing them to be more resistant outside the host and to complete their infectious cycle more effectively.

Experimental evolution studies consisting of repeated expositions to heat produced enteroviruses with increased intrinsic resistance to heat (Adeyemi et al. 2017; Shiomi et al. 2004), but such viruses were less stable at ambient temperature (Shiomi et al. 2004). Similar evolution studies isolated resistant viruses after exposure to chlorine (Bates et al. 1977), chlorine dioxide (Zhong et al. 2017) or UV (Carratalà et al. 2017). Few work has described such phenotypical adaptations in natural conditions. Viruses with increased resistance to chlorine were isolated from drinking water and environmental sources (Payment et al. 1985; Shaffer et al. 1980). Meister et al. (2018) showed that environmental isolates of CV-B5 are more resistant to heat and disinfection treatments than laboratory strain Faulkner. Nevertheless, if polymorphisms that increase capsid thermostability were solely responsible for virus persistence in the environment, theses mutations conferring intrinsic heat resistance should be predominant in environmental isolates. Their low frequency suggests that they

could negatively impact the virus fitness, by modifying the binding to cellular receptors, by impacting capsid mobility or by adversely affecting the decapsidation process. Such hyper thermostable structures would not be naturally selected.

Unpublished data from our laboratory suggest that only 10% of enteroviruses detected in fresh water are bound to sedimentable particles and 90% are free or associated to non sedimentable materials (colloids, DNOM). On the contrary, Fauvel et al. (2017) found more F-specific RNA bacteriophages in the sediment than in the water column. The authors noticed that phage association with sediments increased during rainfall-runoff events. Therefore climatological conditions, virus type and even genotype-specific interactions (Amarasiri et al. 2016) may contribute to drive virus behavior in the environment. Furthermore, our experimental method trapped sedimentable particles of the water column whereas Fauvel et al. (2017) focused on riverbed sediment. In that respect, viruses probably evolve to preserve their capacity of interaction with natural organic matter, hence favorizing their resistance to environmental conditions. New studies are needed to determine if specific polymorphisms can promote virus interaction with NOM and if such polymorphisms are naturally selected in environmental isolates.

Our results reinforce the idea that virus persistence in the environment, and then the probability of infecting a host, is greatly determined by their surrounding environment. Studies of virus-organic matter interactions will provide valuable insights for improving disinfection treatments used for drinking water production and also for wastewater management. An exhaustive study of the conditions affecting water quality would allow defining the most protective conditions for the viruses. It could also help revisiting of the currently retained efficiencies of the inactivation treatments of relevant enteric viruses and surrogates.

ACKNOWLEDGEMENTS

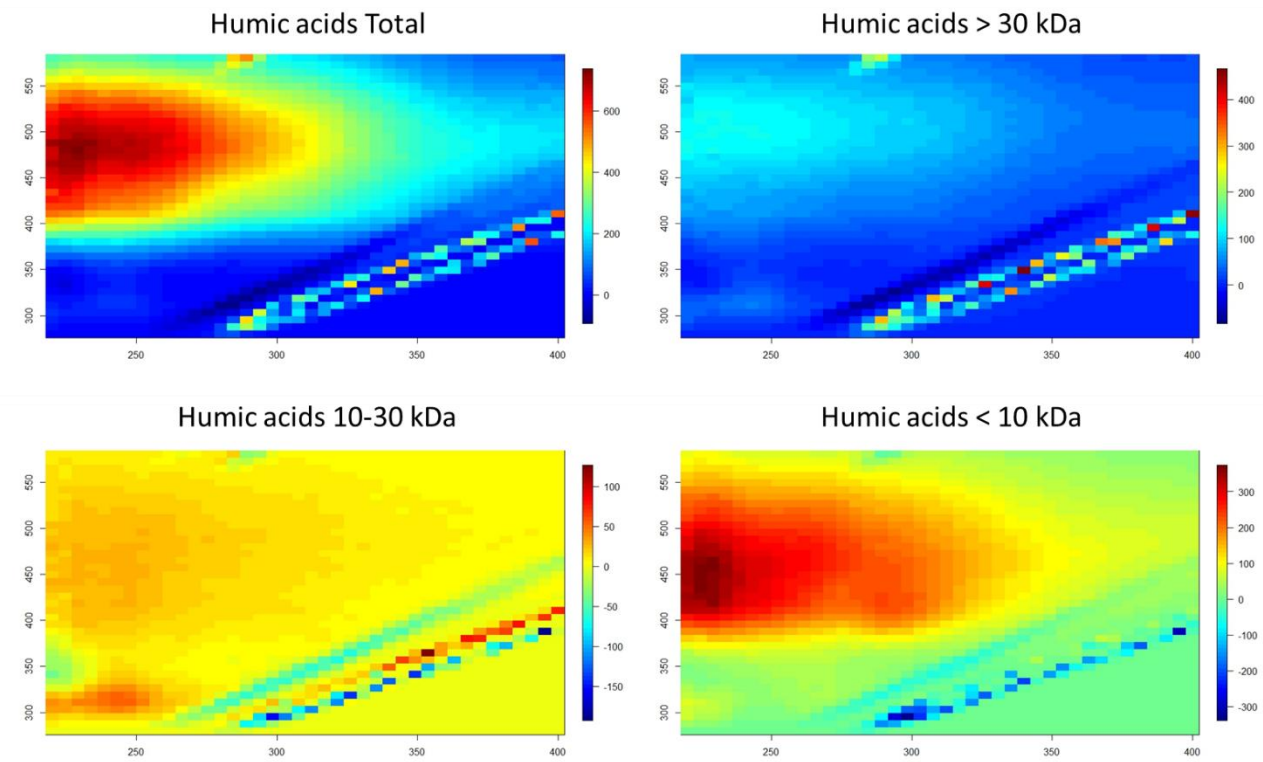
We are grateful to Jacques Geslin (Eau de Paris) for the analysis of fluorescence spectroscopy data. We also thank E. Rochelle-Newall for critical reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data 1: Reference of the commercial compounds used in the study (n.i.: not indicated by the supplier)

Name	Supplier	Reference	Origin
Alanin	Sigma	A7377	*n.i.*
Arabinogalactan	Sigma	10830	Larch wood
Arginin	Sigma	A5131	*n.i.*
Asparagin	Sigma	A0884	*n.i.*
Cellulose	Sigma	C6429	*n.i*
Chitin	Sigma	C9752	Shrimp shells
Cystein	Sigma	C7755	*n.i.*
Dextran	Sigma	31424	*Leuconostoc mesenteroides*
Glutamic acid	Sigma	G2128	*n.i.*
Glycin	Dominic Dutscher	P1013	*n.i.*
Glycogen	Sigma	G1767	*Mytilus edulis*
Heparan sulfate	Sigma	H7640	Bovine kidney
Humic Acids	Sigma	53680	*n.i.*
Hyaluronic acid sodium salt	Sigma	41897	*Streptococcus equi*
Levan	Sigma	L8657	*Erwinia herbicola*
Lipopolysaccharide	Sigma	L4268	*Klebsiella pneumoniae*
Lipopolysaccharide	Sigma	L9143	*Pseudomonas aeruginosa*
N-acetyl-D-glucosamine	Sigma	A8625	*n.i.*
N-Acetyl-D-mannosamine	Sigma	A8176	*n.i.*
N-acetylnuraminic acid	Sigma	A2388	*Escherichia*
Peptidoglycan	Sigma	69554	*Bacillus subtilis*
Polygalacturonic Acid	Sigma	P3889	Orange
Polylysine	Sigma	P8920	*n.i.*
Rhamnolipid	Sigma	R90	*Pseudomonas aeruginosa*
Sodium Alginate	Sigma	W201502	Brown algae
β-Glucan	Sigma	89862	*Euglena gracilis*

Supplementary data 2: Fluorescence excitation-emission matrix of commercial humic acids (Humic acids Total) and three fractions obtained after sequential ultrafiltration on 30 kDa and 10 kDa membranes. The fractionation was carried out in the same way as detailed in the material and methods section with the fractionation of the hydrophobic (HPO) sample.



REFERENCES

Adeyemi, Oluwapelumi O., Clare Nicol, Nicola J. Stonehouse, et David J. Rowlands. 2017. « Increasing Type 1 Poliovirus Capsid Stability by Thermal Selection ». Journal of Virology 91 (4). https://doi.org/10.1128/JVI.01586-16.

Aguilera, Elizabeth R., Y Nguyen, Jun Sasaki, et Julie K. Pfeiffer. 2019. « Bacterial Stabilization of a Panel of Picornaviruses ». Édité par Michael J. Imperiale. MSphere 4 (2). https://doi.org/10.1128/mSphere.00183-19.

Aguilera, Elizabeth R., et Julie K. Pfeiffer. 2019. « Strength in Numbers: Mechanisms of Viral Co-Infection ». Virus Research 265: 43‑ 46. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.003.

Almand, Erin A., Matthew D. Moore, et Lee-Ann Jaykus. 2017a. « Norovirus Binding to Ligands Beyond Histo-Blood Group Antigens ». Frontiers in Microbiology 8: 2549. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02549.

Almand, Erin A, Matthew D Moore, Janie Outlaw, et Lee-Ann Jaykus. 2017. « Human Norovirus Binding to Select Bacteria Representative of the Human Gut Microbiota ». PloS One 12 (3): e0173124‑ e0173124. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173124.

Amarasiri, Mohan, Satoshi Hashiba, Takayuki Miura, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, Satoshi Ishii, Satoshi Okabe, et Daisuke Sano. 2016. « Bacterial Histo-Blood Group Antigens Contributing to Genotype-Dependent Removal of Human Noroviruses with a Microfiltration Membrane ». Water Research 95: 383‑ 91. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.018.

Amarasiri, Mohan, et Daisuke Sano. 2019. « Specific Interactions between Human Norovirus and Environmental Matrices: Effects on the Virus Ecology ». Viruses 11 (3). https://doi.org/10.3390/v11030224.

Atanasova, Nikki D., Rafik Dey, Candis Scott, Qiaozhi Li, Xiao-Li Pang, et Nicholas J. Ashbolt. 2018. « Persistence of Infectious Enterovirus within Free-Living Amoebae – A Novel Waterborne Risk Pathway? » Water Research 144 (novembre): 204‑ 14. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.023.

Barber, L. B., J. A. Leenheer, T. I. Noyes, et E. A. Stiles. 2001. « Nature and Transformation of Dissolved Organic Matter in Treatment Wetlands ». Environmental Science & Technology 35 (24): 4805‑ 16. https://doi.org/10.1021/es010518i.

Bates, R. C., P. T. Shaffer, et S. M. Sutherland. 1977. « Development of Poliovirus Having Increased Resistance to Chlorine Inactivation ». Applied and Environmental Microbiology 34 (6): 849‑ 53.

Berger, Angela K., et Bernardo A. Mainou. 2018. « Interactions between Enteric Bacteria and Eukaryotic Viruses Impact the Outcome of Infection ». Viruses 10 (1). https://doi.org/10.3390/v10010019.

Berger, Angela K., Hong Yi, Daniel B. Kearns, et Bernardo A. Mainou. 2017. « Bacteria and Bacterial Envelope Components Enhance Mammalian Reovirus Thermostability ». PLoS Pathogens 13 (12): e1006768. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006768.

Bertrand, I., J.F. Schijven, G. Sánchez, P. Wyn-Jones, J. Ottoson, T. Morin, M. Muscillo, *et al.*2012. « The Impact of Temperature on the Inactivation of Enteric Viruses in Food and Water: A Review: Virus Inactivation ». Journal of Applied Microbiology 112 (6): 1059‑ 74. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x.

Bieroza, M. Z., J. Bridgeman, et A. Baker. 2010. « Fluorescence Spectroscopy as a Tool for Determination of Organic Matter Removal Efficiency at Water Treatment Works ». Drinking Water Engineering and Science 3 (1): 63‑ 70. https://doi.org/10.5194/dwes-3-63-2010.

Brié, Adrien, Isabelle Bertrand, Marie Meo, Nicolas Boudaud, et Christophe Gantzer. 2016. « The Effect of Heat on the Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2 ». Food and Environmental Virology 8 (4): 251‑ 61. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9248-2.

Brié, Adrien, Ravo Razafimahefa, Julie Loutreul, Aurélie Robert, Christophe Gantzer, Nicolas Boudaud, et Isabelle Bertrand. 2017. « The Effect of Heat and Free Chlorine Treatments on the Surface Properties of Murine Norovirus ». Food and Environmental Virology 9 (2): 149‑ 58. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9271-3.

Broo, K., J. Wei, D. Marshall, F. Brown, T. J. Smith, J. E. Johnson, A. Schneemann, et G. Siuzdak. 2001. « Viral Capsid Mobility: A Dynamic Conduit for Inactivation ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (5): 2274‑ 77. https://doi.org/10.1073/pnas.051598298.

Carratalà, Anna, Hyunjin Shim, Qingxia Zhong, Virginie Bachmann, Jeffrey D Jensen, et Tamar Kohn. 2017. « Experimental Adaptation of Human Echovirus 11 to Ultraviolet Radiation Leads to Resistance to Disinfection and Ribavirin ». Virus Evolution 3 (2). https://doi.org/10.1093/ve/vex035.

Curry, S., M. Chow, et J. M. Hogle. 1996. « The Poliovirus 135S Particle Is Infectious ». Journal of Virology 70 (10): 7125‑ 31.

Domingo, E., et J. J. Holland. 1997. « RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL ». Annual Review of Microbiology 51 (1): 151‑ 78. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.151.

Esseili, Malak A., Qiuhong Wang, et Linda J. Saif. 2012. « Binding of Human GII.4 Norovirus Virus-like Particles to Carbohydrates of Romaine Lettuce Leaf Cell Wall Materials ». Applied and Environmental Microbiology 78 (3): 786‑ 94. https://doi.org/10.1128/AEM.07081-11.

Fan, L., J. L. Harris, F. A. Roddick, et N. A. Booker. 2001. « Influence of the Characteristics of Natural Organic Matter on the Fouling of Microfiltration Membranes ». Water Research 35 (18): 4455‑ 63.

Farkas, Kata, David M. Cooper, James E. McDonald, Shelagh K. Malham, Alexis de Rougemont, et Davey L. Jones. 2018. « Seasonal and Spatial Dynamics of Enteric Viruses in Wastewater and in Riverine and Estuarine Receiving Waters ». Science of The Total Environment 634 (septembre): 1174‑ 83. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.038.

Fauvel, Blandine, Leslie Ogorzaly, Henry-Michel Cauchie, et Christophe Gantzer. 2017. « Interactions of Infectious F-Specific RNA Bacteriophages with Suspended Matter and Sediment: Towards an Understanding of FRNAPH Distribution in a River Water System ». The Science of the Total Environment 574 (janvier): 960‑ 68. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.115.

Fricks, C. E., et J. M. Hogle. 1990. « Cell-Induced Conformational Change in Poliovirus: Externalization of the Amino Terminus of VP1 Is Responsible for Liposome Binding ». Journal of Virology 64 (5): 1934‑ 45.

Gault, Elyanne, et Antoine Garbarg-Chenon. 2000. « Épidémiologie moléculaire des rotavirus ». Revue Française des Laboratoires 2000 (320): 55‑ 62. https://doi.org/10.1016/S0338-9898(00)80397-2.

Gerba, Charles P., et Walter Q. Betancourt. 2017. « Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment ». Environmental Science & Technology 51 (13): 7318‑ 25. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05835.

Gerba, Charles P., Walter Q. Betancourt, Masaaki Kitajima, et Channah M. Rock. 2018. « Reducing Uncertainty in Estimating Virus Reduction by Advanced Water Treatment Processes ». Water Research 133 (avril): 282‑ 88. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.044.

Gutierrez, Leonardo, et Thanh H. Nguyen. 2012. « Interactions between Rotavirus and Suwannee River Organic Matter: Aggregation, Deposition, and Adhesion Force Measurement ». Environmental Science & Technology 46 (16): 8705‑ 13. https://doi.org/10.1021/es301336u.

Hogle, James M. 2002. « Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways ». Annual Reviews in Microbiology 56 (1): 677‑ 702.

Imai, Akio, Takehiko Fukushima, Kazuo Matsushige, Yong-Hwan Kim, et Kwangsoon Choi. 2002. « Characterization of Dissolved Organic Matter in Effluents from Wastewater Treatment Plants ». Water Research 36 (4): 859‑ 70.

Jones, M. K., M. Watanabe, S. Zhu, C. L. Graves, L. R. Keyes, K. R. Grau, M. B. Gonzalez-Hernandez, *et al.*2014a. « Enteric Bacteria Promote Human and Mouse Norovirus Infection of B Cells ». Science 346 (6210): 755‑ 59. https://doi.org/10.1126/science.1257147.

Kahler, Amy M., Theresa L. Cromeans, Maureen G. Metcalfe, Charles D. Humphrey, et Vincent R. Hill. 2016. « Aggregation of Adenovirus 2 in Source Water and Impacts on Disinfection by Chlorine ». Food and Environmental Virology 8 (2): 148‑ 55. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9232-x.

Kane, M., L. K. Case, K. Kopaskie, A. Kozlova, C. MacDearmid, A. V. Chervonsky, et T. V. Golovkina. 2011. « Successful Transmission of a Retrovirus Depends on the Commensal Microbiota ». Science 334 (6053): 245‑ 49. https://doi.org/10.1126/science.1210718.

Kelly, James T, Luigi De Colibus, Lauren Elliott, Elizabeth E Fry, David I Stuart, David J Rowlands, et Nicola J Stonehouse. 2015. « Potent antiviral agents fail to elicit genetically-stable resistance mutations in either enterovirus 71 or Coxsackievirus A16 ». Antiviral research 124: 77‑ 82.

Kiulia, N. M., R. Netshikweta, N. A. Page, W. B. Van Zyl, M. M. Kiraithe, A. Nyachieo, J. M. Mwenda, et M. B. Taylor. 2010. « The Detection of Enteric Viruses in Selected Urban and Rural River Water and Sewage in Kenya, with Special Reference to Rotaviruses ». Journal of Applied Microbiology 109 (3): 818‑ 28. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04710.x.

Kotwal, Grishma, et Jennifer L Cannon. 2014. « Environmental Persistence and Transfer of Enteric Viruses ». Current Opinion in Virology 4 (février): 37‑ 43. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.12.003.

Kuss, S. K., G. T. Best, C. A. Etheredge, A. J. Pruijssers, J. M. Frierson, L. V. Hooper, T. S. Dermody, et J. K. Pfeiffer. 2011. « Intestinal Microbiota Promote Enteric Virus Replication and Systemic Pathogenesis ». Science 334 (6053): 249‑ 52. https://doi.org/10.1126/science.1211057.

Labanowski, J. 2004. « Matière organique naturelle et anthropique: vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation ». Faculté des Sciences et Techniques - Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges - Laboratoire de Sciences de l'Eau et de l'Environnement, Université de Limoges.

Lauring, Adam S., Judith Frydman, et Raul Andino. 2013. « The Role of Mutational Robustness in RNA Virus Evolution ». Nature Reviews Microbiology 11 (5): 327‑ 36. https://doi.org/10.1038/nrmicro3003.

Li, Dan, Adrien Breiman, Jacques Le Pendu, et Mieke Uyttendaele. 2015. « Binding to histo-blood group antigen-expressing bacteria protects human norovirus from acute heat stress ». Frontiers in microbiology 6: 659.

Lipczynska-Kochany, Ewa. 2018. « Humic Substances, Their Microbial Interactions and Effects on Biological Transformations of Organic Pollutants in Water and Soil: A Review ». Chemosphere 202 (juillet): 420‑ 37. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.104.

Maisonneuve, Elodie, Estelle Cateau, Nicolas Leveque, Sihem Kaaki, Agnès Beby-Defaux, et Marie-Hélène Rodier. 2017. « Acanthamoeba Castellanii Is Not Be an Adequate Model to Study Human

Adenovirus Interactions with Macrophagic Cells ». PloS One 12 (6): e0178629. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178629.

Mann, Ethan E., et Daniel J. Wozniak. 2012. « Pseudomonas Biofilm Matrix Composition and Niche Biology ». FEMS Microbiology Reviews 36 (4): 893‑916. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x.

Mattana, A., C. Serra, E. Mariotti, G. Delogu, P. L. Fiori, et P. Cappuccinelli. 2006. « Acanthamoeba Castellanii Promotion of In Vitro Survival and Transmission of Coxsackie B3 Viruses ». Eukaryotic Cell 5 (4): 665‑71. https://doi.org/10.1128/EC.5.4.665-671.2006.

Maunula, Leena, Ilkka T. Miettinen, et Carl-Henrik von Bonsdorff. 2005. « Norovirus Outbreaks from Drinking Water ». Emerging Infectious Diseases 11 (11): 1716‑21. https://doi.org/10.3201/eid1111.050487.

Meister, Simon, Matthew E. Verbyla, Marius Klinger, et Tamar Kohn. 2018a. « Variability in Disinfection Resistance between Currently Circulating Enterovirus B Serotypes and Strains ». Environmental Science & Technology 52 (6): 3696‑3705. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00851.

Melo, Bruna Alice Gomes de, Fernanda Lopes Motta, et Maria Helena Andrade Santana. 2016. « Humic Acids: Structural Properties and Multiple Functionalities for Novel Technological Developments ». Materials Science and Engineering: C 62 (mai): 967‑74. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.001.

Miura, Takayuki, Daisuke Sano, Atsushi Suenaga, Takeshi Yoshimura, Miyu Fuzawa, Toyoko Nakagomi, Osamu Nakagomi, et Satoshi Okabe. 2013a. « Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses ». Journal of virology 87 (17): 9441–9451.

Nguyen, Y., Palmy R. Jesudhasan, Elizabeth R. Aguilera, et Julie K. Pfeiffer. 2019. « Identification and Characterization of a Poliovirus Capsid Mutant with Enhanced Thermal Stability ». Journal of Virology 93 (6). https://doi.org/10.1128/JVI.01510-18.

Payment, PIERRE, MICHEL Tremblay, et MICHEL Trudel. 1985. « Relative resistance to chlorine of poliovirus and coxsackievirus isolates from environmental sources and drinking water. » Applied and environmental microbiology 49 (4): 981–983.

Pernet-Coudrier, B., G. Varrault, M. Saad, J. P. Croue, M.-F. Dignac, et J.-M. Mouchel. 2011. « Characterisation of Dissolved Organic Matter in Parisian Urban Aquatic Systems: Predominance of Hydrophilic and Proteinaceous Structures ». Biogeochemistry 106 (1): 89‑106. https://doi.org/10.1007/s10533-010-9480-z.

Piccolo, Alessandro. 2002. « The Supramolecular Structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science ». In Advances in Agronomy, 75:57‑134. Elsevier. http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065211302750037.

Poirier, Enzo Z, et Marco Vignuzzi. 2017. « Virus Population Dynamics during Infection ». Current Opinion in Virology 23 (avril): 82‑87. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.013.

Prevost, B., F.S. Lucas, A. Goncalves, F. Richard, L. Moulin, et S. Wurtzer. 2015. « Large Scale Survey of Enteric Viruses in River and Waste Water Underlines the Health Status of the Local Population ». Environment International 79 (juin): 42‑50. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.004.

Robinson, Christopher M., Palmy R. Jesudhasan, et Julie K. Pfeiffer. 2014. « Bacterial Lipopolysaccharide Binding Enhances Virion Stability and Promotes Environmental Fitness of an Enteric Virus ». Cell Host & Microbe 15 (1): 36‑46. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.004.

Sanjuán, Rafael, Miguel R. Nebot, Nicola Chirico, Louis M. Mansky, et Robert Belshaw. 2010. « Viral Mutation Rates ». Journal of Virology 84 (19): 9733‑48. https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10.

Servais, Pierre, Josette Garnier, Nadia Demarteau, Natacha Brion, et Gilles Billen. 1999. « Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents ». Water Research 33 (16): 3521‑ 31.

Shaffer, P. T., T. G. Metcalf, et O. J. Sproul. 1980. « Chlorine Resistance of Poliovirus Isolants Recovered from Drinking Water ». Applied and Environmental Microbiology 40 (6): 1115‑ 21.

Shi, Zhenda, et Andrew T. Gewirtz. 2018. « Together Forever: Bacterial-Viral Interactions in Infection and Immunity ». Viruses 10 (3). https://doi.org/10.3390/v10030122.

Shiomi, Hiroshi, Tomoko Urasawa, Shozo Urasawa, Nobumichi Kobayashi, Shibobu Abe, et Koki Taniguchi. 2004a. « Isolation and Characterisation of Poliovirus Mutants Resistant to Heating at 50°c for 30 Min: Heat-Resistant Poliovirus Mutant ». Journal of Medical Virology 74 (3): 484‑ 91. https://doi.org/10.1002/jmv.20202.

Sinclair, R. G., E. L. Jones, et C. P. Gerba. 2009. « Viruses in Recreational Water-Borne Disease Outbreaks: A Review ». Journal of Applied Microbiology 107 (6): 1769‑ 80. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x.

Stedmon, Colin A, Stiig Markager, et Rasmus Bro. 2003. « Tracing Dissolved Organic Matter in Aquatic Environments Using a New Approach to Fluorescence Spectroscopy ». Marine Chemistry 82 (3‑ 4): 239‑ 54. https://doi.org/10.1016/S0304-4203(03)00072-0.

Thurston-Enriquez, J. A., C. N. Haas, J. Jacangelo, et C. P. Gerba. 2003. « Chlorine Inactivation of Adenovirus Type 40 and Feline Calicivirus ». Applied and Environmental Microbiology 69 (7): 3979‑ 85. https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3979-3985.2003.

Verani, Marco, Graziano Di Giuseppe, Carmine Tammaro, et Annalaura Carducci. 2016. « Investigating the Role of Acanthamoeba Polyphaga in Protecting Human Adenovirus from Water Disinfection Treatment ». European Journal of Protistology 54 (juin): 11‑ 18. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.006.

Visser, J. Arjan G. M. de, Joachim Hermisson, Günter P. Wagner, Lauren Ancel Meyers, Homayoun Bagheri-Chaichian, Jeffrey L. Blanchard, Lin Chao, *et al.*2003. « Perspective: Evolution and Detection of Genetic Robustness ». Evolution; International Journal of Organic Evolution 57 (9): 1959‑ 72.

Waldman, Prunelle, Alba Meseguer, Françoise Lucas, Laurent Moulin, et Sébastien Wurtzer. 2017. « Interaction of Human Enteric Viruses with Microbial Compounds: Implication for Virus Persistence and Disinfection Treatments ». Environmental Science & Technology 51 (23): 13633‑ 40. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03875.

Wommack, K. E., R. T. Hill, T. A. Muller, et R. R. Colwell. 1996. « Effects of Sunlight on Bacteriophage Viability and Structure ». Applied and Environmental Microbiology 62 (4): 1336‑ 41.

Zhong, Qingxia, Anna Carratalà, Rachele Ossola, Virginie Bachmann, et Tamar Kohn. 2017. « Cross-Resistance of UV- or Chlorine Dioxide-Resistant Echovirus 11 to Other Disinfectants ». Frontiers in Microbiology 8 (octobre). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01928.

Zhong, Qingxia, Anna Carratalà, Hyunjin Shim, Virginie Bachmann, Jeffrey D. Jensen, et Tamar Kohn. 2017. « Resistance of Echovirus 11 to ClO 2 Is Associated with Enhanced Host Receptor Use, Altered Entry Routes, and High Fitness ». Environmental Science & Technology 51 (18): 10746‑ 55. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03288

Conclusion du chapitre 2

Ce deuxième chapitre a eu pour objectif d'étudier l'impact de fractions d'échantillons environnementaux sur la stabilité thermique du CV-B5. L'étude a premièrement mis en évidence un effet protecteur, plusieurs logs de protection d'infectivité, conféré par des fractions d'eau de rivière (la Seine) fraîchement collectée et séparées selon leur densité. La présence de composés protecteurs a été identifiée dans des fractions particulaire et dissoute. La méthode de centrifugation différentielle employée a conduit à une concentration des éléments fractionnés d'un facteur dix par rapport aux échantillons bruts. Ces premières observations indiquent indirectement que des composés particulaires ou dissous des eaux de surface peuvent interagir avec le CV-B5.

Les interactions avec la matière organique naturelle dissoute ont ensuite pu être étudiées de façon plus approfondie grâce à un fractionnement et une purification sur la base des propriétés d'hydrophilie et d'hydrophobicité. Seules les fractions transphiliques et hydrophobes ont conféré au CV-B5 une thermorésistance via la stabilisation des capsides. De plus, la force des interactions analysée via la persistance de l'effet protecteur après plusieurs jours s'est révélée être liée au degré d'hydrophobicité de la matière organique.

La matière organique dissoute présente dans les milieux aquatiques est d'origine naturelle (dégradation des végétaux, produits de synthèse et de dégradation des micro-organismes et du phytoplancton) ou anthropique (issue des eaux de ruissellement et des rejets urbains ou agricoles) (Labanowski, 2004). Les constituants hydrophiles de la matière organique naturelle correspondent à des acides aminés, protéines, sucres et polysaccharides, tandis que les composés hydrophobes incluent des acides humiques et fulviques, des hydrocarbures, détergents et surfactants, des pigments ou certaines protéines (L. B. Barber *et al.*, 2001; Imai *et al.*, 2002b). La teneur en carbone organique dissous des eaux dont sont issues les échantillons testés varie de 2 mgC/L à 4 mgC/L (Pernet-Coudrier *et al.*, 2011). La plus petite concentration de matière organique hydrophobe testée pour laquelle une protection a été observée est 0,1 mg/mL, soit 100 mg/L. Cette concentration correspond approximativement à deux fois la concentration en carbone organique dissous, soit 50 mgC/L. Ainsi, les conditions expérimentales correspondent à une concentration environ douze à vingt-cinq fois supérieure aux conditions environnementales en termes de carbone dissous. De manière générale, la teneur en carbone organique dissous est très variable d'un milieu à l'autre. Elle est généralement comprise entre 1 et 10 mgC/L, voire 20 mgC/L dans les eaux de surface, mais est plutôt de l'ordre de 0,1 mgC/L dans les eaux souterraines et peut s'étendre jusqu'à plusieurs centaines de mgC/L dans les eaux usées (Servais *et al.*, 1999). On note que les concentrations en virus utilisées sont aussi supérieures à celles de l'environnement, si bien que le ratio MO/virus dans ces expériences n'est pas plus élevé que celui des milieux hydriques.

Les conséquences de la MO naturellement présente dans les eaux de surface sur la stabilité virale ont pour la première fois été considérées. Cette étude a démontré que la matière organique dissoute stabilise le CV-B5, à condition de posséder un certain degré d'hydrophobicité. Les particules virales étant chargées et possédant à leur surface des groupements plus ou moins hydrophiles ou hydrophobes, au moins deux mécanismes peuvent expliquer l'établissement de ces interactions. Premièrement, des interactions hydrophobes stabilisatrices pourraient s'établir principalement au voisinage de la température de transition des virus dans nos conditions expérimentales, ou bien dans l'environnement sur des particules virales endommagées, lorsque débute l'exposition des résidus hydrophobes. Alternativement, les interactions pourraient impliquer spécifiquement certains résidus des capsides et des motifs portés par des molécules organiques globalement hydrophobes présentes dans les eaux de surface. Des données bibliographiques et la première partie indiquent en effet que certaines interactions entre des entérovirus et des composés microbiens seraient spécifiques. Il est possible que la stabilisation thermique virale observée expérimentalement résulte d'une combinaison de ces deux mécanismes.

Chapitre 3 : Conséquences des interactions virus-matière organique sur l'adaptation d'un entérovirus à un stress thermique

Introduction

Les résultats des deux premiers chapitres ont mis en évidence que les entérovirus peuvent établir des interactions stabilisatrices avec certains types de matières organiques, dont notamment de la MO environnementale particulaire ou dissoute présente dans les eaux de surface. L'association aux particules pourrait théoriquement diminuer la dissémination virale via la sédimentation. Au contraire, les virus liés à des constituants dissous seraient capables d'une part de maintenir pendant plus longtemps leur potentiel infectieux dans l'environnement et donc se disséminer sur des distances lointaines du point de contamination. D'autre part, ils pourraient constituer une fraction résistante à certains modes de désinfection. À ce titre, la faculté des virus à interagir avec la matière organique constituerait, sous certaines conditions, un avantage sélectif. L'effet stabilisateur de la matière organique environnementale reste cependant un phénomène relativement méconnu dont les enjeux en matière de risque viral sont peu documentés.

Un nombre croissant de travaux s'intéresse en revanche à la résistance intrinsèque des virus face à différents stress, et plus spécialement à l'acquisition de mutations stabilisant les capsides virales à des températures élevées ou permettant une résistance accrue aux traitements de désinfection (Nguyen *et al.*, 2019; Shiomi *et al.*, 2004). En outre, des variants présentant certains phénotypes de résistance ont été isolés de différentes ressources environnementales ou de l'eau potable distribuée (Meister *et al.*, 2018; Payment *et al.*, 1985). La quasi-totalité des mutations stabilisatrices ont été recherchées et identifiées sur des populations virales générées après plusieurs cycles de culture en laboratoire et maintenues dans des matrices hydriques relativement simples (milieu de culture, eau, solutions salines). Au vu des résultats précédents, il semble cependant légitime de supposer que l'adaptation des virus dans l'environnement s'opère certes sur des critères de résistance intrinsèque, mais aussi sur la capacité à interagir avec des composés stabilisateurs. La résistance à un stress thermique pourrait ainsi être la résultante d'une combinaison de mutations parmi lesquelles certaines faciliteraient les associations avec la matière organique. Ces mutations conféreraient, dans certaines conditions, un avantage sélectif sur les virus ayant uniquement des mutations de résistance intrinsèque. Le chapitre 3 a pour objectif d'évaluer dans quelle mesure l'adaptation d'un entérovirus soumis à un stress thermique s'oriente vers une résistance intrinsèque en présence de composés stabilisateurs.

Introduction

Pour réaliser complètement leur cycle infectieux, les entérovirus doivent être capables de se maintenir dans une grande variété d'environnements différents, aussi bien au sein de l'hôte que dans le milieu extérieur. Ils sont confrontés à un ensemble de pressions conditionnées par exemple par la réponse immunitaire et l'environnement cellulaire de l'hôte ou la température et la dégradation dans le milieu extérieur, auxquelles ils doivent s'adapter. L'une des caractéristiques majeures des virus à ARN simple brin est leur capacité d'adaptation. Cette capacité est la résultante de plusieurs mécanismes leur permettant de se répliquer à chaque génération sous la forme d'un ensemble de variants génétiquement hétérogènes, les quasi-espèces virales (Domingo and Holland, 1997). Cette diversité virale est tout d'abord due à la faible fidélité de l'enzyme de réplication, une ARN polymérase ARN-dépendante dépourvue d'activité de relecture (Sanjuán *et al.*, 2010b). Cela engendre un taux élevé de mutations de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-6} mutations par nucléotide et par génération. La diversité virale est aussi favorisée par les recombinaisons se produisant lors d'événements de co-infection lorsque la polymérase en cours de synthèse change de brin matrice (Aguilera and Pfeiffer, 2019; Poirier and Vignuzzi, 2017). Dans le cas des virus possédant un génome segmenté comme les rotavirus, les réassortiments de segments participent également à la diversité virale (Gault and Garbarg-Chenon, 2000). Ces mécanismes conjoints à une forte capacité réplicative, produisant un très grand nombre de particules en un temps de génération court, permettent aux virus entériques à ARN de s'adapter rapidement.

La propagation des virus est déterminée par la *fitness*, définie comme la capacité à générer à l'issue du cycle de nouvelles particules infectieuses (Lauring *et al.*, 2013). Cette notion peut être qualifiée plus précisément de fitness réplicative, pour la distinguer d'une définition plus large de la fitness incluant la capacité à persister dans des conditions données. L'adaptation des virus à un nouvel environnement résulte d'un équilibre entre leur robustesse c'est-à-dire leur faculté à maintenir un phénotype donné dans différents environnements ou face à une perturbation, et leur adaptabilité, qui correspond à la capacité à augmenter la fitness par des mutations (de Visser *et al.*, 2003). Les processus d'adaptation des virus sont notamment mis en jeu dans certains cas de transmissions indirectes.

La transmission des entérovirus s'effectue directement de personne à personne ou indirectement via l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés. La transmission indirecte est favorisée par une longue persistance virale pouvant atteindre plusieurs mois tant sur les surfaces solides que dans l'eau (Kotwal and Cannon, 2014), ainsi que par les capacités d'adaptation des virus. Ils peuvent en particulier augmenter leur résistance à différents stress tels que les traitements de désinfection ou la chaleur. De fait, des expériences d'évolution en conditions contrôlées ont permis de produire en laboratoire des populations ayant une tolérance accrue à la chaleur (Adeyemi *et al.*, 2017; Shiomi

et al., 2004), au chlore (Bates *et al.*, 1977), au dioxyde de chlore (Zhong *et al.*, 2017a) et aux UV (Carratalà *et al.*, 2017). Récemment, Meister *et al.* (2018) ont démontré que des isolats environnementaux de coxsackievirus B5 (CV-B5) sont globalement plus résistants à la chaleur et aux traitements de désinfection que la souche de laboratoire Faulkner.

La température est le premier paramètre impactant la persistance des virus dans l'environnement (Bertrand *et al.*, 2012). Chez les entérovirus, différentes mutations affectant les protéines de capside et conférant une thermorésistance ont été identifiées (Adeyemi *et al.*2017; Nguyen *et al.*2019; Shiomi *et al.*2004). Dans plusieurs études, le phénotype thermorésistant a été attribué à une mutation unique, plutôt qu'à une combinaison de mutations. Ces mutations renforcent la structure de la capside, et pourraient rendre les virus plus adaptés pour persister dans l'environnement ou au sein de l'hôte. L'interaction des virus avec des composés stabilisateurs est un autre phénomène qui pourrait avoir un rôle important sur le devenir des virus dans l'environnement. Ces dernières années, plusieurs travaux ont prouvé que le microbiote intestinal contribue au processus infectieux et à la transmission de certains virus entériques (Jones *et al.*, 2014; Kane *et al.*, 2011; Kuss *et al.*, 2011b). Les modalités par lesquelles le microbiote et les virus interagissent ont été synthétisées par des auteurs qui émettent l'hypothèse que les virus pathogènes pourraient avoir évolué de façon à utiliser à leur profit les bactéries intestinales (Berger and Mainou, 2018; Shi and Gewirtz, 2018). Il a par ailleurs été montré que des interactions physiques avec certaines bactéries ou composants bactériens confèrent aux entérovirus ou au norovirus une protection vis-à-vis de différents stress (Aguilera *et al.*, 2019; Erin A. Almand *et al.*, 2017b; Miura *et al.*, 2013b; Robinson *et al.*, 2014b; Waldman *et al.*, 2017). De plus, nous avons précédemment montré que la matière organique environnementale augmente la stabilité et la thermorésistance du CV-B5.

Les mécanismes moléculaires précis régissant ces interactions ne sont pas encore intégralement connus. Robinson *et al. (*2014) ont néanmoins démontré l'importance de l'acide aminé en position 99 de la protéine VP1 du PV pour l'interaction stabilisatrice avec le LPS. Ils ont donc émis les hypothèses que cette mutation particulière confèrerait un désavantage sélectif, et plus généralement que la position 99 serait soumise à une pression de sélection favorisant les polymorphismes permettant d'établir des interactions stabilisatrices avec des composées tels que le LPS. De même que les virus semblent s'être adaptés à la présence du microbiote intestinal qui facilite leur pathogénicité, il est possible que leur évolution ait sélectionné la capacité à interagir avec la matière organique stabilisatrice durant la phase de transmission et persistance inter-hôte. Les conséquences des interactions virus-matière organique en termes de dynamique d'évolution n'ont cependant pas été documentées. L'objectif général de cette étude a été d'identifier dans quelle mesure la présence de matière organique peut modifier l'évolution d'une population virale sous pression de sélection thermique. Les hypothèses sont que la présence de matière organique

stabilisatrice préviendrait l'acquisition d'une thermorésistance pouvant présenter un coût évolutif pour les virus, et favoriserait la fixation de mutations facilitant les interactions avec la matière organique. Un CV-B5 a été exposé à vingt cycles, comprenant une phase d'inactivation thermique partielle en présence ou non de LPS et une phase de multiplication par culture. La thermorésistance intrinsèque des populations générées a ensuite été mesurée, et les déterminants génétiques associés ont été étudiés en identifiant les mutations non synonymes par une approche de séquençage nouvelle génération (NGS).

Résultats

Évolution de la sensibilité thermique

Une population initiale de CV-B5 (N0) a été soumise à trois conditions en triplicats : une inactivation thermique à 48 °C (condition T), une inactivation thermique à 48 °C en présence de 0,5 mg/mL de LPS (condition LT) ou une simple dilution sans traitement thermique (condition NT). Après 10 cycles d'inactivation-production, la sensibilité thermique des populations virales a été déterminée en quantifiant le titre infectieux résiduel après inactivation à 48 °C (Figure 1). Cette inactivation a induit un abattement de 6,6 log d'infectivité chez la population N0. Aucune résistance n'a émergé parmi les trois répliats NT, dont l'abattement moyen de 6,7 log a été similaire à celui de la population N0. Les trois réplicats T ont présenté une thermorésistance se manifestant par une réduction d'infectivité de seulement 2,6 log en moyenne. En revanche l'abattement moyen des populations LT (6,1 log) a été comparable à celui des virus NT, indiquant que la présence de LPS a été suffisante pour permettre aux virus de persister sans nécessiter d'adaptation virale à ce stress thermique.

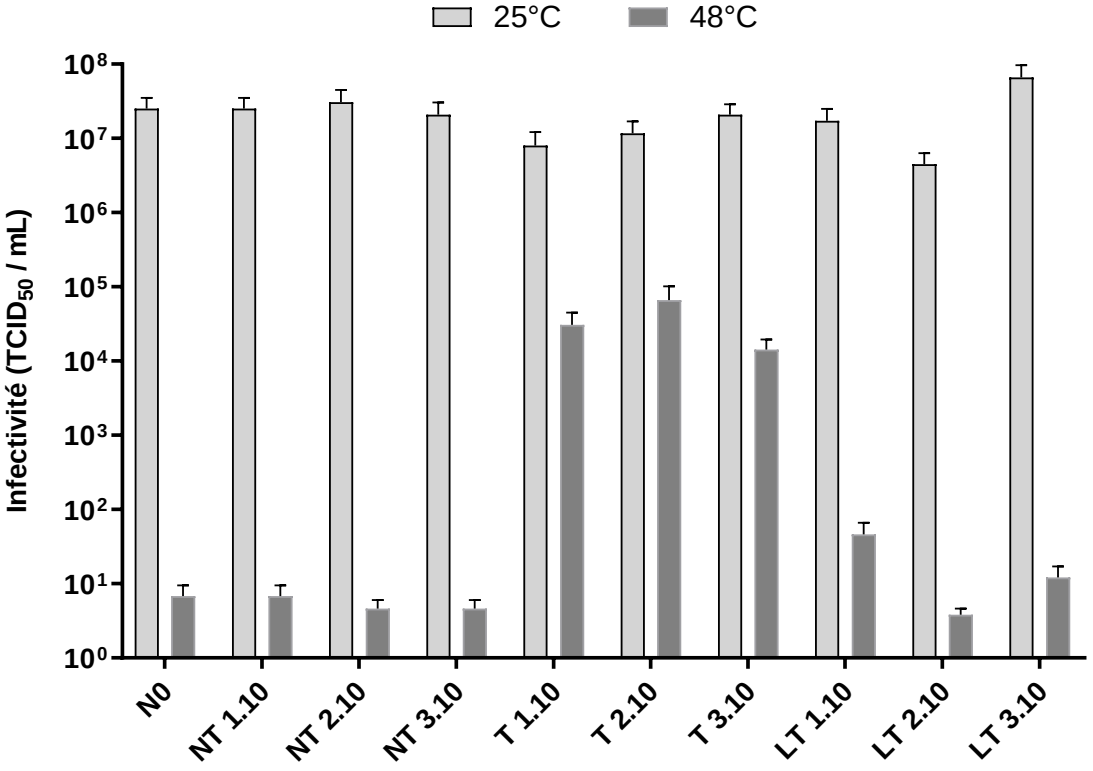


Figure 1 : **Sensibilité à l'inactivation thermique de la population N0 et des populations issues du dixième passage.** Titre infectieux après incubation 1 h à 25 °C ou à 48 °C. Les barres d'erreur représentent les écart-types d'une expérience représentative (12 réplicats par dilution) selon l'algorithme de Spearman et Kärber)

Les cycles d'inactivation-production ont été poursuivis jusqu'à la vingtième génération afin d'identifier l'apparition éventuelle de virus thermorésistants à plus long terme chez les populations NT et LT et de mettre en évidence une possible augmentation de résistance parmi les populations T (Figure 2). Avec un abattement moyen de 6 log après inactivation à 48 °C, les populations NT n'ont pas évolué vers un phénotype résistant. En revanche, l'exposition à 48 °C a induit seulement 0,5 log d'inactivation en moyenne chez les réplicats de la condition T, indiquant un accroissement de leur résistance à la chaleur entre les passages 10 et 20. De plus, l'émergence d'un phénotype partiellement résistant a été constatée chez les trois populations LT, chez lesquelles l'inactivation à 48 °C a induit 4,0 log d'abattement.

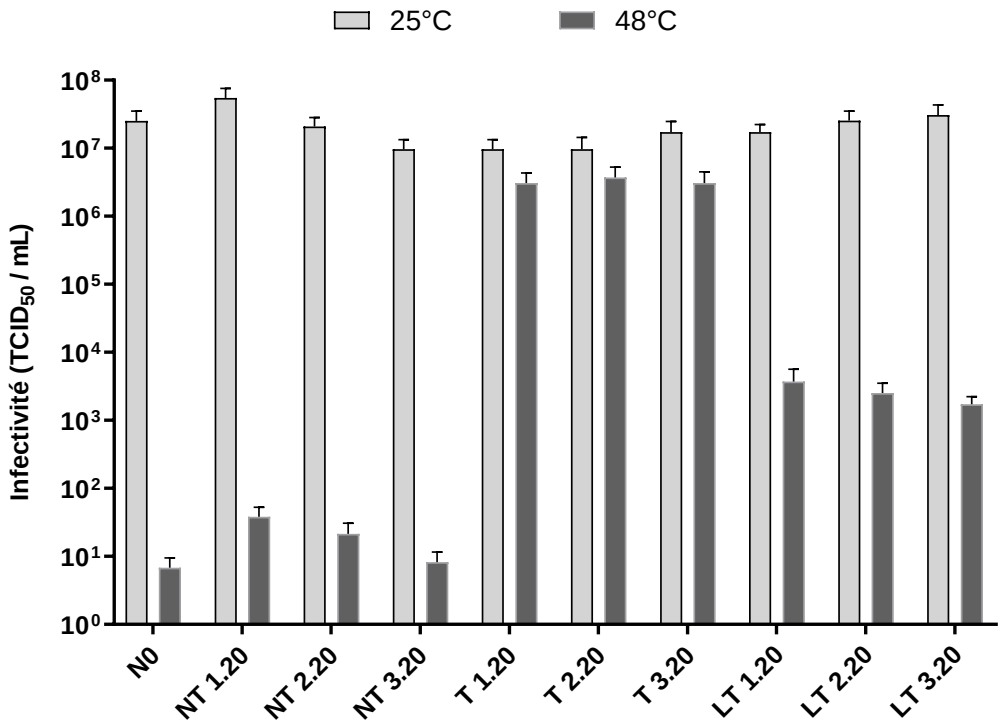


Figure 2 : Sensibilité à l'inactivation thermique de la population N0 et des populations issues du vingtième passage. (A) Titre infectieux après incubation 1 h à 25 °C ou à 48 °C. Les barres d'erreur représentent les écart-types d'une expérience représentative (12 réplicats par dilution) selon l'algorithme de Spearman et Kärber. (B) Abattement induit par l'inactivation thermique pour chaque condition (moyennes et écarts-types, n=3)

Afin de déterminer si les cycles d'inactivation-production ont engendré des changements phénotypiques affectant la capacité des virus à infecter les cellules et générer de nouvelles particules, la capacité d'adhésion des populations NT, T et LT aux cellules 293A ainsi que leur vitesse de réplication et de production de nouveaux virus ont été étudiées *in vitro*.

Adhésion aux cellules cibles

La résistance thermique implique une augmentation de la stabilité de la structure des capsides virales. Afin d'évaluer si la thermorésistance s'accompagne d'une modification de la liaison aux cellules cibles, l'adhésion des virus NT, T et LT issues du passage 10 a été comparée à l'adhésion des virus N0. Le nombre de virus liés aux cellules 293A dans chaque population a été dénombré par RT-qPCR et rapporté au nombre de virus liés aux cellules dans la population initiale N0 (Figure 3). Aucune différence claire de capacité d'adhésion n'a été mise en évidence chez les neuf populations.

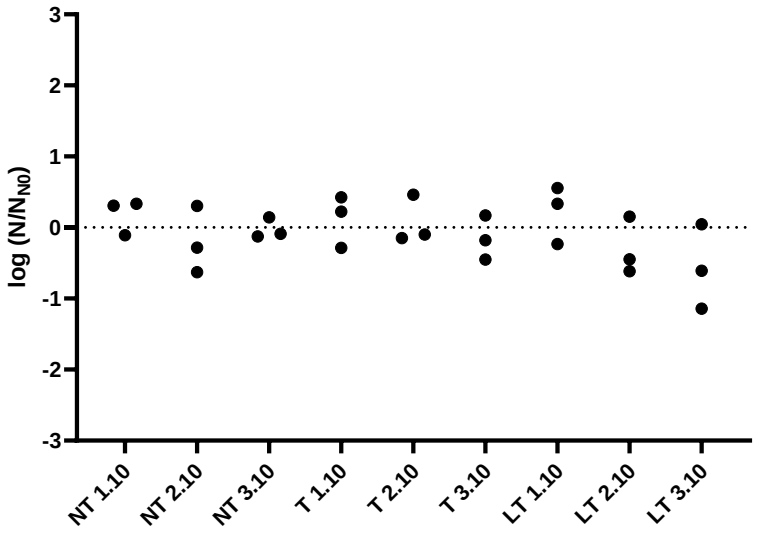


Figure 3 : Adhésion aux cellules 293A des populations NT, T et LT issues du passage 10. N/N_{N0} correspond à la proportion de virus NT, T et LT associés aux cellules (N) par rapport à la population initiale N0 (N_{N0}). Les virus ont été quantifiés par RT-qPCR (3 réplicats par population).

Fitness réplicative au cours des premiers cycles

La réplication des populations N0, NT, T et LT a ensuite été analysée, tout d'abord en caractérisant par RT-qPCR la cinétique de réplication des génomes viraux intracellulaires produits durant le premier cycle jusqu'à 8 h post-infection (Figure 4). Pour toutes les populations, les génomes viraux associés aux tapis cellulaires ont été initialement de l'ordre de 10^2 copies, et de l'ordre de 10^6 copies après 8 h. Sur cette durée, les profils sont relativement similaires et n'indiquent pas différence de vitesse de réplication selon la condition NT, T ou LT pendant le premier cycle de réplication.

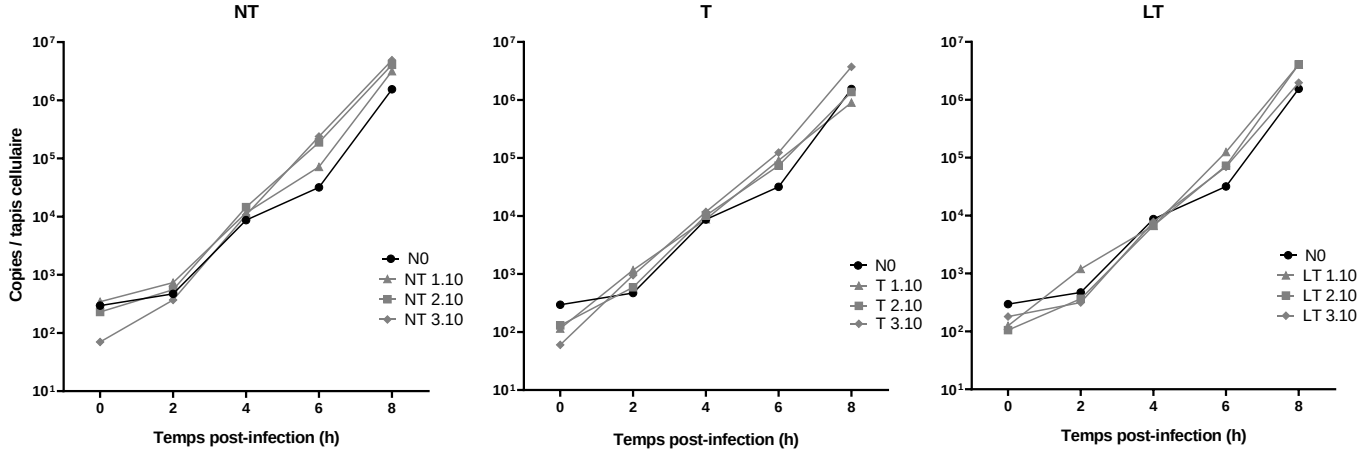


Figure 4 : Réplication sur un cycle des populations issues des conditions NT, T et LT issues du passage 10. Les tapis cellulaires ont été lysés jusqu'à 8 h post-infection et les génomes viraux ont été quantifiés par RT-qPCR (moyennes de 3 réplicats expérimentaux pour chacune des trois populations représentatives de chaque condition).

Fitness replicative sur 24 h

L'efficacité de production de nouvelles particules virales a ensuite été considérée en quantifiant les virus libérés dans le surnageant 24 h après infection par les virus issus des passages 10 et 20 (Figure 5). Au dixième passage, la concentration en génomes viraux dans le surnageant des virus T ($3{,}7.10^6$ /100 µL) a été moins élevée que dans le cas des virus NT ($1{,}5.10^7$ /100 µL) ou LT ($1{,}6.10^7$ /100 µL). Cette différence a été encore plus marquée au vingtième passage, avec une concentration moyenne en génomes de seulement $3{,}8.10^4$ /100 µL, 24 h après infection par les virus issus de la condition T. Les vitesses de production de nouveaux génomes sur 24 h (k) pour chaque condition NT, T ou LT aux passages 10 et 20 sont représentées sur la Figure 6. Au passage 10, la vitesse de synthèse des populations issues de la condition T était légèrement inférieure à celles des populations de conditions LT et NT. Au passage 20, cette différence est plus marquée, avec une valeur de k environ deux fois inférieure à celle des conditions NT et LT. Les populations de la condition T ont donc perdu en fitness réplicative entre le dixième et le vingtième passage.

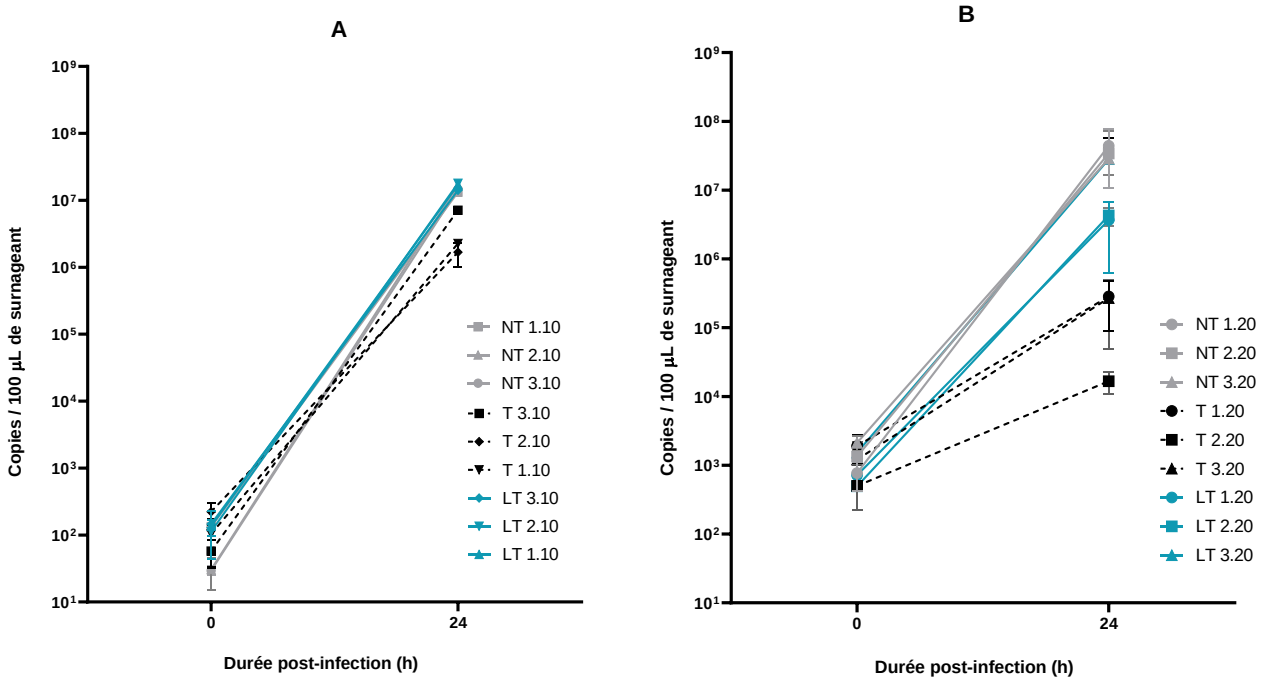


Figure 5 : Fitness replicative sur 24 h selon les conditions d'évolution (NT, T, et LT) à l'issue des passages 10 (A) et 20 (B). Les virus ont été quantifiés dans le surnageant de culture par RT-qPCR. Moyennes et écarts-types (3 réplicats expérimentaux par population).

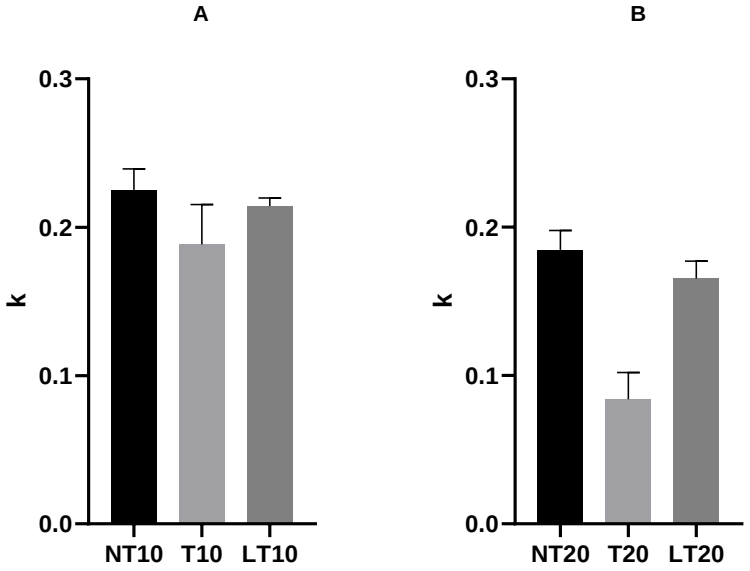


Figure 6 : Vitesse de production virale k (log(génome.h^{-1})) des virus issus de conditions NT, T et LT aux passages 10 (A) et 20 (B). Moyennes et écarts-types, n=3.

Caractérisation des génotypes

Les populations virales issues des dixième et vingtièmes cycles d'inactivation-production ont été séquencées par une approche RNA seq. Les reads ont été confrontés à la séquence de la population initiale N0 définie comme séquence de référence. Seules les mutations non synonymes des séquences codantes des différentes populations virales, ayant une fréquence d'apparition au moins égale à 0,4, ont été considérées. Ce seuil signifie qu'une mutation a été reportée seulement si elle était présente dans au moins 40 % des reads couvrant sa position. Ces mutations touchent les protéines structurales VP1 et VP4, la protéase 2C et la polymérase 3D. On note qu'au dixième passage seules deux populations, NT1.10 et LT1.10, étaient encore identiques à la population initiale selon les critères d'analyse appliqués.

Le nombre et la localisation des mutations non synonymes ayant émergé dans chaque condition sont synthétisés sur la Figure 6. De façon générale, on note pour chaque condition une augmentation du nombre de mutations non synonymes par rapport à la référence jusqu'au vingtième passage, qui illustre la dynamique génétique des populations virales même en l'absence de pression de sélection. Chez les populations NT, trois mutations ont émergé au passage 10 dans les protéines de capside, puis six autres mutations ont été observées au passage 20 dans la polymérase. Quantitativement, les populations T sont celles parmi lesquelles ont émergé le plus grand nombre de mutations non synonymes aux passages 10 (sept mutations) et 20 (douze mutations). Chez ces populations, le traitement thermique a sélectionné au passage 10 des mutations dans les protéines de capside (quatre), la polymérase (deux) et la protéase 2A (une). Les cinq mutations additionnelles acquises entre les passages 10 et 20 concernent principalement les protéines de capsides. Enfin, les populations LT ont présenté seulement quatre mutations au passage 10, en majorité dans la polymérase, puis deux mutations additionnelles dans les protéines de capsides au passage 20. Le nombre de mutations non synonymes des populations LT, et en particulier celles affectant les protéines de capside, est plus proche de celui des populations non traitées que des populations thermorésistantes. Comme observé d'un point de vue phénotypique, les interactions avec le LPS ont réduit l'émergence de mutations non synonymes dans les génomes des quasi-espèces virales majoritaires sélectionnées.

Au total, treize et dix-huit mutations non synonymes ont été identifiées après 10 et 20 cycles. Les mutations mises en évidence dans chaque population sont reportées dans les Tableaux 1 et 2. Le Tableau S2 présente les mutations observées en absence de pression de sélection dans la condition NT (qui sont les mutations liées à la dérive et non liées à une pression de sélection), et les mutations ayant été sélectionnées spécifiquement dans les conditions T et LT. Six mutations spécifiques aux populations thermorésistantes T ont été mises en évidence au passage 10, et huit au passage 20,

dont sept dans la protéine VP1. La mutation V232A en particulier a été sélectionnée dans deux réplicats. En revanche, seules trois mutations ont spécifiquement été observées dans la condition LT au passage 10, dans la polymérase, mais toutes ont ensuite été fixées dans l'ensemble des populations au passage 20. Au passage 20, les trois réplicats de la condition LT ont présenté la mutations F114Y, mais cette mutation ne leur est pas spécifique dans la mesure où elle a également été observée dans une population de la condition T. Ainsi, aucune mutation n'a été observée de façon exclusive chez les populations virales de la condition LT au passage 20 (Tableau S2).

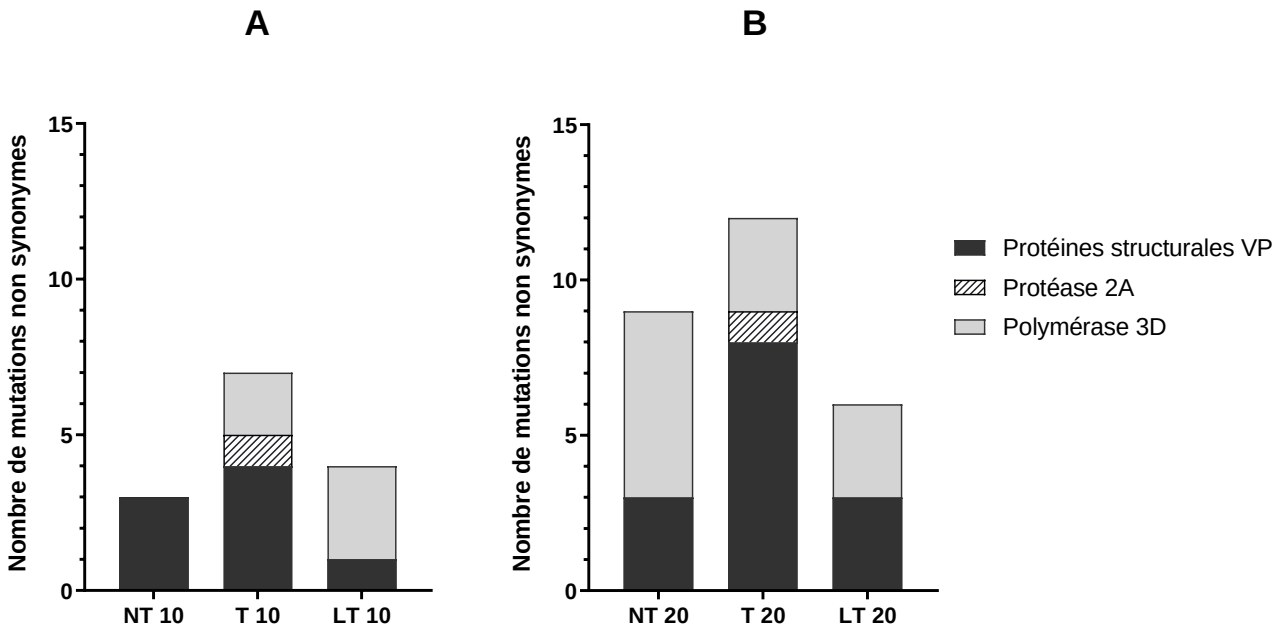


Figure 6 : Synthèse des différentes mutations non synonymes présentes chez les populations des conditions NT, T et LT aux passages 10 (A) et 20 (B).

Tableau 1 : Mutations non-synonymes chez les populations virales issues du dixième cycle d'inactivation-production. Les cases blanches correspondent à des positions non polymorphes semblables au virus de référence N0. Par soucis de clarté visuelle les mutations des populations NT, T et LT sont respectivement indiquées en vert, orange et jaune.

Protéine		Position et acide aminé de la référence N0		NT 1.10	NT 2.10	NT 3.10	T 1.10	T 2.10	T 3.10	LT 1.10	LT 2.10	LT 3.10
VP4		42	N			T						
VP1	**Feuillet B**	27	S		L							
	Feuillet D	114	F					Y			Y	Y
	Boucle G-H	209	I		V	V						
	Boucle G-H	226	G				R					
	Feuillet I	232	V						A			
	Feuillet I	237	I				F					
2A		43	S					G				
3D		371	A									T
		372	S									N
		397	D					E				
		409	K					R				
		447	T									A

Tableau 2 : Mutations non-synonymes des populations virales issues du vingtième cycle d'inactivation-production. Les cases blanches correspondent à des positions non polymorphes semblables au virus de référence N0. Les polymorphismes apparus entre le dixième et le vingtième passage sont mis en évidence par un encadrement foncé

Protéine		Acide aminé de la référence N0		NT 1.20	NT 2.20	NT 3.20	T 1.20	T 2.20	T 3.20	LT 1.20	LT 2.20	LT 3.20
VP4		42	N			T				T		
VP1	**Feuillet B**	27	S		L							
	Boucle B-C	82	H				Y					
	Boucle D-E	94	I					V				
	Feuillet D	114	F					Y		Y	Y	Y
	Boucle E-F	151	P						A			
	Boucle E-F	165	T					S				
	Boucle G-H	209	I	V	V	V				V		
	Boucle G-H	226	G				R					
	Feuillet I	232	V					A	A			
	Feuillet I	237	I				F					
2A		43	S					G				
3D		52	V		A							
		91	N		S							
		92	I		T							
		371	A	T	T	T	T	T	T	T	T	T
		372	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		447	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Discussion et conclusion

L'objet de cette étude était d'apporter des éléments sur la manière dont les virus s'adaptent à un stress thermique dans des conditions plus complexes, et donc plus proches des conditions environnementales, que celles dans lesquelles ont été conduites jusqu'à présent les évolutions expérimentales rapportées dans la littérature. Plus spécifiquement, l'objectif était de déterminer dans quelle mesure la présence de LPS modifie l'adaptation d'un entérovirus CV-B5 soumis à une inactivation thermique répétée. L'hypothèse principale était que l'adaptation des virus favoriserait davantage les mutations facilitant l'interaction avec le LPS que les mutations conférant une résistance intrinsèque à la chaleur. Il s'agit des premiers travaux s'intéressant à la MO en tant que facteur influençant la sélection des populations virales. Nous avons montré d'une part qu'en absence de LPS l'inactivation thermique induit la sélection de virus thermorésistants possédant des combinaisons de mutations dans VP1, ensuite que les interactions avec le LPS lèvent la pression de sélection en protégeant suffisamment les particules virales pour ne pas nécessiter une évolution des virus vers des phénotypes thermorésistants, et que la présence de LPS permet aux populations virales de maintenir une fitness supérieure à celles des populations qui se sont adaptées à la chaleur en devenant intrinsèquement thermorésistantes. Enfin, l'évolution des virus thermorésistants entre les cycles 10 et 20 s'est faite vers un phénotype plus résistant au détriment d'une fitness réplicative sensiblement réduite.

Les virus thermorésistants présentent plusieurs, et non une, mutations

L'expérience d'évolution a permis de sélectionner des virus ayant une résistance à 48 °C accrue par comparaison avec le phénotype sauvage N0. L'évolution vers un phénotype résistant a été un processus multi-étape, car la thermorésistance des virus issus de la condition T, déjà manifeste au dixième passage, s'est renforcée jusqu'à ce que ces populations acquièrent une résistance quasi-totale face à une inactivation d'une heure à 48 °C au vingtième passage. Au niveau des génomes, ce processus multi-étape s'est manifesté par la fixation de mutations induites par la pression de sélection. Ces mutations concernent tout particulièrement la protéine de capside VP1, aux positions 82, 94, 151, 165, 226, 232 et 237, qui touchent aussi bien les feuillets que les boucles, réputées être les structures les plus variables. Quelques mutations ont aussi été reportées dans la polymérase (3D) mais celles-ci ont également émergé chez les autres populations non traitées ou inactivées en présence de LPS. On remarque qu'au cours des vingt passages, les virus non traités NT ont évolué génétiquement, mais toutefois moins que les populations T. Les mutations observées chez les populations NT sont soit aléatoires, soit probablement liées à l'adaptation des virus à la lignée cellulaire 293A (pour celles touchant la polymérase, observées chez l'ensemble des populations). En

effet, la population initiale de virus N0 utilisée au début de cette étude avait initialement été produite sur un autre modèle cellulaire (BGMK). Dans cette étude, une lignée de cellules humaines (293A) a été utilisée car le kit de déplétion des ARNr utilisé est optimal pour l'élimination des ARNr humains.

Les phénotypes thermorésistants sont liés à une pression de sélection dirigée sur VP1

La pression de sélection exercée sur les protéines structurales, et en particulier sur VP1, est en accord avec les données de la littérature : d'une part l'inactivation thermique des virus opère en déstructurant les capsides virales, ce qui signifie que l'efficacité de l'inactivation dépend de la stabilité des capsides et donc de leur composition, et d'autre part l'ensemble des travaux ayant identifié les déterminants génétiques responsables des phénotypes thermorésistants chez les entérovirus ont mis en évidence des mutations dans les protéines de capside et en particulier dans VP1. Cependant, nous avons mis en évidence un grand nombre de mutations, tandis que la plupart des autres études ont identifié des mutations uniques. Cette différence peut être liée à l'approche expérimentale, car contrairement aux travaux précédents qui reposent pour la plupart sur un séquençage d'amplicons à partir d'extraits d'acides nucléiques totaux, nous avons mis en place une approche RNA seq afin de séquencer uniquement les génomes viraux encapsidés. De plus, les mutations identifiées dans cette étude n'ont jamais été rapportées (bien que certaines affectent les mêmes régions), probablement car les travaux précédents se sont intéressés à d'autres sérotypes. Par exemple, Shiomi *et al.* (2004) ont produit un PV (souche Sabin) résistant à 50 °C pendant 30 min dont la séquence des protéines de capside ne diffère de celle du PV sauvage que par l'acide aminé en position 87 de VP1 (V87A). Cette position est située dans une région hydrophobe du feuillet B à proximité de la boucle B-C dans laquelle nous avons identifié la mutation H82Y. La mutation V87A a aussi été observée dans l'étude d'Adeyemi *et al.*(2017) qui ont également identifié la mutation I194V de VP1 (située dans le feuillet G). Plus récemment, Nguyen *et al.*(2019) ont identifié une mutation dans la protéine VP1, M132V, suffisante pour conférer au PV un phénotype thermostable.

Les mutations V87A, I194V et M132V répertoriées dans la littérature scientifique sont toutes situées dans la poche hydrophobe du PV. Les mutations V87A, F114Y, T165S et I237S que nous avons mises en évidence sont situées à proximité de cette poche, connue chez les entérovirus pour abriter un facteur lipidique stabilisateur (le plus souvent un acide gras à courte chaîne) dont l'expulsion hors de la poche initie la décapsidation (Hogle, 2002). Le rôle de la composition de la poche hydrophobe sur la stabilité virale a été démontré chez certains entérovirus (Kelly *et al.*, 2015). En effet, selon sa composition, cette poche serait plus ou moins apte à conserver sa structure, et donc à retarder la décapsidation face des températures élevées. Ainsi, il est possible que les mutations précitées stabilisent la poche hydrophobe.

L'ensemble des mutations identifiées dans VP1 spécifiquement chez les virus thermorésistants au cycle 10 ont perduré au cours les dix cycles suivants. Le maintien de la pression de sélection sur vingt cycles a donc favorisé la stabilisation des mutations de résistance, dont l'une a émergé sur deux réplicats (V232A). Cette mutation pourrait avoir un rôle clé pour la résistance, car il s'agit de l'unique mutation mise en évidence chez la population T3.10. Parmi les autres réplicats des populations résistantes T, l'assortiment de mutations non synonymes ne permet pas de désigner une mutation particulière comme exclusivement responsable de la thermostabilité. Dans le cadre de cette étude, la résistance, en particulier à l'issue du passage 20, résulterait d'une combinaison de mutations.

Thermorésistance et fitness : un compromis bénéfice/coût

L'acquisition de premières mutations de résistance des populations T, soumises au stress thermique en absence de LPS, n'a pas eu de conséquence notable sur la fitness réplicative au cycle 10, mais la poursuite de l'adaptation des virus par un phénotype totalement thermorésistant au cycle 20 a été accompagnée d'une nette perte nette de fitness. De même, le PV mutant thermorésistant M132V évoqué ci-dessus produit, selon les auteurs, un titre infectieux *in vivo* chez la souris plus faible que celui produit par le virus sauvage, et ce mutant tend même à réverter lorsque la pression est levée (Nguyen *et al.*, 2019). Dans cette étude, l'adaptation des virus a donc engendré un coût de fitness, ce qui implique qu'en l'absence d'une pression sélection suffisante ces phénotypes ne pourraient probablement pas émerger et se maintenir face au phénotype sauvage (N0) capable de se multiplier plus efficacement. Pour le confirmer, il faudra néanmoins analyser les phénotypes de résistance et la stabilité des mutations des populations T après levée de pression de sélection.

Les mutations conférant aux virus une résistance vis-à-vis d'un traitement ne les rendent toutefois pas systématiquement moins aptes à se répliquer que les virus sauvages sensibles. Zhong *et al.* (2017b) ont même obtenu par des cycles d'inactivation-production un échovirus 11 ayant une résistance accrue au dioxyde de chlore et une fitness replicative *in vitro* supérieure au virus sauvage. Cependant, les mutations bénéfiques dans certaines conditions expérimentales en laboratoire peuvent être neutres ou délétères dans des conditions plus réalistes, ce qui explique qu'elles ne soient pas majoritaires dans les populations circulantes. La circulation des virus au sein de la population dépend de nombreux facteurs tels que la capacité à infecter un nouvel hôte, la fitness réplicative, ou encore le mode de transmission pouvant nécessiter des phases de persistance ou de résistance à certaines conditions adverses. L'adaptation des entérovirus est donc définie par de nombreux paramètres, et il est probable que, dans un environnement et des conditions données, l'avantage sélectif revienne aux virus présentant les meilleurs compromis - intégrant la persistance, la résistance, le transport, la pathogénicité et la fitness réplicative - permettant la réalisation du cycle viral.

Le LPS n'induit pas la sélection de virus thermorésistants

Les populations LT exposés à 48 °C en présence de LPS ont évolué de façon plus proche des virus non traités que de ceux soumis à une inactivation sans LPS. En effet, s'agissant des phénotypes, ces populations n'ont pas acquis de résistance après 10 cycles. Une thermorésistance a néanmoins été constatée après 10 cycles additionnels, mais d'amplitude moindre que la résistance des virus T, ce qui montre que le LPS ralentit et limite le processus d'adaptation des virus vers résistance intrinsèque. Concernant les génotypes, très peu de mutations ont été mises en évidence chez les populations LT. En effet, parmi les six mutations non synonymes répertoriées sur vingt passages, seule une (F114Y dans VP1) n'a pas été également mise en évidence chez des virus NT. On note surtout que, par leur effet protecteur, les interactions avec le LPS ont compensé la pression de sélection exercée par la chaleur sur la protéine de capside VP1. Cela a également permis aux virus de ne pas perdre en fitness réplicative. Cela signifie que lors d'une apparition d'une pression de sélection, la MO pourrait conférer un avantage sélectif immédiat permettant au virus de persister. Secondairement, les virus persistants pourraient évoluer vers un phénotype résistant

Certains acides aminés des capsides favorisent-ils l'interaction avec le LPS ?

Nous avons précédemment montré que les entérovirus interagissent de façon sérotype-dépendante avec des composants microbiens (Waldman *et al.*, 2017). Les mécanismes moléculaires précis régissant ces interactions ne sont pas encore intégralement connus. L'un des objectifs de cette étude était de déterminer si des mutations favorisant l'interaction avec le LPS pouvaient être sélectionnées. La mutation Y114F, dans le feuillet D de VP1, est la seule à avoir été fixée chez les trois réplicats de la condition LT, mais a aussi émergé dans un réplicat de la condition T. Cette mutation pourrait donc favoriser l'interaction avec le LPS, mais cette hypothèse sera à vérifier.

Robinson *et al. (*2014) ont démontré l'importance de l'acide aminé en position 99 de la protéine VP1 du PV pour l'interaction stabilisatrice avec le LPS. Ils ont noté que la mutation T99K diminue l'interaction avec le LPS à température physiologique. Dans la présente étude, l'ensemble des populations virales de CV-B5 possèdent à la position homologue (position 84) une tyrosine, qui pourrait aussi être impliquée dans l'interaction avec le LPS. Cette région est toutefois très polymorphe entre le PV et le CV-B5 (un alignement partiel des séquences de VP1 est indiqué en figure S1). Robinson *et al. (*2014) ont remarqué que, bien que la position 99 présente un polymorphisme parmi les isolats environnementaux, la mutation T99K n'en fait pas partie. Ils ont donc émis les hypothèses que cette mutation particulière confèrerait un désavantage sélectif, et plus généralement que la position 99 serait soumise à une pression de sélection favorisant les polymorphismes permettant d'établir des interactions stabilisatrices avec des composées tels que le LPS. Une expérience d'évolution sous pression de sélection avec du LPS sur d'autres sérotypes viraux

présentant de la variabilité à cette position pourrait peut-être mettre en évidence l'émergence de mutations dans cette région.

Remarques sur l'analyse des données

Au cours de la préparation des librairies pour le séquençage, les virus ont systématiquement été prétraités avec du propidium monoazide permettant d'inhiber l'amplification des génomes viraux libres ou intégrés dans des capsides perméables, et donc correspondant probablement à des particules non infectieuses. Cette étape a eu pour but de maximiser l'adéquation entre les données de séquençage et les virus réellement capables de se propager. De plus, les ARN viraux ont été séquencés par une approche RNA-seq non ciblée afin de limiter autant que possible l'apport de variabilité qu'auraient pu générer des étapes intermédiaires d'amplification et les risques de contamination croisée entre échantillons. Enfin, le choix a été fait de ne considérer que les génotypes les plus représentés. Les données de séquençage ont été analysées afin de considérer exclusivement les mutations présentes dans au moins 40 % des nucléotides séquencés à chaque position. Sous réserve d'une profondeur de séquençage suffisante, ce seuil pourrait être abaissé afin d'élargir la détection des variants à des populations minoritaires. Cependant, dans le cadre précis de ce travail visant à mettre en évidence les conséquences des interactions virus-matière organique sur la dynamique adaptative des virus soumis à une pression de sélection, il n'était pas pertinent dans un premier temps d'analyser les populations minoritaires, peu résistantes à l'inactivation thermique ou de faible fitness réplicative. De plus, la sélection a été réalisée sur vingt cycles afin de laisser le temps aux populations minoritaires présentant un phénotype plus favorable dans ces conditions expérimentales d'émerger.

Les interactions spécifiques avec les matrices organiques environnementales peuvent affecter l'élimination, l'inactivation, la persistance ou encore la circulation des virus entériques. Cette étude tend à montrer que dans des matrices environnementales complexes les virus les plus aptes à persister dans des conditions affectant la stabilité des capsides ne seraient pas les virus intrinsèquement les plus résistants, mais ceux capables d'interagir avec de la matière organique stabilisatrice de leur environnement.

Données supplémentaires

Tableau S1 : Valeurs de k (log(génome.h^{-1})) moyennes (n=3) pour l'ensemble des populations issues des passages 10 et 20. Les moyennes ± écart-types sont donnés pour chaque condition (NT, T, LT) et passage (10 et 20).

	Passage 10		Passage 20	
NT 1	0,217	0,2252 ± 0,01418	0,198	0,1847 ± 0,01307
NT 2	0,242		0,184	
NT 3	0,217		0,172	
T 1	0,191	0,1884 ± 0,02683	0,091	0,08393 ± 0,01811
T 2	0,160		0,063	
T 3	0,214		0,098	
LT 1	0,218	0,2141 ± 0,005498	0,155	0,1655 ± 0,01165
LT 2	0,217		0,164	
LT 3	0,208		0,178	

Figure S1 : Alignement des séquences partielles de VP1 du PV1 Mahoney et du CV-B5 (N0)

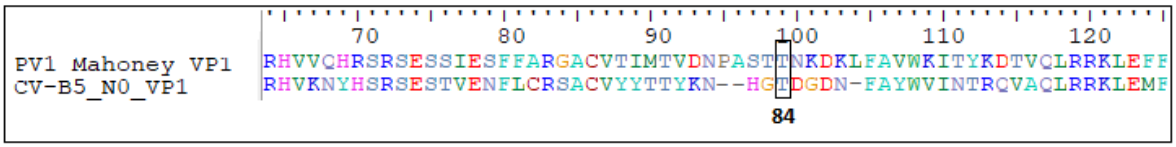


Tableau S2 : Mutations non synonymes observées parmi les populations NT, T et LT. Pour les conditions T et LT, seules les mutations observées uniquement dans la condition considérée sont reportées. Le code couleur indique le nombre de réplicats présentant chaque mutation : 1 (vert), 2 (jaune) ou 3 (orange)

				Mutations totales des populations NT		Mutations spécifiques aux populations T (T –(NT+LT))		Mutations spécifiques aux populations LT LT – (NT + T)	
Protéine		**Acide aminé de la référence N0**		**Cycle 10**	**Cycle 20**	**Cycle 10**	**Cycle 20**	**Cycle 10**	**Cycle 20**
VP4		42	N	T					
VP1	**Feuillet B**	27	S	L	L				
	Boucle B-C	82	H				Y		
	Boucle D-E	94	I				V		
	Feuillet D	114	F						
	Boucle E-F	151	P				A		
	Boucle E-F	165	T				S		
	Boucle G-H	209	I	V	V				
	Boucle G-H	226	G			R	R		
	Feuillet I	232	V			A	A		
	Feuillet I	237	I			F	F		
2A		43	S			G	G		
3D		52	V		A				
		91	N		S				
		92	I		T				
		371	A		T			T	
		372	S		N			N	
		397	D			E			
		409	K			R			
		447	T		A			A	

Conclusion du chapitre 3

L'objectif de ce troisième et dernier chapitre était d'étudier comment la matière organique stabilisatrice module la dynamique d'évolution d'une population virale sous une pression favorisant la sélection des virus aux capsides les plus stables. La pression de sélection a été appliquée sous forme d'une inactivation thermique. La température est le principal facteur responsable de l'inactivation des virus dans l'environnement et la résistance des virus à une inactivation thermique, qui dépend de la stabilité des capsides, renseigne directement sur leur capacité à persister. La matière organique utilisée dans cette étude est du LPS, un polysaccharide avec lequel les virus entériques entrent en contact dans le système digestif où il facilite la pathogénèse, et qui est également présent dans l'environnement. Nous avons montré à travers les deux premiers chapitres qu'il pourrait, avec d'autres composés organiques, y favoriser la persistance virale.

Dans cette étude, et en concordance avec des travaux publiés par différentes équipes, ce sont en particulier des mutations ciblant la protéine de capside VP1 qui ont été sélectionnées parmi les virus qui se sont adaptés en accroissant leur résistance thermique intrinsèque. La résistance a été graduellement acquise par ces virus au détriment de leur fitness réplicative. En revanche, les virus ayant bénéficié d'une protection conférée par le LPS n'ont que peu évolué génétiquement, et n'ont par conséquent pas perdu en fitness. Dans une perspective plus globale, cette observation suggère que la persistance des virus entériques et plus généralement le maintien de leur potentiel infectieux durant la phase de transmission inter-hôte pourrait être au moins autant déterminé par leur capacité à interagir avec la matière organique qui les entoure que par leur stabilité intrinsèque. En conditions de laboratoire, les virus les plus résistants ont pu être sélectionnés bien que les mutations de résistance soient délétères pour leur capacité réplicative. En conditions plus réelles, de telles mutations de résistance auraient probablement un coût de fitness trop élevé pour permettre à ces virus de se propager et de circuler dans les populations. C'est la raison pour laquelle le niveau de résistance parfois constaté chez des isolats environnementaux n'égale pas celui des mutants issus des expériences de laboratoire. Ensuite, les travaux les plus récents portant sur les interactions entre le microbiote intestinal et les virus entériques s'accordent sur le fait que les processus d'adaptation auraient conduit les virus à utiliser les bactéries afin de mieux résister à la température interne l'hôte ou favoriser l'entrée dans l'épithélium intestinal. Par analogie, ce chapitre indique que des interactions virus-matière organique conférant un avantage sélectif dans l'environnement en termes de persistance pourraient tout aussi bien être un critère de sélection naturelle.

Discussion générale et conclusion

L'objectif général de cette thèse était d'acquérir de nouvelles connaissances concernant les interactions entre les virus entériques et la MO en milieu hydrique, leurs conséquences sur l'efficacité de traitements d'inactivation et la persistance virale, ainsi que sur la dynamique d'adaptation des populations virales face à un stress.

Il a été mis en évidence que différents types de MO favorisent la persistance des entérovirus et leur confèrent une protection vis-à-vis d'une inactivation thermique ou au chlore en stabilisant la structure des capsides. Ces MO sont par exemple des polysaccharides constitutifs de la paroi des bactéries comme le LPS et le PG, ou bien plus généralement des MO dissoutes hydrophobes extraites des eaux de surface. Ce travail a également souligné que dans certaines conditions exerçant une pression de sélection sur les capsides virales, comme l'exposition à un stress thermique, la protection d'un entérovirus par de la MO stabilisatrice peut être un phénomène suppléant ou complémentant, dans nos conditions expérimentales, le processus d'adaptation par sélection des virus intrinsèquement les plus résistants.

Preuve de concept

Les deux premières études ont en particulier permis de démontrer que des interactions avec divers composés bactériens ou MO dissoutes hydrophobes affectent négativement l'efficacité de traitements d'inactivation des entérovirus. L'efficacité des méthodes d'inactivation se traduit par un abattement logarithmique du nombre de virus infectieux initialement présents. Les conditions expérimentales, incluant notamment les concentrations et paramètres d'inactivation, ont donc été choisis afin de permettre la mise en évidence d'une éventuelle protection de pouvoir infectieux d'amplitude suffisante pour être détectable sur une échelle logarithmique.

D'une part, des concentrations relativement élevées de virus et de MO, d'environ 10^6 virus/mL et 1 mg/ml respectivement, ont été utilisées en première intention pour démontrer le concept. Si une analogie devait être faite, les charges virales et concentrations en composés microbiens se rapprocheraient des conditions que l'on peut retrouver dans les eaux usées, les rejets de STEU, ou encore dans des biofilms. En effet, en considérant par exemple que 1 mg de bactéries *P. aeruginosa* correspond à 10^8 CFU (Dong-ju Kim, 2012), et que le LPS représente 1 % de la masse d'une bactérie (Mizuno and Kageyama, 1978), la concentration de 1 mg/mL de LPS représenterait approximativement 10^{10} CFU/mL. Or les concentrations en micro-organismes sont de l'ordre de 10^7 à 10^9 cellules/mL dans les eaux usées brutes, généralement plus importante encore dans les boues

activées, et de 10^6 à 10^7 cellules/mL dans les effluent traités (Foladori et al., 2010; Li et al., 2007; Radomski et al., 2011). À ce nombre doit être ajoutée la part de cellules bactériennes inertes, composées en partie par du LPS.

Des effets protecteurs, de plus faible ampleur, ont toutefois été observés dès 0,05 mg/mL de composés microbiens. De plus, une protection du CV-B5 par la MO naturelle dissoute hydrophobe a été démontrée à partir de seulement 0,1 mg/mL. Les eaux de rivière contiennent du carbone organique dissous (généralement de 1 à 10 mgC/L) mais aussi particulaire, dont les charges sont impactées par les conditions climatiques et peuvent en particulier fortement augmenter en cas de crue (Rostami et al., 2018; Tornevi et al., 2014). Enfin, des interactions ont été constatées entre le CV-B5 et des éléments présents dans différentes fractions d'eau de surface seulement dix fois plus concentrés que dans l'eau de rivière, suggérant que des associations stabilisatrices pourraient également s'établir *in situ* dans des eaux de surface. De plus, il est possible que les interactions s'établissant initialement à concentration en MO relativement élevées, par exemple dans les eaux usées, soient durables et puissent ensuite perdurer lorsque les particules virales atteignent des environnements plus pauvres en MO.

D'autre part, les inactivations thermiques ont été réalisées à 50 °C, une température permettant une inactivation de plusieurs log d'infectivité, mais assez basse pour ne pas provoquer une déstructuration totale des capsides, auquel cas aucune protection par la MO n'aurait probablement été observée. Cette température est proche de la température de transition des entérovirus à partir de laquelle les capsides perdent leur intégrité, comme l'évaluation de l'accessibilité du génome a permis de le démontrer. Bertrand *et al.* (2012) ont rapporté que les mécanismes impliqués dans la dégradation de la capside seraient les mêmes à température ambiante jusqu'à 50 °C, et que seules les cinétiques d'inactivation diffèrent. Les conditions d'incubation appliquées peuvent donc, dans une certaine mesure, être considérées comme une façon de mimer un vieillissement accéléré des capsides virales à température ambiante. Dans ce cas, il est légitime de considérer qu'une matrice hydrique stabilisant les particules virales et conférant une protection d'infectivité à 50 °C serait également capable de favoriser la persistance virale à long terme dans les conditions de température de l'environnement. Il est de plus envisageable que des concentrations inférieures à 0,1 mg/mL de MO naturelle dissoute, qui n'ont pas démontré d'effet protecteur dans ces conditions d'inactivation, pourraient néanmoins favoriser la persistance virale à température ambiante sur de longues périodes. Des co-incubations d'entérovirus et de faibles concentrations de MO s'étendant sur plusieurs jours, voire semaines, permettraient de vérifier cette hypothèse.

Nature et spécificité des interactions

Deux principales classes de composés ont montré une capacité d'interaction avec les entérovirus. La première comprend des polysaccharides microbiens incluant du LPS, du PG, ainsi que des rhamnolipides, de l'acide polygalacturonique et du β glucane. Le premier chapitre a notamment mis en évidence l'existence d'une spécificité d'interaction entre les entérovirus et certains de ces composés. En effet, parmi trois polysaccharides microbiens considérés, l'un d'entre eux n'a pas montré d'effet protecteur vis-à-vis du coxsackievirus A21. Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle ces interactions ne seraient pas liées aux propriétés physico-chimiques globales des virus et des composés, mais engageraient des motifs particuliers des capsides et molécules microbiennes. L'expérience d'évolution expérimentale n'a pas permis de prouver la participation d'un acide aminé en particulier de la capside du CV-B5 pour l'établissement de l'interaction avec le LPS, mais le rôle de la mutation F114Y sélectionnée chez les trois réplicats soumis au stress thermique en présence de LPS doit être étudié de façon plus approfondie. En revanche, l'observation d'une spécificité d'interaction est en accord avec les travaux de Robinson *et al.* (2014) qui ont mis en lumière, chez le PV, le rôle de la tyrosine située en position 99 de la protéine de capside VP1 dans l'interaction avec le LPS. Les auteurs ont en effet isolé un mutant chez qui la substitution de cet acide aminé amoindrie la capacité de liaison avec le LPS. Cette mutation est suffisante pour diminuer la stabilité du virus mutant dans les fèces par comparaison avec le PV sauvage. Par ailleurs, les mêmes auteurs ont démontré que l'interaction avec le PV est médiée par la partie polysaccharidique et non lipidique du LPS, et est particulièrement dépendante de la présence de N-acétylglucosamine, un monosaccharide également constitutif du PG. Les effets protecteurs conférés par le LPS n'impliqueraient donc pas des interactions avec la composante lipidique du LPS. Un grand nombre de sérotypes d'entérovirus étant cultivables, un criblage sur leur capacité à interagir avec un composé donné couplé à une analyse de leurs génomes pourrait renseigner sur les déterminants génétiques des interactions.

La seconde classe de composés comprend les MO naturelles dissoutes (< 0,45 µm) possédant une composante hydrophobe. Il a été mis en évidence que les interactions entre le CV-B5 et la MO sont d'autant plus persistantes que celle-ci est hydrophobe. Les MO hydrophobes ont conféré une protection d'infectivité notable après plusieurs jours d'incubation, tandis que les MO transphiliques n'ont plus montré de signe d'interaction après 24 h d'incubation. Une étude plus approfondie des effets des différentes MO dissoutes sur le comportement des particules virales permettrait d'identifier plus précisément les mécanismes mis en jeu. Il serait par exemple informatif de

déterminer si l'effet protecteur est attribuable au fait que ces MOD favorisent tout particulièrement l'agrégation des virus. Alternativement, les interactions pourraient engager des acides aminés particuliers à la surface des capsides. La comparaison des séquences protéiques de différents sérotypes d'entérovirus en fonction de leur niveau de protection pourrait en effet suggérer l'implication de certains déterminants que des approches par génétique inverse et mutagenèse dirigée viendraient éventuellement conforter. Enfin, des méthodes permettant d'étudier les interactions protéines-ligand (utilisation d'anticorps ciblé pour bloquer des sites d'interaction, résonance plasmon de surface) renseigneraient sur les mécanismes moléculaires impliqués.

Le comportement des particules virales dans les milieux hydriques environnementaux est très largement méconnu. En effet, il est possible d'étudier leur association avec des particules sédimentables en quantifiant les génomes viraux présents dans les sédiments ou dans le culot après centrifugation d'un échantillon d'eau environnementale (cette méthode peut toutefois déstabiliser les interactions les plus labiles). Toutefois, il n'existe toutefois pas de méthode d'analyse renseignant directement sur leur état libre, agrégé, ou associé à d'autres colloïdes dans les milieux aquatiques. L'approche expérimentale a permis de mettre en évidence des interactions directement par microscopie électronique à transmission, une méthode qui a l'avantage de renseigner sur le comportement individuel des particules virales mais qui ne peut pas être utilisée pour les échantillons environnementaux complexes. Les interactions pouvant s'établir dans de tels échantillons ont été étudiées indirectement à l'échelle des populations virales, à travers les effets protecteurs constatés lors d'inactivations.

Conséquences sur les traitements d'inactivation

Ces travaux suscitent plusieurs réflexions sur les conséquences des interactions entre les virus entériques et les autres éléments organiques dans le cadre de la désinfection de l'eau. L'association des virus avec d'autres éléments pourrait permettre une meilleure efficacité des procédés permettant l'élimination des particules selon des critères de taille et densité, tels que la décantation, la coagulation-floculation ou la filtration. Cependant cet effet positif sur l'élimination des virus est limité du fait que seule une fraction (10 % à 55 %) des virus est associée à des matières sédimentables dans les eaux de surface (Fauvel et al., 2017b). En contrepartie, des phénomènes de protection liés à des interactions avec de la MO dissoute ou d'autres micro-organismes pourraient amoindrir l'effet virucide des traitements, et permettraient d'expliquer les différences parfois constatées entre les abattements viraux théoriques et ceux observés au sein de filières de potabilisation. En effet, une filière complète de potabilisation des eaux de surface telle que celle de l'usine d'Orly (Figure 9), dotée d'étapes de clarification et d'une désinfection par ozonation, filtration sur charbon activé, irradiation aux UV puis chloration permet un abattement théorique d'environ 14

log de virus (OMS, 2017). Des abattements de seulement 4 log de phages et 2,5 log d'adénovirus (génomes encapsidés) sont pourtant parfois observés. S'agissant des autres virus entériques, qui ne sont jamais détectés en fin de filière, les abattements réels sont d'au moins 3,5 log. Ainsi, bien que la concentration en adénovirus humains dans l'eau produite par Eau de Paris soit trop basse pour présenter un risque sanitaire, les abattements constatés n'égalent toutefois pas les abattements théoriques attendus.

La présence de MO pourrait être l'un des facteurs contribuant au fait que l'efficacité des filières de traitement n'est pas nécessairement la résultante de la somme des efficacités des différentes étapes. Quelques études suggèrent en effet que les traitements de désinfection ne sont pas systématiquement additifs. Dans certains cas, l'utilisation séquentielle de plusieurs types de traitements conduit à des synergies. Par exemple, une pré-irradiation aux UV peut ensuite augmenter l'efficacité d'un traitement chimique au chlore ou au dioxyde de chlore (Rattanakul et al., 2015; Wang et al., 2012). Toutefois, des effets antagonistes ont également été rapportés, par exemple lors de l'utilisation successive du peroxyde d'hydrogène et des UV dans le cadre de l'inactivation des entérocoques (Koivunen, 2007). De plus, des courbes en plateau traduisant une diminution de l'inactivation virale au cours de différents modes de désinfection (chlore, dioxyde de chlore, UV) ont fréquemment été observées. Cette non-linéarité, constatée à partir d'une certaine dose, signifie pratiquement qu'il n'est pas possible d'extrapoler une valeur d'abattement fiable à partir de données collectées sur la zone de linéarité. La MO pourrait participer à ces effets de plateau en favorisant l'agrégation virale (Gerba and Betancourt, 2017c; Mattle et al., 2011), en rendant les capsides virales moins accessibles aux agents désinfectants et, comme nous l'avons montré, en stabilisant les capsides d'une destructuration complète. La fraction résistante des virus, en plus d'être constituée des agrégats et des sous-populations résistantes comme cela a été proposé dans la littérature, pourrait aussi contenir des particules virales associées à de la MO. Dans le cas particulier des biofilms se formant sur les surfaces à l'intérieur des filières et susceptibles de se décrocher, des virus humains pourraient y être piégés et être ensuite physiquement protégés des traitements oxydatifs.

Des implications sont ensuite envisageables dans le domaine de la réutilisation des eaux usées. Les eaux usées peuvent en effet être désinfectées dans les STEU équipées d'un traitement tertiaire, afin de limiter les impacts des rejets sur les milieux récepteurs dont les écosystèmes sont particulièrement fragiles. Les eaux usées sont aussi désinfectées afin de réalimenter des sources souterraines ou bien pour être directement recyclées à des fins d'irrigation. Cet usage est destiné à s'étendre dans les prochaines années dans les régions arides en Asie, en Australie, au Moyen-Orient et est déjà développé aux États-Unis pour suppléer à l'utilisation des aquifères fossiles (Hanjra et al., 2012). Les virus entériques sont le premier risque microbiologique lié à la réutilisation des eaux usées

(Sano et al., 2016). Différents objectifs d'abattement viral peuvent être établis en fonction des usages, et l'OMS recommande qu'ils soient fixés par chaque pays selon des critères prenant en compte des considérations épidémiologiques, sociologiques et économiques (WHO, 2006). Le chlore et l'acide peracétique sont les agents désinfectants les plus communément utilisés dans les STEU équipées d'un traitement tertiaire (Collivignarelli et al., 2017). Toutefois, ces STEU n'éliminent jamais la totalité des virus entériques, et n'ont pas systématiquement une efficacité suffisante pour atteindre un niveau de risque sanitaire viral acceptable dans le cadre de la réutilisation de l'eau pour l'irrigation des cultures (Gonzales-Gustavson et al., 2019).

La question de l'additivité des traitements pour la réutilisation des eaux usées se pose d'autant plus que les abattements requis sont généralement très élevés. Par exemple, dans le cadre du projet de réapprovisionnement des sources souterraines destinées à la production d'eau potable conduit par l'état de Californie, un objectif de 12 log d'abattement viral a été émis sur la base de concentrations de l'ordre de 10^5 à 10^6 virus/L dans les eaux usées domestiques brutes (CDPH (California Department of Public Health, 2014) 2014). Cependant, des concentrations en virus observées atteignant parfois 10^9 virus/L nécessiteraient que l'objectif d'abattement soit porté à 14 ou 15 log pour atteindre niveau de risque acceptable (Gerba et al., 2017). Or, des abattements de plus de 12 log d'infectivité des virus entériques ne sont pas observés expérimentalement, car l'obtention de suspensions de virus entériques avec des titres supérieurs à 10^{12} particules infectieuses/ml nécessiteraient une production quasi-industrielle et de multiples étapes de concentration.

Conséquences sur la sélection des populations virales circulantes

Le chapitre 3 a montré que la présence de matière organique stabilisatrice au cours d'un traitement thermique tend à diminuer la sélection des CV-B5 intrinsèquement les plus résistants mais de plus faible fitness replicative. Ils suggèrent que l'interaction des virus avec la matière organique pourrait être un facteur participant à la sélection des virus dans le cadre, par exemple, de la transmission indirecte par voie hydrique. Payment *et al.* (1985) ont remarqué que parmi des entérovirus isolés d'une eau potable désinfectée par chloration, seuls quelques-uns avaient une résistance intrinsèque accrue au chlore par comparaison avec la souche de laboratoire correspondante, ce qui pouvait expliquer leur présence dans l'eau produite. Les autres entérovirus isolés étaient au contraire aussi sensibles au chlore que les souches de laboratoire. Leur présence dans l'eau produite s'expliquerait par la protection conférée par l'agrégation et l'association à d'autres particules. Dans une autre étude, des poliovirus très résistants au chlore isolés d'une eau potable contenant 1 mg/L de chlore libre, ont amené dès 1980 des auteurs à mettre en garde contre l'augmentation de la résistance intrinsèque des virus en lien avec les pratiques de désinfection

(Shaffer et al., 1980). La sélection progressive de virus résistants pourrait nécessiter une adaptation des procédés de désinfection de certaines installations. La sélection des virus circulants transmis par voie hydrique résulte probablement, selon les conditions locales, de leur résistance intrinsèque et des interactions avec la MO. Des travaux tels que ceux menés par Meister *et al.* (2018), qui ont montré que les souches d'entérovirus circulantes sont plus résistantes aux traitements d'inactivation, sont encore nécessaires pour mieux évaluer l'ampleur et les implications des phénomènes de résistance. De façon analogue, des études comparant l'aptitude des souches circulantes (en contact quasi-permanent avec d'autres micro-organismes) et des souches de laboratoire (cultivées en conditions stériles) à interagir et être protégées par la MO pourraient éclairer sur l'importance réelle des interactions virus-MO pour la propagation des virus entériques.

Dans les conditions expérimentales du chapitre 3, les virus ont été exposés à des traitements sub-létaux pendant de nombreux cycles. Ils ont premièrement résisté en interagissant avec le LPS, avant qu'un phénotype partiellement thermorésistant n'émerge. Des cycles additionnels pourraient conduire les virus à une thermorésistance complète, bien qu'une fitness réplicative réduite pourrait y être associée, ou bien à un équilibre résultant à la fois d'une thermorésistance partielle et de la protection conférée par la MO. En revanche, en conditions naturelles, les traitements de désinfection sont la plupart du temps totalement létaux, et les événements de contamination par voie hydrique très rares. De plus, les virus circulants seraient soumis à une pression de sélection différente, celle du système immunitaire, conduisant potentiellement à la sélection d'autres quasi-espèces plus à mêmes de se répliquer et de se transmettre chez l'hôte. Aussi, l'émergence et le maintien de phénotypes résistants circulant au sein d'une population semblent donc relativement peu probable. Outre les défaillances industrielles, la résistance conférée par des interactions avec la MO pourrait être un phénomène essentiel à l'origine d'une contamination par voie hydrique. Le processus d'adaptation des virus transmis par l'eau présenté en Figure 15 peut ainsi être complété en intégrant les interactions avec la MO.

De telles considérations invitent à évaluer et mettre en perspective l'impact sanitaire des virus résistants aux procédés de désinfection. La caractérisation des phénotypes de résistance des virus entériques retrouvés chez les patients primo-infectés lors des épidémies à transmission hydrique avérée pourrait être informative.

Perspectives

Ces travaux suggèrent que l'efficacité des traitements de désinfection pourrait être impactée par une pollution soudaine des ressources, faisant par exemple suite à d'intenses précipitations. Il existe très peu d'informations sur les effets de protection lors d'une désinfection chimique qui ne sont pas la conséquence directe d'une demande en agent oxydant. Il sera informatif d'établir des

courbes d'inactivation complètes en présence de différentes MO d'origine environnementale comme par exemple des acides humiques ou fulviques, pour différents modes d'inactivation, et en incluant d'autres virus entériques humains.

En complément, un suivi des charges virales, le long des filières de potabilisation et au fil de l'eau renseignerait sur les abattements réels opérés par chaque étape. Il serait de plus informatif d'étudier les effets saisonniers et les conséquences des événements pluvieux sur les abattements. Ces suivis quantitatifs gagneraient à être couplés à des analyses de la diversité virale en différents points des filières, afin d'identifier l'ensemble des virus et de caractériser l'évolution des proportions des populations virales le long des filières. Dans cette optique, une méthode de séquençage non ciblée des ARN et ADN en parallèle couplée amont à un test d'intégrité serait pertinente.

Il est nécessaire de poursuivre l'étude des déterminants génétiques de résistance aux traitements des virus entériques humains, et également de mieux caractériser la sensibilité des populations virales circulantes. Des expériences d'évolutions expérimentales du CV-B5 exposé au chlore n'ont pas permis de sélectionner des populations virales résistantes au chlore après dix passages, contrairement à ce qui a été observé pour la résistance thermique. Les mécanismes de résistance de l'un et l'autre mettraient en jeu des mutations distinctes, mais la sensibilité au chlore des populations de CV-B5 thermorésistantes sera néanmoins évaluée afin de mettre en évidence une potentielle résistance croisée. On peut enfin s'interroger sur l'existence d'un lien direct entre la capacité des différents virus à interagir avec la MO et leur transmission hydrique. Les virus tirant profit d'une interaction avec leur environnement seraient les plus à même à être impliqués dans les contaminations par voie hydrique.

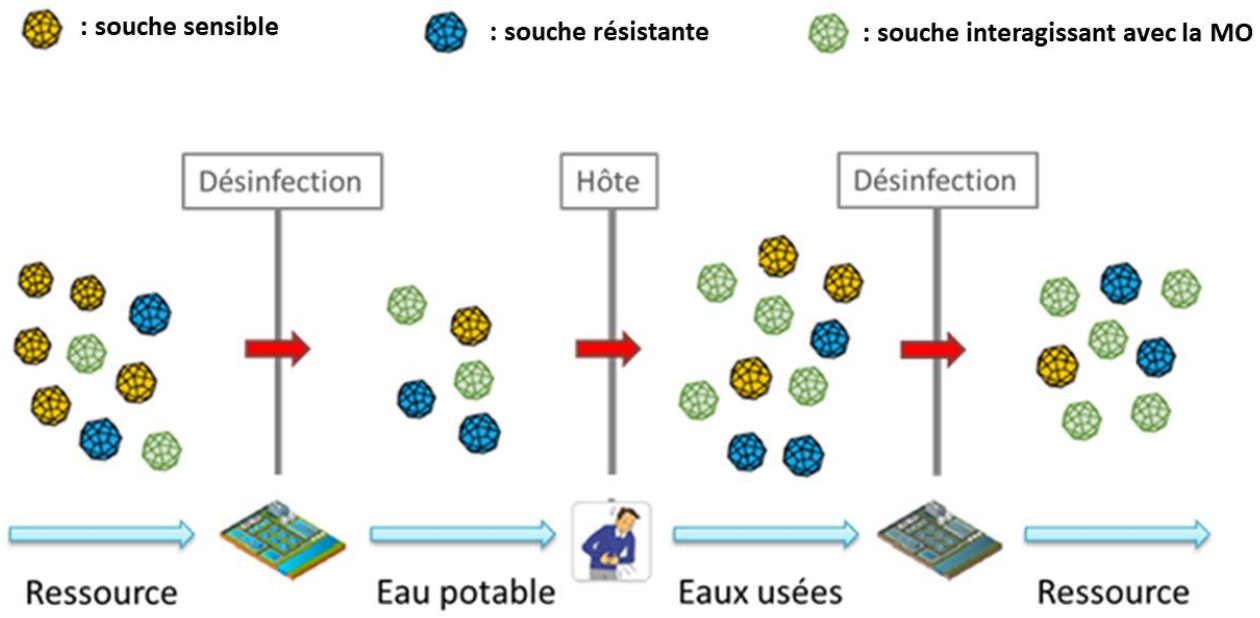


Figure 29 : Schéma conceptuel de l'adaptation des virus entériques transmis par voie hydrique, integrant la capacité des virus à interagir avec la MO (adapté de Rachmadi et *al.*(2018))

Références

Abdelnabi, R., Delang, L., Neyts, J., 2017. Glutathione is a highly efficient thermostabilizer of poliovirus Sabin strains. Vaccine 35, 1370–1372. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.01.070

Adak, A., Khan, M.R., 2019. An insight into gut microbiota and its functionalities. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 76, 473–493. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4

Adeyemi, O.O., Nicol, C., Stonehouse, N.J., Rowlands, D.J., 2017. Increasing Type 1 Poliovirus Capsid Stability by Thermal Selection. J. Virol. 91. https://doi.org/10.1128/JVI.01586-16

Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2007. Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Maisons-Alfort.

Aguilera, E.R., Nguyen, Y., Sasaki, J., Pfeiffer, J.K., 2019. Bacterial Stabilization of a Panel of Picornaviruses. mSphere 4. https://doi.org/10.1128/mSphere.00183-19

Aguilera, E.R., Pfeiffer, J.K., 2019. Strength in numbers: Mechanisms of viral co-infection. Virus Res. 265, 43–46. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.003

Aieta, E.M., Berg, J.D., 1986. A Review of Chlorine Dioxide in Drinking Water Treatment. J. Am. Water Works Assoc. 78, 62–72.

Almand, Erin A., Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2017a. Virus-Bacteria Interactions: An Emerging Topic in Human Infection. Viruses 9, 58. https://doi.org/10.3390/v9030058

Almand, Erin A., Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2017b. Norovirus Binding to Ligands Beyond Histo-Blood Group Antigens. Front. Microbiol. 8, 2549. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02549

Almand, Erin A, Moore, M.D., Outlaw, J., Jaykus, L.-A., 2017. Human norovirus binding to select bacteria representative of the human gut microbiota. PloS One 12, e0173124–e0173124. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173124

Altzibar, J.M., Zigorraga, C., Rodriguez, R., Leturia, N., Garmendia, A., Rodriguez, A., Alkorta, M., Arriola, L., 2015. Outbreak of acute gastroenteritis caused by contamination of drinking water in a factory, the Basque Country. J. Water Health 13, 168. https://doi.org/10.2166/wh.2014.048

Alvarez, M.E., Aguilar, M., Fountain, A., Gonzalez, N., Rascon, O., Saenz, D., 2000. Inactivation of MS-2 phage and poliovirus in groundwater. Can. J. Microbiol. 46, 159–165.

Alvarez, M.E., O'Brien, R.T., 1982. Mechanisms of inactivation of poliovirus by chlorine dioxide and iodine. Appl. Environ. Microbiol. 44, 1064–1071.

Amarasiri, M., Hashiba, S., Miura, T., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Ishii, S., Okabe, S., Sano, D., 2016. Bacterial histo-blood group antigens contributing to genotype-dependent removal of human noroviruses with a microfiltration membrane. Water Res. 95, 383–391. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.04.018

Ambert-Balay, K., Lorrot, M., Bon, F., Giraudon, H., Kaplon, J., Wolfer, M., Lebon, P., Gendrel, D., Pothier, P., 2008. Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. J. Clin. Microbiol. 46, 1252–1258. https://doi.org/10.1128/JCM.02140-07

ANSES, 2010. Évaluation de l'innocuité des réacteurs équipés de lampes à rayonnements ultraviolets et de l'efficacité de ces procédés pour la désinfection des eaux destinées à la consommation humaine.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.03573-15

Armanious, A., Aeppli, M., Jacak, R., Refardt, D., Sigstam, T., Kohn, T., Sander, M., 2016a. Viruses at Solid–Water Interfaces: A Systematic Assessment of Interactions Driving Adsorption. Environ. Sci. Technol. 50, 732–743. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04644

Armanious, A., Münch, M., Kohn, T., Sander, M., 2016b. Competitive Coadsorption Dynamics of Viruses and Dissolved Organic Matter to Positively Charged Sorbent Surfaces. Environ. Sci. Technol. 50, 3597–3606. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05726

Arthur, S.E., Gibson, K.E., 2015. Comparison of methods for evaluating the thermal stability of human enteric viruses. Food Environ. Virol. 7, 14–26. https://doi.org/10.1007/s12560-014-9178-9

Ashbolt, N.J., 2015. Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. Curr. Environ. Health Rep. 2, 95–106. https://doi.org/10.1007/s40572-014-0037-5

Atanasova, N.D., Dey, R., Scott, C., Li, Q., Pang, X.-L., Ashbolt, N.J., 2018. Persistence of infectious Enterovirus within free-living amoebae – A novel waterborne risk pathway? Water Res. 144, 204–214. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.023

Ausar, S.F., Foubert, T.R., Hudson, M.H., Vedvick, T.S., Middaugh, C.R., 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. J. Biol. Chem. 281, 19478–19488. https://doi.org/10.1074/jbc.M603313200

Azadpour-Keeley, A., Faulkner, B.R., Chen, J.-S., 2003. Movement and Longevity of Viruses in the Subsurface. US Environ. Prot. Agency Cincinnati Ohio.

Backer, H.D., 2017. Water Disinfection, in: The Travel and Tropical Medicine Manual. Elsevier, pp. 91–111. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37506-1.00007-6

Bae, J., Schwab, K.J., 2008. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. Appl. Environ. Microbiol. 74, 477–484. https://doi.org/10.1128/AEM.02095-06

Baldridge, M.T., Nice, T.J., McCune, B.T., Yokoyama, C.C., Kambal, A., Wheadon, M., Diamond, M.S., Ivanova, Y., Artyomov, M., Virgin, H.W., 2015. Commensal microbes and interferon-λ determine persistence of enteric murine norovirus infection. Science 347, 266–269. https://doi.org/10.1126/science.1258025

Bales, R.C., Li, S., Maguire, K.M., Yahya, M.T., Gerba, C.P., 1993. MS-2 and poliovirus transport in porous media: Hydrophobic effects and chemical perturbations. Water Resour. Res. 29, 957–963. https://doi.org/10.1029/92WR02986

Banks, W.S.L., Battigelli, D.A., 2002. Occurrence and distribution of microbiological contamination and enteric viruses in shallow ground water in Baltimore and Harford counties, Maryland (Report No. 2001–4216), Water-Resources Investigations Report. https://doi.org/10.3133/wri014216

Bányai, K., Estes, M.K., Martella, V., Parashar, U.D., 2018. Viral gastroenteritis. Lancet Lond. Engl. 392, 175–186. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31128-0

Barbeau, B., Huffman, D., Mysore, C., Desjardins, R., Clément, B., Prévost, M., 2005. Examination of discrete and counfounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* spores with chlorine dioxide. J. Environ. Eng. Sci. 4, 139–151. https://doi.org/10.1139/s04-050

Barbeau, B., Huffman, D., Mysore, C., Desjardins, R., Prévost, M., 2004. Examination of discrete and counfounding effects of water quality parameters during the inactivation of MS2 phages and *Bacillus subtilis* pores with free chlorine. J. Environ. Eng. Sci. 3, 255–268. https://doi.org/10.1139/s04-002

Barber, Larry B., Leenheer, J.A., Noyes, T.I., Stiles, E.A., 2001. Nature and Transformation of Dissolved Organic Matter in Treatment Wetlands. Environ. Sci. Technol. 35, 4805–4816. https://doi.org/10.1021/es010518i

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219

Bates, R.C., Shaffer, P.T., Sutherland, S.M., 1977. Development of poliovirus having increased resistance to chlorine inactivation. Appl. Environ. Microbiol. 34, 849–853.

Battigelli, D.A., Sobsey, M.D., Lobe, D.C., 1993. The Inactivation of Hepatitis a Virus and other Model Viruses by UV Irradiation. Water Sci. Technol. 27, 339–342. https://doi.org/10.2166/wst.1993.0371

Bawden, F.C., Pirie, N.W., 1938. Aggregation of Purified Tobacco Mosaic Virus. Nature 142, 842–843. https://doi.org/10.1038/142842a0

Beck, S.E., Hull, N.M., Poepping, C., Linden, K.G., 2018. Wavelength-Dependent Damage to Adenoviral Proteins Across the Germicidal UV Spectrum. Environ. Sci. Technol. 52, 223–229. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04602

Beck, S.E., Rodriguez, R.A., Hawkins, M.A., Hargy, T.M., Larason, T.C., Linden, K.G., 2015. Comparison of UV-Induced Inactivation and RNA Damage in MS2 Phage across the Germicidal UV Spectrum. Appl. Environ. Microbiol. 82, 1468–1474. https://doi.org/10.1128/AEM.02773-15

Beer, K.D., Gargano, J.W., Roberts, V.A., Hill, V.R., Garrison, L.E., Kutty, P.K., Hilborn, E.D., Wade, T.J., Fullerton, K.E., Yoder, J.S., 2015. Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water - United States, 2011-2012. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 64, 842–848.

Bellou, M.I., Syngouna, V.I., Tselepi, M.A., Kokkinos, P.A., Paparrodopoulos, S.C., Vantarakis, A., Chrysikopoulos, C.V., 2015. Interaction of human adenoviruses and coliphages with kaolinite and bentonite. Sci. Total Environ. 517, 86–95. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.036

Belnap, D.M., Filman, D.J., Trus, B.L., Cheng, N., Booy, F.P., Conway, J.F., Curry, S., Hiremath, C.N., Tsang, S.K., Steven, A.C., Hogle, J.M., 2000. Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. J. Virol. 74, 1342–1354. https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1342-1354.2000

Benarde, M.A., Israel, B.M., Olivieri, V.P., Granstrom, M.L., 1965. Efficiency of chlorine dioxide as a bactericide. Appl Env. Microbiol 13, 776–780.

Berg, G., Sanjaghsaz, H., 1995. KCl potentiated inactivation of poliovirus 1 by free chlorine at pH 4.5. J. Virol. Methods 53, 113–119.

Berg, G., Sanjaghsaz, H., Wangwongwatana, S., 1990. KCl potentiation of the virucidal effectiveness of free chlorine at pH 9.0. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1571–1575.

Berger, A.K., Mainou, B.A., 2018. Interactions between Enteric Bacteria and Eukaryotic Viruses Impact the Outcome of Infection. Viruses 10. https://doi.org/10.3390/v10010019

Berger, A.K., Yi, H., Kearns, D.B., Mainou, B.A., 2017a. Bacteria and bacterial envelope components enhance mammalian reovirus thermostability. PLoS Pathog. 13, e1006768. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006768

Berger, A.K., Yi, H., Kearns, D.B., Mainou, B.A., 2017b. Bacteria and bacterial envelope components enhance mammalian reovirus thermostability. PLoS Pathog. 13, e1006768. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006768

Berkhout, B., 2015. With a Little Help from my Enteric Microbial Friends. Front. Med. 2, 30. https://doi.org/10.3389/fmed.2015.00030

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: Virus inactivation. J. Appl. Microbiol. 112, 1059–1074. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x

Betancourt, W.Q., Rose, J.B., 2004. Drinking water treatment processes for removal of Cryptosporidium and Giardia. Vet. Parasitol. 126, 219–234. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.002

Bhar, S., Jones, M.K., 2019. In Vitro Replication of Human Norovirus. Viruses 11. https://doi.org/10.3390/v11060547

Bidawid, S., Farber, J.M., Sattar, S.A., Hayward, S., 2000. Heat inactivation of hepatitis A virus in dairy foods. J. Food Prot. 63, 522–528.

Bieroza, M.Z., Bridgeman, J., Baker, A., 2010. Fluorescence spectroscopy as a tool for determination of organic matter removal efficiency at water treatment works. Drink. Water Eng. Sci. 3, 63–70. https://doi.org/10.5194/dwes-3-63-2010

Bitton, G., Chou, Y.J., Farrah, S.R., 1982. Techniques for virus detection in aquatic sediments. J. Virol. Methods 4, 1–8.

Bitton, G., Mitchell, R., 1974. Effect of colloids on the survival of bacteriophages in seawater. Water Res. 8, 227–229. https://doi.org/10.1016/0043-1354(74)90159-6

Black, S., Thurston, J.A., Gerba, C.P., 2009. Determination of Ct values for chlorine of resistant enteroviruses. J. Environ. Sci. Health Part A 44, 336–339. https://doi.org/10.1080/10934520802659653

Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A., Beach, M.J., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC 2002 53, 23–45.

Boardman, G.D., Sproul, O.J., 1977. Protection of viruses during disinfection by adsorption to particulate matter. J. - Water Pollut. Control Fed. 49, 1857–1861.

Boccia, D., Tozzi, A.E., Cotter, B., Rizzo, C., Russo, T., Buttinelli, G., Caprioli, A., Marziano, M.L., Ruggeri, F.M., 2002. Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. Emerg. Infect. Dis. 8, 563–568. https://doi.org/10.3201/eid0806.010371

Bosch, A., Pintó, R.M., Guix, S., 2014. Human Astroviruses. Clin. Microbiol. Rev. 27, 1048. https://doi.org/10.1128/CMR.00013-14

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. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.020

Bozkurt, H., D'Souza, D.H., Davidson, P.M., 2015. Thermal Inactivation Kinetics of Human Norovirus Surrogates and Hepatitis A Virus in Turkey Deli Meat. Appl. Environ. Microbiol. 81, 4850. https://doi.org/10.1128/AEM.00874-15

Bozkurt, H., D'Souza, D.H., Davidson, P.M., 2013. Determination of the thermal inactivation kinetics of the human norovirus surrogates, murine norovirus and feline calicivirus. J. Food Prot. 76, 79–84. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-327

Braeye, T., De Schrijver, K., Wollants, E., van RANST, M., Verhaegen, J., 2015. A large community outbreak of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010. Epidemiol. Infect. 143, 711–719. https://doi.org/10.1017/S0950268814001629

Breindl, M., 1971. The structure of heated poliovirus particles. J. Gen. Virol. 11, 147–156. https://doi.org/10.1099/0022-1317-11-3-147

Breitenmoser, A., Fretz, R., Schmid, J., Besl, A., Etter, R., 2011. Outbreak of acute gastroenteritis due to a washwater-contaminated water supply, Switzerland, 2008. J. Water Health 9, 569–576. https://doi.org/10.2166/wh.2011.158

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. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9248-2

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

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

Broo, K., Wei, J., Marshall, D., Brown, F., Smith, T.J., Johnson, J.E., Schneemann, A., Siuzdak, G., 2001. Viral capsid mobility: a dynamic conduit for inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 2274–2277. https://doi.org/10.1073/pnas.051598298

Bruu, A.-L., 2002. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses, in: Haaheim, L.R., Pattison, J.R., Whitley, R.J. (Eds.), A Practical Guide to Clinical Virology. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 44–45. https://doi.org/10.1002/0470857285.ch6

Busta, F.F., Suslow, T.V., Parish, M.E., Beuchat, L.R., Farber, J.N., Garrett, E.H., Harris, L.J., 2003. The Use of Indicators and Surrogate Microorganisms for the Evaluation of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2, 179–185. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00035.x

Butler, M., Medien, A., Taylor, G., 1985. Electrofocusing of viruses and sensitivity to disinfection. Water Sci. Technol. 17, 201–210.

Cabaj, A., Sommer, R., Schoenen, D., 1996. Biodosimetry: Model calculations for u.v. water disinfection devices with regard to dose distributions. Water Res. 30, 1003–1009. https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00256-1

Caballero, S., Abad, F.X., Loisy, F., Le Guyader, F.S., Cohen, J., Pintó, R.M., Bosch, A., 2004. Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3904–3909. https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3904-3909.2004

Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V.A., Bofill-Mas, S., Miagostovich, M., Girones, R., 2013. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. Water Res. 47, 2797–2810. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.043

Candy, D.C.A., 2007. Rotavirus infection: a systemic illness? PLoS Med. 4, e117. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040117

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: aA comparison of murine norovirus and feline calicivirus. J. Food Prot. 69, 2761–2765.

Cao, H., Tsai, F.T.-C., Rusch, K.A., 2010. Salinity and Soluble Organic Matter on Virus Sorption in Sand and Soil Columns. Ground Water 48, 42–52. https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2009.00645.x

Capodaglio, A., 2005. Improving Sewage Treatment Plant Performance in Wet Weather. pp. 175–185. https://doi.org/10.1007/1-4020-2694-3_15

Cardemil, C.V., Parashar, U.D., Hall, A.J., 2017. Norovirus Infection in Older Adults: Epidemiology, Risk Factors, and Opportunities for Prevention and Control. Infect. Dis. Clin. North Am. 31, 839–870. https://doi.org/10.1016/j.idc.2017.07.012

Carratalà, A., Shim, H., Zhong, Q., Bachmann, V., Jensen, J.D., Kohn, T., 2017. Experimental adaptation of human echovirus 11 to ultraviolet radiation leads to resistance to disinfection and ribavirin. Virus Evol. 3. https://doi.org/10.1093/ve/vex035

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.

Carter, M.J., 2005. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. J. Appl. Microbiol. 98, 1354–1380. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02635.x

CDPH (California Department of Public Health), 2014. Regulations Related to Recycled Water—June 18, 2014 (revisions effective on 6/18/14).

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. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04150.x

Chen, J., Ye, X., Zhang, X.-Y., Zhu, Z., Zhang, X., Xu, Z., Ding, Z., Zou, G., Liu, Q., Kong, L., Jiang, W., Zhu, W., Cong, Y., Huang, Z., 2019. Coxsackievirus A10 atomic structure facilitating the discovery

of a broad-spectrum inhibitor against human enteroviruses. Cell Discov. 5, 4. https://doi.org/10.1038/s41421-018-0073-7

Chia, J.K.S., Chia, A.Y., 2008. Chronic fatigue syndrome is associated with chronic enterovirus infection of the stomach. J. Clin. Pathol. 61, 43. https://doi.org/10.1136/jcp.2007.050054

Chick, H., 1908. An Investigation of the Laws of Disinfection. J. Hyg. (Lond.) 8, 92–158. https://doi.org/10.1017/s0022172400006987

Cho, M., Gandhi, V., Hwang, T.-M., Lee, S., Kim, J.-H., 2011. Investigating synergism during sequential inactivation of MS-2 phage and Bacillus subtilis spores with UV/H2O2 followed by free chlorine. Water Res. 45, 1063–1070. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.014

Cifuente, J.O., Lee, H., Yoder, J.D., Shingler, K.L., Carnegie, M.S., Yoder, J.L., Ashley, R.E., Makhov, A.M., Conway, J.F., Hafenstein, S., 2013. Structures of the Procapsid and Mature Virion of Enterovirus 71 Strain 1095. J. Virol. 87, 7637. https://doi.org/10.1128/JVI.03519-12

Collivignarelli, C.M., Abbà, A., Alloisio, G., Gozio, E., Benigna, I., 2017. Disinfection in Wastewater Treatment Plants: Evaluation of Effectiveness and Acute Toxicity Effects. Sustainability 9. https://doi.org/10.3390/su9101704

Cook, N. (Ed.), 2013. Viruses in food and water: risks, surveillance and control, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, Cambridge, UK ; Philadelphia, PA.

Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M.I., El-Attar, L., Gray, J., 2004. The zoonotic potential of rotavirus. J. Infect. 48, 289–302. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.01.018

Corcoran, M.S., van Well, G.T.J., van Loo, I.H.M., 2014. Diagnosis of viral gastroenteritis in children: interpretation of real-time PCR results and relation to clinical symptoms. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. 33, 1663–1673. https://doi.org/10.1007/s10096-014-2135-6

Crawford, S.E., Ramani, S., Tate, J.E., Parashar, U.D., Svensson, L., Hagbom, M., Franco, M.A., Greenberg, H.B., O'Ryan, M., Kang, G., Desselberger, U., Estes, M.K., 2017. Rotavirus infection. Nat. Rev. Dis. Primer 3, 17083. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83

Cristina, J., Costa-Mattioli, M., 2007. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. Virus Res. 127, 151–157. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.01.005

Cromeans, T.L., Kahler, A.M., Hill, V.R., 2010. Inactivation of Adenoviruses, Enteroviruses, and Murine Norovirus in Water by Free Chlorine and Monochloramine. Appl. Environ. Microbiol. 76, 1028–1033. https://doi.org/10.1128/AEM.01342-09

Cronier, S., Scarpino, P.V., Zink, M.L., 1978. Chlorine dioxide destruction of viruses and bacteria in water, in: Water Chlorination: Environmental Impacts and Health Effects, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Mich. .In R. L. Jolly, H. Gorchev, and D. M. Hamilton, pp. 651–658.

Crook, E.M., Sheffield, F.M.L., 1946. Electron-microscopy of viruses; state of aggregation of tobacco mosaic virus. Br. J. Exp. Pathol. 27, 328–338.

Curry, S., Chow, M., Hogle, J.M., 1996. The poliovirus 135S particle is infectious. J. Virol. 70, 7125–7131.

Dalle, F., Roz, P., Dautin, G., Di-Palma, M., Kohli, E., Sire-Bidault, C., Fleischmann, M.G., Gallay, A., Carbonel, S., Bon, F., Tillier, C., Beaudeau, P., Bonnin, A., 2003. Molecular characterization of isolates of waterborne Cryptosporidium spp. collected during an outbreak of gastroenteritis in South Burgundy, France. J. Clin. Microbiol. 41, 2690–2693. https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2690-2693.2003

Danes, L., Cerva, L., 1981. Survival of polioviruses and echoviruses in Acanthamoeba castellanii cultivated in vitro. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 25, 169–174.

Dawley, C., Gibson, K.E., 2019. Virus-Bacteria Interactions: Implications for Prevention and Control of Human Enteric Viruses from Environment to Host. Foodborne Pathog. Dis. 16, 81–89. https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2543

De Giglio, O., Caggiano, G., Bagordo, F., Barbuti, G., Brigida, S., Lugoli, F., Grassi, T., La Rosa, G., Lucentini, L., Uricchio, V.F., De Donno, A., Montagna, M.T., 2017. Enteric Viruses and Fecal

Bacteria Indicators to Assess Groundwater Quality and Suitability for Irrigation. Int. J. Environ. Res. Public. Health 14. https://doi.org/10.3390/ijerph14060558

de Melo, B.A.G., Motta, F.L., Santana, M.H.A., 2016. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. Mater. Sci. Eng. C 62, 967–974. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.001

de Visser, J.A.G.M., Hermisson, J., Wagner, G.P., Ancel Meyers, L., Bagheri-Chaichian, H., Blanchard, J.L., Chao, L., Cheverud, J.M., Elena, S.F., Fontana, W., Gibson, G., Hansen, T.F., Krakauer, D., Lewontin, R.C., Ofria, C., Rice, S.H., von Dassow, G., Wagner, A., Whitlock, M.C., 2003. Perspective: Evolution and detection of genetic robustness. Evol. Int. J. Org. Evol. 57, 1959–1972.

Deboosere, N., Legeay, O., Caudrelier, Y., Lange, M., 2004. Modelling effect of physical and chemical parameters on heat inactivation kinetics of hepatitis A virus in a fruit model system. Int. J. Food Microbiol. 93, 73–85. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.015

Desselberger, U., 2014. Rotaviruses. Virus Res. 190, 75–96. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016

Dika, C., Duval, J.F.L., Ly-Chatain, H.M., Merlin, C., Gantzer, C., 2011. Impact of Internal RNA on Aggregation and Electrokinetics of Viruses: Comparison between MS2 Phage and Corresponding Virus-Like Particles. Appl. Environ. Microbiol. 77, 4939–4948. https://doi.org/10.1128/AEM.00407-11

Domingo, E., Holland, J.J., 1997. RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. Annu. Rev. Microbiol. 51, 151–178. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.151

Dong-ju Kim, 2012. Relation of microbial biomass to counting units for Pseudomonas aeruginosa. Afr. J. Microbiol. Res. 6. https://doi.org/10.5897/AJMR10.902

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8, 881–890. https://doi.org/10.3201/eid0809.020063

Dóró, R., Farkas, S.L., Martella, V., Bányai, K., 2015. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 13, 1337–1350. https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1089171

Dorval, B.L., Chow, M., Klibanov, A.M., 1989. Stabilization of poliovirus against heat inactivation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 1177–1183. https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)92234-1

Dow, S.M., Barbeau, B., von Gunten, U., Chandrakanth, M., Amy, G., Hernandez, M., 2006. The impact of selected water quality parameters on the inactivation of Bacillus subtilis spores by monochloramine and ozone. Water Res. 40, 373–382. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.018

Downes, A., 1879. IV. On the influence of light upon protoplasm. Proc. R. Soc. Lond. 28, 199–212. https://doi.org/10.1098/rspl.1878.0109

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. https://doi.org/10.1128/AEM.01067-15

El Bakkouri, M., Fabry, C.M., Fender, P., Schoehn, G., 2008. Structure des adénovirus. Virologie 275–292.

Elena, S.F., Sanjuán, R., 2005. Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences. J. Virol. 79, 11555–11558. https://doi.org/10.1128/JVI.79.18.11555-11558.2005

Elmahdy, E.M., Fongaro, G., Schissi, C.D., Petrucio, M.M., Barardi, C.R.M., 2016. Enteric viruses in surface water and sediment samples from the catchment area of Peri Lagoon, Santa Catarina State, Brazil. J. Water Health 14, 142–154. https://doi.org/10.2166/wh.2015.295

Emerson, M.A., Sproul, O.J., Buck, C.E., 1982. Ozone inactivation of cell-associated viruses. Appl. Environ. Microbiol. 43, 603–608.

Engelbrecht, R.S., Weber, M.J., Salter, B.L., Schmidt, C.A., 1980. Comparative inactivation of viruses by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 40, 249–256.

Erickson, A.K., Jesudhasan, P.R., Mayer, M.J., Narbad, A., Winter, S.E., Pfeiffer, J.K., 2018. Bacteria Facilitate Enteric Virus Co-infection of Mammalian Cells and Promote Genetic Recombination. Cell Host Microbe 23, 77-88.e5. https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.11.007

Espinosa, A.C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., Arias, C.F., 2008. Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. Water Res. 42, 2618–2628. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.01.018

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. https://doi.org/10.1128/AEM.07081-11

Estes, M.K., Graham, D.Y., Smith, E.M., Gerba, C.P., 1979. Rotavirus stability and inactivation. J. Gen. Virol. 43, 403–409. https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-2-403

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. https://doi.org/10.1126/science.aaf5211

Fan, L., Harris, J.L., Roddick, F.A., Booker, N.A., 2001. Influence of the characteristics of natural organic matter on the fouling of microfiltration membranes. Water Res. 35, 4455–4463.

Fang, J., Liu, H., Shang, C., Zeng, M., Ni, M., Liu, W., 2014. E. coli and bacteriophage MS2 disinfection by UV, ozone and the combined UV and ozone processes. Front. Environ. Sci. Eng. 8, 547–552. https://doi.org/10.1007/s11783-013-0620-2

Faou, A.L., 2012. Virologie humaine. Pradel.

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

Farkas, K., Marshall, M., Cooper, D., McDonald, J.E., Malham, S.K., Peters, D.E., Maloney, J.D., Jones, D.L., 2018b. Seasonal and diurnal surveillance of treated and untreated wastewater for human enteric viruses. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 25, 33391–33401. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3261-y

Farkas, T., Sestak, K., Wei, C., Jiang, X., 2008. Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. J. Virol. 82, 5408–5416. https://doi.org/10.1128/JVI.00070-08

Farooq, S., Akhlaque, S., 1983. Comparative response of mixed cultures of bacteria and virus to ozonation. Water Res. 17, 809–812. https://doi.org/10.1016/0043-1354(83)90076-3

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. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9266-0

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. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.115

Fennell, R., Phillips, B.A., 1974. Polypeptide composition of urea- and heat-resistant mutants of poliovirus types 1 and 2. J. Virol. 14, 821–833.

Fernandes, T.M.A., Schout, C., De Roda Husman, A.M., Eilander, A., Vennema, H., van Duynhoven, Y.T.H.P., 2007. Gastroenteritis associated with accidental contamination of drinking water with partially treated water. Epidemiol. Infect. 135, 818–826. https://doi.org/10.1017/S0950268806007497

Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., 2007. Fields' virology, 5th ed. ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Finch, G.R., Fairbairn, N., 1991a. Comparative inactivation of poliovirus type 3 and MS2 coliphage in demand-free phosphate buffer by using ozone. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3121–3126.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.07569-11

Floyd, R., 1979. Viral aggregation: mixed suspensions of poliovirus and reovirus. Appl. Environ. Microbiol. 38, 980–986.

Floyd, R., Sharp, D.G., 1979. Viral aggregation: buffer effects in the aggregation of poliovirus and reovirus at low and high pH. Appl. Environ. Microbiol. 38, 395–401.

Floyd, R., Sharp, D.G., 1978. Viral aggregation: effects of salts on the aggregation of poliovirus and reovirus at low pH. Appl. Environ. Microbiol. 35, 1084–1094.

Floyd, R., Sharp, D.G., 1977. Aggregation of poliovirus and reovirus by dilution in water. Appl. Environ. Microbiol. 33, 159–167.

Foladori, P., Bruni, L., Tamburini, S., Ziglio, G., 2010. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry. Water Res. 44, 3807–3818. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.027

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. MMBR 69, 357–371. https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.357-371.2005

Fout, G.S., Borchardt, M.A., Kieke, B.A., Karim, M.R., 2017. Human virus and microbial indicator occurrence in public-supply groundwater systems: meta-analysis of 12 international studies. Hydrogeol. J. 25, 903–919. https://doi.org/10.1007/s10040-017-1581-5

Fretz, R., Svoboda, P., LüThi, T.M., Tanner, M., Baumgartner, A., 2005. Outbreaks of gastroenteritis due to infections with Norovirus in Switzerland, 2001–2003. Epidemiol. Infect. 133, 429–437. https://doi.org/10.1017/S0950268804003619

Fricks, C.E., Hogle, J.M., 1990. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. J. Virol. 64, 1934–1945.

Fujioka, R.S., Loh, P.C., Lau, L.S., 1980. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 39, 1105–1110.

Galazka, A., Milstien, J., Zaffran, M., WHO Global Programme for Vaccines and Immunization, 1998. Thermostability of vaccines.

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. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01441.x

Gault, E., Garbarg-Chenon, A., 2000. Épidémiologie moléculaire des rotavirus. Rev. Fr. Lab. 2000, 55–62. https://doi.org/10.1016/S0338-9898(00)80397-2

Gerba, C.P., 1984 Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces, in: Advances in Applied Microbiology. Elsevier, pp. 133–168.

Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., 2017 Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. Environ. Sci. Technol. 51, 7318–7325. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05835

Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., 2017. How much reduction of virus is needed for recycled water: A continuous changing need for assessment? Water Res. 108, 25–31. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.020

Gerba, C.P., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., Rock, C.M., 2018. Reducing uncertainty in estimating virus reduction by advanced water treatment processes. Water Res. 133, 282–288. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.044

Gerba, C.P., Gramos, D.M., Nwachuku, N., 2002. Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light. Appl. Environ. Microbiol. 68, 5167–5169. https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5167-5169.2002

Gerba, C.P., Rose, J.B., Haas, C.N., Crabtree, K.D., 1996. Waterborne rotavirus: A risk assessment. Water Res. 30, 2929–2940. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00187-X

Gerba, C.P., Smith, E.M., Melnick, J.L., 1977. Development of a quantitative method for detecting enteroviruses in estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 34, 158–163.

Ghernaout, D., 2018. Disinfection and DBPs Removal in Drinking Water Treatment: A Perspective for a Green Technology. Int. J. Adv. Appl. Sci. 5, 108–117. https://doi.org/10.21833/ijaas.2018.02.018

Giammanco, G.M., Bonura, F., Urone, N., Purpari, G., Cuccia, M., Pepe, A., Li Muli, S., Cappa, V., Saglimbene, C., Mandolfo, G., Marino, A., Guercio, A., Di Bartolo, I., De Grazia, S., 2018. Waterborne Norovirus outbreak at a seaside resort likely originating from municipal water distribution system failure. Epidemiol. Infect. 146, 879–887. https://doi.org/10.1017/S095026881800081X

Giammanco, G.M., Di Bartolo, I., Purpari, G., Costantino, C., Rotolo, V., Spoto, V., Geraci, G., Bosco, G., Petralia, A., Guercio, A., Macaluso, G., Calamusa, G., De Grazia, S., Ruggeri, F.M., Vitale, F., Maida, C.M., Mammina, C., 2014. Investigation and control of a Norovirus outbreak of probable waterborne transmission through a municipal groundwater system. J. Water Health 12, 452–464. https://doi.org/10.2166/wh.2014.227

Gibson, K.E., Crandall, P.G., Ricke, S.C., 2012. Removal and transfer of viruses on food contact surfaces by cleaning cloths. Appl. Environ. Microbiol. 78, 3037–3044. https://doi.org/10.1128/AEM.00027-12

Gibson, K.E., Schwab, K.J., 2011. Thermal Inactivation of Human Norovirus Surrogates. Food Environ. Virol. 3, 74–77. https://doi.org/10.1007/s12560-011-9059-4

Glass, R.I., Parashar, U.D., Estes, M.K., 2009. Norovirus gastroenteritis. N. Engl. J. Med. 361, 1776–1785. https://doi.org/10.1056/NEJMra0804575

Godoy, P., Nuín, C., Alsedà, M., Llovet, T., Mazana, R., Domínguez, A., 2006. [Waterborne outbreak of gastroenteritis caused by Norovirus transmitted through drinking water]. Rev. Clin. Esp. 206, 435–437.

Goldsmith, C.S., Miller, S.E., 2009. Modern Uses of Electron Microscopy for Detection of Viruses. Clin. Microbiol. Rev. 22, 552–563. https://doi.org/10.1128/CMR.00027-09

Gonzales-Gustavson, E., Rusiñol, M., Medema, G., Calvo, M., Girones, R., 2019. Quantitative risk assessment of norovirus and adenovirus for the use of reclaimed water to irrigate lettuce in Catalonia. Water Res. 153, 91–99. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.070

Goodridge, L., Goodridge, C., Wu, J., Griffiths, M., Pawliszyn, J., 2004. Isoelectric point determination of norovirus virus-like particles by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. Anal. Chem. 76, 48–52.

Gordon, C., Toze, S., 2003. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. J. Appl. Microbiol. 95, 536–544. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02010.x

Gray, N.F., 2014. Chlorine Dioxide, in: Microbiology of Waterborne Diseases. Elsevier, pp. 591–598. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00032-9

Guo, H., Chu, X., Hu, J., 2010. Effect of host cells on low- and medium-pressure UV inactivation of adenoviruses. Appl. Environ. Microbiol. 76, 7068–7075. https://doi.org/10.1128/AEM.00185-10

Gutierrez, L., Nguyen, T.H., 2013. Interactions between Rotavirus and Natural Organic Matter Isolates with Different Physicochemical Characteristics. Langmuir 29, 14460–14468. https://doi.org/10.1021/la402893b

Gutierrez, L., Nguyen, T.H., 2012. Interactions between Rotavirus and Suwannee River Organic Matter: Aggregation, Deposition, and Adhesion Force Measurement. Environ. Sci. Technol. 46, 8705–8713. https://doi.org/10.1021/es301336u

Haas, C.N., 2014. Quantitative microbial risk assessment. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.

Haas, C.N., 2002. Conditional dose-response relationships for microorganisms: development and application. Risk Anal. Off. Publ. Soc. Risk Anal. 22, 455–463.

Haas, C.N., Joffe, J., Anmangandla, U., Jacangelo, J.G., Heath, M., 1996. Water quality and disinfection kinetics. J. - Am. Water Works Assoc. 88, 95–103. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1996.tb06522.x

Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C.P., 1999. Quantitative microbial risk assessment. Wiley, New York, NY.

Hallin, E., 2012. Norovirus i vatten – en litteraturstudie (Norovirus in water – a literature review). Sven. Vatten Utveckl. Stockh.

Hamza, I.A., Bibby, K., 2019. Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. J. Virol. Methods 266, 11–24. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.01.008

Hamza, I.A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M., 2011. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 424–436. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.07.014

Han, L., Tan, M., Xia, M., Kitova, E.N., Jiang, X., Klassen, J.S., 2014. Gangliosides are ligands for human noroviruses. J. Am. Chem. Soc. 136, 12631–12637. https://doi.org/10.1021/ja505272n

Hanjra, M.A., Blackwell, J., Carr, G., Zhang, F., Jackson, T.M., 2012. Wastewater irrigation and environmental health: implications for water governance and public policy. Int. J. Hyg. Environ. Health 215, 255–269. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.10.003

Harakeh, M., Butler, M., 1984. Inactivation of human rotavirus, SA11 and other enteric viruses in effluent by disinfectants. J. Hyg. (Lond.) 93, 157–163. https://doi.org/10.1017/s0022172400061040

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Koibuchi, Y., Furumai, H., Ohgaki, S., 2006. Effects of rainfall on the occurrence of human adenoviruses, total coliforms, and Escherichia coli in seawater. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 54, 225–230.

Haramoto, E., Otagiri, M., 2014. Occurrence of Human Cosavirus in Wastewater and River Water in Japan. Food Environ. Virol. 6, 62–66. https://doi.org/10.1007/s12560-013-9120-6

Harrington, P.R., Lindesmith, L., Yount, B., Moe, C.L., Baric, R.S., 2002. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice. J. Virol. 76, 12335–12343. https://doi.org/10.1128/jvi.76.23.12335-12343.2002

Hassard, F., Gwyther, C.L., Farkas, K., Andrews, A., Jones, V., Cox, B., Brett, H., Jones, D.L., McDonald, J.E., Malham, S.K., 2016. Abundance and Distribution of Enteric Bacteria and Viruses in Coastal and Estuarine Sediments—a Review. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01692

Hata, A., Hanamoto, S., Ihara, M., Shirasaka, Y., Yamashita, N., Tanaka, H., 2018. Comprehensive Study on Enteric Viruses and Indicators in Surface Water in Kyoto, Japan, During 2014-2015 Season. Food Environ. Virol. 10, 353–364. https://doi.org/10.1007/s12560-018-9355-3

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. https://doi.org/10.1111/jam.12051

Hejkal, T.W., Wellings, F.M., LaRock, P.A., Lewis, A.L., 1979. Survival of poliovirus within organic solids during chlorination. Appl. Environ. Microbiol. 38, 114–118.

Helmi, K., Menard-Szczebara, F., Lénès, D., Jacob, P., Jossent, J., Barbot, C., Delabre, K., Arnal, C., 2010. Adenovirus, MS2 and PhiX174 interactions with drinking water biofilms developed on PVC, cement and cast iron. Water Sci. Technol. 61, 3198. https://doi.org/10.2166/wst.2010.821

Helmi, K., Skraber, S., Gantzer, C., Willame, R., Hoffmann, L., Cauchie, H.-M., 2008. Interactions of Cryptosporidium parvum, Giardia lamblia, vaccinal poliovirus type 1, and bacteriophages phiX174 and MS2 with a drinking water biofilm and a wastewater biofilm. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2079–2088. https://doi.org/10.1128/AEM.02495-07

Hendry, E., Hatanaka, H., Fry, E., Smyth, M., Tate, J., Stanway, G., Santti, J., Maaronen, M., Hyypiä, T., Stuart, D., 1999. The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses. Structure 7, 1527–1538. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)88343-4

Henry, V., Helbronner, A., Recklinghausen, M., 1910. Nouvelles recherches sur la stérilisation de grandes quantités d d'eau par les rayons ultraviolets. Comp Rend Acad Sci 677–680.

Herath, G., Yamamoto, K., Urase, T., 1999. Removal of Viruses by Microfiltration Membranes at Different Solution Environments. Water Sci. Technol. 40, 331–338. https://doi.org/10.2166/wst.1999.0607

Herbold, K., Flehmig, B., Botzenhart, K., 1989. Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2949–2953.

Herrmann, J.E., Hudson, R.W., Perron-Henry, D.M., Kurtz, J.B., Blacklow, N.R., 1988. Antigenic Characterization of Cell-Cultivated Astrovirus Serotypes and Development of Astrovirus-Specific Monoclonal Antibodies. J. Infect. Dis. 158, 182–185. https://doi.org/10.1093/infdis/158.1.182

Herrmann, J.E., Kostenbader, K.D., Cliver, D.O., 1974. Persistence of enteroviruses in lake water. Appl. Microbiol. 28, 895–896.

Hewitt, J., Bell, D., Simmons, G.C., Rivera-Aban, M., Wolf, S., Greening, G.E., 2007. Gastroenteritis Outbreak Caused by Waterborne Norovirus at a New Zealand Ski Resort. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7853–7857. https://doi.org/10.1128/AEM.00718-07

Hiatt, C.W., 1964. KINETICS OF THE INACTIVATION OF VIRUSES. Bacteriol. Rev. 28, 150–163.

Hierholzer, J.C., Killington, R.A., 1996. Virus isolation and quantitation, in: Virology Methods Manual. Elsevier, pp. 25–46.

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. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.10.030

Hill, W.F., Hamblet, F.E., Akin, E.W., 1967. Survival of poliovirus in flowing turbid seawater treated with ultraviolet light. Appl. Microbiol. 15, 533–536.

Himmelsbach, K., Bender, D., Hildt, E., 2018. Life cycle and morphogenesis of the hepatitis E virus. Emerg. Microbes Infect. 7, 196. https://doi.org/10.1038/s41426-018-0198-7

Hirneisen, K.A., Black, E.P., Cascarino, J.L., Fino, V.R., Hoover, D.G., Kniel, K.E., 2010. Viral Inactivation in Foods: A Review of Traditional and Novel Food-Processing Technologies. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 9, 3–20. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00092.x

Hirneisen, K.A., Kniel, K.E., 2013. Comparing human norovirus surrogates: murine norovirus and Tulane virus. J. Food Prot. 76, 139–143. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-216

Ho, J., Seidel, M., Niessner, R., Eggers, J., Tiehm, A., 2016. Long amplicon (LA)-qPCR for the discrimination of infectious and noninfectious phix174 bacteriophages after UV inactivation. Water Res. 103, 141–148. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.032

Hoa Tran, T.N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 56, 185–193. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.11.011

Hoff, J.C., 1986. Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants. US Environ. Prot. Agency.

Hogle, J.M., 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. Annu. Rev. Microbiol. 56, 677–702.

Hornstra, L.M., Schijven, J.F., Waade, A., Prat, G.S., Smits, F.J.C., Cirkel, G., Stuyfzand, P.J., Medema, G.J., 2018. Transport of bacteriophage MS2 and PRD1 in saturated dune sand under suboxic conditions. Water Res. 139, 158–167. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.054

Hu, L., Crawford, S.E., Czako, R., Cortes-Penfield, N.W., Smith, D.F., Le Pendu, J., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2012. Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen. Nature 485, 256.

Huang, P., Farkas, T., Zhong, W., Tan, M., Thornton, S., Morrow, A.L., Jiang, X., 2005. Norovirus and histo-blood group antigens: demonstration of a wide spectrum of strain specificities and classification of two major binding groups among multiple binding patterns. J. Virol. 79, 6714–6722. https://doi.org/10.1128/JVI.79.11.6714-6722.2005

Iaconelli, M., Purpari, G., Della Libera, S., Petricca, S., Guercio, A., Ciccaglione, A.R., Bruni, R., Taffon, S., Equestre, M., Fratini, M., Muscillo, M., La Rosa, G., 2015. Hepatitis A and E Viruses in

Wastewaters, in River Waters, and in Bivalve Molluscs in Italy. Food Environ. Virol. 7, 316–324. https://doi.org/10.1007/s12560-015-9207-3

Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H., Choi, K., 2002a. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. Water Res. 36, 859–870. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00283-4

Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H., Choi, K., 2002b. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. Water Res. 36, 859–870.

Ingle, H., Lee, S., Ai, T., Orvedahl, A., Rodgers, R., Zhao, G., Sullender, M., Peterson, S.T., Locke, M., Liu, T.-C., Yokoyama, C.C., Sharp, B., Schultz-Cherry, S., Miner, J.J., Baldridge, M.T., 2019. Viral complementation of immunodeficiency confers protection against enteric pathogens via interferon-λ. Nat. Microbiol. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0416-7

Ireland, Environmental Protection Agency, Office of Environmental Enforcement, Ireland, Environmental Protection Agency, 2011. Water treatment manual: disinfection. Environmental Protection Agency, Johnstown Castle, Co. Wexford.

Jacangelo, J.G., AWWA Research Foundation, American Water Works Association (Eds.), 2002. Inactivation of waterborne emerging pathogens by selected disinfectants. AWWA Research Foundation and American Water Works Association, Denver, CO.

Jalava, K., Rintala, H., Ollgren, J., Maunula, L., Gomez-Alvarez, V., Revez, J., Palander, M., Antikainen, J., Kauppinen, A., Räsänen, P., Siponen, S., Nyholm, O., Kyyhkynen, A., Hakkarainen, S., Merentie, J., Pärnänen, M., Loginov, R., Ryu, H., Kuusi, M., Siitonen, A., Miettinen, I., Santo Domingo, J.W., Hänninen, M.-L., Pitkänen, T., 2014. Novel microbiological and spatial statistical methods to improve strength of epidemiological evidence in a community-wide waterborne outbreak. PloS One 9, e104713. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104713

Jensen, H., Thomas, K., Sharp, D.G., 1980. Inactivation of coxsackieviruses B3 and B5 in water by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 40, 633–640.

Jensen, J.N., 2010. Disinfection model based on excess inactivation sites: implications for linear disinfection curves and the Chick-Watson dilution coefficient. Environ. Sci. Technol. 44, 8162–8168. https://doi.org/10.1021/es101818z

Jiang, H.J., Chen, N., Shen, Z.Q., Yin, J., Qiu, Z.G., Miao, J., Yang, Z.W., Shi, D.Y., Wang, H.R., Wang, X.W., Li, J.W., Yang, D., Jin, M., 2019. Inactivation of Poliovirus by Ozone and the Impact of Ozone on the Viral Genome. Biomed. Environ. Sci. BES 32, 324–333. https://doi.org/10.3967/bes2019.044

Jiang, P., Liu, Y., Ma, H.-C., Paul, A.V., Wimmer, E., 2014. Picornavirus morphogenesis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 78, 418–437. https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-14

Jin, M., Shan, J., Chen, Z., Guo, X., Shen, Z., Qiu, Z., Xue, B., Wang, Y., Zhu, D., Wang, X., others, 2013. Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. Environ. Sci. Technol. 47, 4590–4597.

Jin, M., Zhao, Z.-G., Wang, X.-W., Shen, Z.-Q., Xu, L., Yu, Y.-M., Qiu, Z.-G., Chen, Z.-L., Wang, J.-F., Huang, A.-H., Li, J.-W., 2012. The 40-80 nt region in the 5'-NCR of genome is a critical target for inactivating poliovirus by chlorine dioxide. J. Med. Virol. 84, 526–535. https://doi.org/10.1002/jmv.23221

Jin, Y., Pratt, E., Yates, M.V., 2000. Effect of Mineral Colloids on Virus Transport through Saturated Sand Columns. J. Environ. Qual. 29, 532 https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900020022x

John, D.E., Rose, J.B., 2005. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. Environ. Sci. Technol. 39, 7345–7356.

Johnson, C., Hargest, V., Cortez, V., Meliopoulos, V.A., Schultz-Cherry, S., 2017. Astrovirus Pathogenesis. Viruses 9. https://doi.org/10.3390/v9010022

Johnson, D.C., Enriquez, C.E., Pepper, I.L., Davis, T.L., Gerba, C.P., Rose, J.B., 1997. Survival of Giardia, Cryptosporidium, poliovirus and Salmonella in marine waters. Health-Relat. Water Microbiol. 1996 35, 261–268. https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00270-9

Johnson, R.A., Ellender, R.D., Tsai, S.C., 1984. Elution of enteric viruses from Mississippi estuarine sediments with lecithin-supplemented eluents. Appl. Environ. Microbiol. 48, 581–585.

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. https://doi.org/10.1126/science.1257147

Joshi, P.C., Keane, T.C., 2010. Investigation of riboflavin sensitized degradation of purine and pyrimidine derivatives of DNA and RNA under UVA and UVB. Biochem. Biophys. Res. Commun. 400, 729–733. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.138

Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Metcalfe, M.G., Humphrey, C.D., Hill, V.R., 2016. Aggregation of Adenovirus 2 in Source Water and Impacts on Disinfection by Chlorine. Food Environ. Virol. 8, 148–155. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9232-x

Kane, M., Case, L.K., Kopaskie, K., Kozlova, A., MacDearmid, C., Chervonsky, A.V., Golovkina, T.V., 2011. Successful Transmission of a Retrovirus Depends on the Commensal Microbiota. Science 334, 245–249. https://doi.org/10.1126/science.1210718

Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M., 1972. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. J. Virol. 10, 1075–1081.

Karst, S.M., 2016. The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses. Nat. Rev. Microbiol. 14, 197–204. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.25

Kato, R., Asami, T., Utagawa, E., Furumai, H., Katayama, H., 2018. Pepper mild mottle virus as a process indicator at drinking water treatment plants employing coagulation-sedimentation, rapid sand filtration, ozonation, and biological activated carbon treatments in Japan. Water Res. 132, 61–70. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.068

Katsanou, K., Karapanagioti, H.K., 2017. Surface Water and Groundwater Sources for Drinking Water, in: Gil, A., Galeano, L.A., Vicente, M.Á. (Eds.), Applications of Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Drinking Water Treatment. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–19. https://doi.org/10.1007/698_2017_140

Katz, M., Plotkin, S.A., 1967. Minimal infective dose of attenuated poliovirus for man. Am. J. Public Health Nations Health 57, 1837–1840.

Kelly, J.T., De Colibus, L., Elliott, L., Fry, E.E., Stuart, D.I., Rowlands, D.J., Stonehouse, N.J., 2015. Potent antiviral agents fail to elicit genetically-stable resistance mutations in either enterovirus 71 or Coxsackievirus A16. Antiviral Res. 124, 77–82.

Khadre, M.A., Yousef, A.E., 2002. Susceptibility of human rotavirus to ozone, high pressure, and pulsed electric field. J. Food Prot. 65, 1441–1446.

Khanal, S., Ghimire, P., Dhamoon, A.S., 2018. The Repertoire of Adenovirus in Human Disease: The Innocuous to the Deadly. Biomedicines 6. https://doi.org/10.3390/biomedicines6010030

Kim, C.K., Gentile, D.M., Sproul, O.J., 1980. Mechanism of Ozone Inactivation of Bacteriophage f2. Appl. Environ. Microbiol. 39, 210–218.

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. Ott. Ont 91, 115–123. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.042

Kim, J.-G., 1998. Ozone, as an antimicrobial agent in minimally processed foods.

Kiulia, N.M., Netshikweta, R., Page, N.A., Van Zyl, W.B., Kiraithe, M.M., Nyachieo, A., Mwenda, J.M., Taylor, M.B., 2010. The detection of enteric viruses in selected urban and rural river water and sewage in Kenya, with special reference to rotaviruses. J. Appl. Microbiol. 109, 818–828. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04710.x

Koh, S.-J., Cho, H.G., Kim, B.H., Choi, B.Y., 2011. An outbreak of gastroenteritis caused by norovirus-contaminated groundwater at a waterpark in Korea. J. Korean Med. Sci. 26, 28–32. https://doi.org/10.3346/jkms.2011.26.1.28

Kohn, T., Grandbois, M., McNeill, K., Nelson, K.L., 2007. Association with Natural Organic Matter Enhances the Sunlight-Mediated Inactivation of MS2 Coliphage by Singlet Oxygen. Environ. Sci. Technol. 41, 4626–4632. https://doi.org/10.1021/es070295h

Koivunen, J., 2007. Effects of conventional treatment, tertiary treatment and disinfection processes on hygienic and physico-chemical quality of municipal wastewaters. University of Kuopio distributor: Kuopio University Library, Kuopio.

Kokkinos, P., Karayanni, H., Meziti, A., Feidaki, R., Paparrodopoulos, S., Vantarakis, A., 2018. Assessment of the Virological Quality of Marine and Running Surface Waters in NW Greece: A Case Study. Food Environ. Virol. 10, 316–326. https://doi.org/10.1007/s12560-018-9344-6

Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M., Kraigher, A., 2008. Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a costal area in Slovenia in June and July 2008. Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 13.

Koroglu, M., Yakupogullari, Y., Otlu, B., Ozturk, S., Ozden, M., Ozer, A., Sener, K., Durmaz, R., 2011. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. New Microbiol. 34, 17–24.

Kotwal, G., Cannon, J.L., 2014. Environmental persistence and transfer of enteric viruses. Curr. Opin. Virol. 4, 37–43. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.12.003

Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Richardson, S.D., Pastor, S.J., Chinn, R., Sclimenti, M.J., Onstad, G.D., Thruston, A.D., 2006. Occurrence of a New Generation of Disinfection Byproducts. Environ. Sci. Technol. 40, 7175–7185. https://doi.org/10.1021/es060353j

Kuss, S.K., Best, G.T., Etheredge, C.A., Pruijssers, A.J., Frierson, J.M., Hooper, L.V., Dermody, T.S., Pfeiffer, J.K., 2011a. Intestinal Microbiota Promote Enteric Virus Replication and Systemic Pathogenesis. Science 334, 249–252. https://doi.org/10.1126/science.1211057

Kwok-Keung, A., LeChevallier, M.W., 2013. Water treatment and pathogen control Process efficiency in achieving safe drinking-water. WHO, Genf.

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

Labanowski, J., 2004. Matière organique naturelle et anthropique: vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation.

LaBelle, R.L., Gerba, C.P., 1980. Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. Appl. Environ. Microbiol. 39, 749–755.

Laine, J., Huovinen, E., Virtanen, M.J., Snellman, M., Lumio, J., Ruutu, P., Kujansuu, E., Vuento, R., Pitkänen, T., Miettinen, I., Herrala, J., Lepistö, O., Antonen, J., Helenius, J., Hänninen, M.-L., Maunula, L., Mustonen, J., Kuusi, M., Pirkanmaa Waterborne Outbreak Study Group, 2011. An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland. Epidemiol. Infect. 139, 1105–1113. https://doi.org/10.1017/S0950268810002141

Laitinen, O.H., Honkanen, H., Pakkanen, O., Oikarinen, S., Hankaniemi, M.M., Huhtala, H., Ruokoranta, T., Lecouturier, V., André, P., Harju, R., Virtanen, S.M., Lehtonen, J., Almond, J.W., Simell, T., Simell, O., Ilonen, J., Veijola, R., Knip, M., Hyöty, H., 2014. Coxsackievirus B1 is associated with induction of β-cell autoimmunity that portends type 1 diabetes. Diabetes 63, 446–455. https://doi.org/10.2337/db13-0619

Lamhoujeb, S., Fliss, I., Ngazoa, S.E., Jean, J., 2008. Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification. Appl. Environ. Microbiol. 74, 3349–3355. https://doi.org/10.1128/AEM.02878-07

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

Larsson, C., Andersson, Y., Allestam, G., Lindqvist, A., Nenonen, N., Bergstedt, O., 2014. Epidemiology and estimated costs of a large waterborne outbreak of norovirus infection in Sweden. Epidemiol. Infect. 142, 592–600. https://doi.org/10.1017/S0950268813001209

Lauring, A.S., Frydman, J., Andino, R., 2013. The role of mutational robustness in RNA virus evolution. Nat. Rev. Microbiol. 11, 327–336. https://doi.org/10.1038/nrmicro3003

Le Bouvier, G.L., 1955. The modification of poliovirus antigens by heat and ultraviolet light. Lancet Lond. Engl. 269, 1013–1016. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(55)93435-8

LeChevallier, M.W., Evans, T.M., Seidler, R.J., 1981. Effect of turbidity on chlorination efficiency and bacterial persistence in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 42, 159–167.

Lee, K.M., Gillespie, J.H., 1973. Thermal and pH stability of feline calicivirus. Infect. Immun. 7, 678–679.

Leenheer, J.A., Croué, J.-P., 2003. Peer Reviewed: Characterizing Aquatic Dissolved Organic Matter. Environ. Sci. Technol. 37, 18A-26A. https://doi.org/10.1021/es032333c

Lehtola, M.J., Torvinen, E., Kusnetsov, J., Pitkanen, T., Maunula, L., von Bonsdorff, C.-H., Martikainen, P.J., Wilks, S.A., Keevil, C.W., Miettinen, I.T., 2007. Survival of Mycobacterium avium, Legionella pneumophila, Escherichia coli, and Caliciviruses in Drinking Water-Associated Biofilms Grown under High-Shear Turbulent Flow. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2854–2859. https://doi.org/10.1128/AEM.02916-06

Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M., Hamza, I.A., 2015. Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. Int. J. Hyg. Environ. Health 218, 686–693. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.02.003

Lennon, G., Cashman, O., Lane, K., Cryan, B., O'Shea, H., 2007. Prevalence and characterization of enteric adenoviruses in the South of Ireland. J. Med. Virol. 79, 1518–1526. https://doi.org/10.1002/jmv.20975

Li, C.S., Chia, W.C., Chen, P.S., 2007. Fluorochrome and flow cytometry to monitor microorganisms in treated hospital wastewater. J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. 42, 195–203. https://doi.org/10.1080/10934520601011379

Li, D., Breiman, A., Le Pendu, J., Uyttendaele, M., 2015. Binding to histo-blood group antigen-expressing bacteria protects human norovirus from acute heat stress. Front. Microbiol. 6, 659.

Li, D., Gu, A.Z., He, M., Shi, H.-C., Yang, W., 2009. UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. Water Res. 43, 3261–3269. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.044

Li, D., Gu, A.Z., Zeng, S.-Y., Yang, W., He, M., Shi, H.-C., 2011. Monitoring and evaluation of infectious rotaviruses in various wastewater effluents and receiving waters revealed correlation and seasonal pattern of occurrences. J. Appl. Microbiol. 110, 1129–1137. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04954.x

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L., Chao, F.H., 2004. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. Water Res. 38, 1514–1519. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.021

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L., Chao, F.H., 2002. Mechanisms of Inactivation of Hepatitis A Virus by Chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4951. https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4951-4955.2002

Liang, J.L., Dziuban, E.J., Craun, G.F., Hill, V., Moore, M.R., Gelting, R.J., Calderon, R.L., Beach, M.J., Roy, S.L., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with drinking water and water not intended for drinking--United States, 2003-2004. Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC 2002 55, 31–65.

Liew, P.F., Gerba, C.P., 1980. Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment. Appl. Environ. Microbiol. 40, 305–308.

Lim, M.Y., Kim, J.-M., Ko, G., 2010. Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. Water Res. 44, 3243–3251. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.003

Linden, K., Wright, H., Collins, J., 2015. Guidance for Implementing Action Spectra Correction with Medium Pressure UV Disinfection. Water Research Foundation;, Denver, CO.

Linden, K.G., Thurston, J., Schaefer, R., Malley, J.P., 2007. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. Appl. Environ. Microbiol. 73, 7571–7574. https://doi.org/10.1128/AEM.01587-07

Lindsay, L., Wolter, J., De Coster, I., Van Damme, P., Verstraeten, T., 2015. A decade of norovirus disease risk among older adults in upper-middle and high income countries: a systematic review. BMC Infect. Dis. 15, 425. https://doi.org/10.1186/s12879-015-1168-5

Lipczynska-Kochany, E., 2018. Humic substances, their microbial interactions and effects on biological transformations of organic pollutants in water and soil: A review. Chemosphere 202, 420–437. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.104

Lipson, S.M., Stotzky, G., 1984. Effect of proteins on reovirus adsorption to clay minerals. Appl. Environ. Microbiol. 48, 525–530.

Lo, S., Gilbert, J., Hetrick, F., 1976. Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. Appl. Environ. Microbiol. 32, 245–249.

Lodder, W.J., Wuite, M., de Roda Husman, A.M., Rutjes, S.A., 2013. Environmental surveillance of human parechoviruses in sewage in The Netherlands. Appl. Environ. Microbiol. 79, 6423–6428. https://doi.org/10.1128/AEM.01917-13

Loisy, F., Atmar, R.L., Cohen, J., Bosch, A., Le Guyader, F.S., 2004. Rotavirus VLP2/6: a new tool for tracking rotavirus in the marine environment. Res. Microbiol. 155, 575–578. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.002

Lorenzo-Morales, J., Coronado-Alvarez, N., Martínez-Carretero, E., Maciver, S.K., Valladares, B., 2007. Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of Acanthamoeba in the Canary Islands, Spain. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77, 753–756.

Loret, J.-F., Greub, G., 2010. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. Int. J. Hyg. Environ. Health 213, 167–175. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.03.004

Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature 489, 220–230. https://doi.org/10.1038/nature11550

Luckiesch, M., and Holladay, L. L., 1944. Disinfecting Water by Means of Germicidal Lamps. Gen. Electr. Rev. 45–50.

Lutterodt, G., van de Vossenberg, J., Hoiting, Y., Kamara, A.K., Oduro-Kwarteng, S., Foppen, J.W.A., 2018. Microbial Groundwater Quality Status of Hand-Dug Wells and Boreholes in the Dodowa Area of Ghana. Int. J. Environ. Res. Public. Health 15. https://doi.org/10.3390/ijerph15040730

Lytle, C.D., Sagripanti, J.-L., 2005. Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. J. Virol. 79, 14244–14252. https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14244-14252.2005

Macler, B.A., Regli, S., 1993. Use of microbial risk assessment in setting US drinking water standards. Int. J. Food Microbiol. 18, 245–256.

Mainard, M., Jacob, D., 2016. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. Photoniques 40–44. https://doi.org/10.1051/photon/20168340

Maisonneuve, E., Cateau, E., Leveque, N., Kaaki, S., Beby-Defaux, A., Rodier, M.-H., 2017. Acanthamoeba castellanii is not be an adequate model to study human adenovirus interactions with macrophagic cells. PloS One 12, e0178629. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178629

Majer, M., Thomssen, R., 1965. Thermal inactivation of32P-poliovirus at 37°C and 50°C in the presence of NaCl with high molarity. Arch. Für Gesamte Virusforsch. 17, 585–593. https://doi.org/10.1007/BF01262235

Malla, B., Ghaju Shrestha, R., Tandukar, S., Sherchand, J.B., Haramoto, E., 2019a. Performance Evaluation of Human-Specific Viral Markers and Application of Pepper Mild Mottle Virus and CrAssphage to Environmental Water Samples as Fecal Pollution Markers in the Kathmandu Valley, Nepal. Food Environ. Virol. 11, 274–287. https://doi.org/10.1007/s12560-019-09389-x

Malla, B., Makise, K., Nakaya, K., Mochizuki, T., Yamada, T., Haramoto, E., 2019b. Evaluation of Human- and Animal-Specific Viral Markers and Application of CrAssphage, Pepper Mild

Mottle Virus, and Tobacco Mosaic Virus as Potential Fecal Pollution Markers to River Water in Japan. Food Environ. Virol. https://doi.org/10.1007/s12560-019-09398-w

Mann, E.E., Wozniak, D.J., 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. FEMS Microbiol. Rev. 36, 893–916. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x

Marjomäki, V., Turkki, P., Huttunen, M., 2015. Infectious Entry Pathway of Enterovirus B Species. Viruses 7, 6387–6399. https://doi.org/10.3390/v7122945

Martinelli, D., Prato, R., Chironna, M., Sallustio, A., Caputi, G., Conversano, M., Ciofi Degli Atti, M., D'Ancona, F.P., Germinario, C.A., Quarto, M., 2007. Large outbreak of viral gastroenteritis caused by contaminated drinking water in Apulia, Italy, May-October 2006. Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 12, E070419.1.

Masachessi, G., Pisano, M.B., Prez, V.E., Martínez, L.C., Michelena, J.F., Martínez-Wassaf, M., Giordano, M.O., Isa, M.B., Pavan, J.V., Welter, A., Nates, S.V., Ré, V., 2018. Enteric Viruses in Surface Waters from Argentina: Molecular and Viable-Virus Detection. Appl. Environ. Microbiol. 84. https://doi.org/10.1128/AEM.02327-17

Matsui, S., Greenberg, H., 2001. Astroviruses.//Knipe DM, Howley PM, *et al. (*Eds.), Fields Virology.

Mattana, A., Serra, C., Mariotti, E., Delogu, G., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P., 2006. Acanthamoeba castellanii Promotion of In Vitro Survival and Transmission of Coxsackie B3 Viruses. Eukaryot. Cell 5, 665–671. https://doi.org/10.1128/EC.5.4.665-671.2006

Matthews, J.E., Dickey, B.W., Miller, R.D., Felzer, J.R., Dawson, B.P., Lee, A.S., Rocks, J.J., Kiel, J., Montes, J.S., Moe, C.L., Eisenberg, J.N.S., Leon, J.S., 2012. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. Epidemiol. Infect. 140, 1161–1172. https://doi.org/10.1017/S0950268812000234

Mattle, M.J., Crouzy, B., Brennecke, M., R. Wigginton, K., Perona, P., Kohn, T., 2011. Impact of Virus Aggregation on Inactivation by Peracetic Acid and Implications for Other Disinfectants. Environ. Sci. Technol. 45, 7710–7717. https://doi.org/10.1021/es201633s

Mattle, M.J., Kohn, T., 2012a. Inactivation and Tailing during UV $_{254}$ Disinfection of Viruses: Contributions of Viral Aggregation, Light Shielding within Viral Aggregates, and Recombination. Environ. Sci. Technol. 120830135926005. https://doi.org/10.1021/es302058v

Maunula, L., Miettinen, I.T., von Bonsdorff, C.-H., 2005. Norovirus outbreaks from drinking water. Emerg. Infect. Dis. 11, 1716–1721. https://doi.org/10.3201/eid1111.050487

Mayer, Mayer, B., Yang, Y., Gerrity, D., Abbaszadegan, M., 2015. The Impact of Capsid Proteins on Virus Removal and Inactivation During Water Treatment Processes. Microbiol. Insights 15. https://doi.org/10.4137/MBI.S31441

McCarthy, J.F., Zachara, J.M., 1989. Subsurface transport of contaminants. Environ. Sci. Technol. 23, 496–502. https://doi.org/10.1021/es00063a001

McClain, M.E., Spendlove, R.S., 1966. Multiplicity reactivation of reovirus particles after exposure to ultraviolet light. J. Bacteriol. 92, 1422–1429.

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. https://doi.org/10.1111/lam.12736

Medearis Jr, D.N., Arnold, J.H., Enders, J.F., 1960. Survival of Polioviruses at Elevated Temperatures (60°-75° C). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104, 419–423.

Meister, S., Verbyla, M.E., Klinger, M., Kohn, T., 2018. Variability in Disinfection Resistance between Currently Circulating Enterovirus B Serotypes and Strains. Environ. Sci. Technol. 52, 3696–3705. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00851

Mellou, K., Katsioulis, A., Potamiti-Komi, M., Pournaras, S., Kyritsi, M., Katsiaflaka, A., Kallimani, A., Kokkinos, P., Petinaki, E., Sideroglou, T., Georgakopoulou, T., Vantarakis, A., Hadjichristodoulou, C., 2013. A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. Epidemiol. Infect. 1–11. https://doi.org/10.1017/S0950268813000939

Melnick, J.L., 1984. Live attenuated oral poliovirus vaccine. Rev. Infect. Dis. 6 Suppl 2, S323-327.

Melnick, J.L., Ashkenazi, A., Midulla, V.C., Wallis, C., Bernstein, A., 1963. Immunogenic Potency of MgCl2—Stabilized Oral Poliovaccine. JAMA 185, 406–408. https://doi.org/10.1001/jama.1963.03060050084032

Microbial Agents and Transmission, 2014. , in: Quantitative Microbial Risk Assessment. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, pp. 15–62.

Milo, G.E., 1971. Thermal inactivation of poliovirus in the presence of selective organic molecules (cholesterol, lecithin, collagen, and beta-carotene). Appl. Microbiol. 21, 198–202.

Mirchamsy, H., Shafyi, A., Mahinpour, M., Nazari, P., 1978. Stabilizing effect of magnesium chloride and sucrose on Sabin live polio vaccine. Dev. Biol. Stand. 41, 255–257.

Mitchell, R., Jannasch, H.W., 1969. Processes controlling virus inactivation in seawater. Environ. Sci. Technol. 3, 941–943. https://doi.org/10.1021/es60033a007

Miura, T., Okabe, S., Nakahara, Y., Sano, D., 2015. Removal properties of human enteric viruses in a pilot-scale membrane bioreactor (MBR) process. Water Res. 75, 282–291. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.046

Miura, T., Sano, D., Suenaga, A., Yoshimura, T., Fuzawa, M., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Okabe, S., 2013. Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as specific adsorbents for human noroviruses. J. Virol. 87, 9441–9451.

Mizuno, T., Kageyama, M., 1978. Separation and characterization of the outer membrane of Pseudomonas aeruginosa. J. Biochem. (Tokyo) 84, 179–191. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132106

Moore, R.S., Taylor, D.H., Sturman, L.S., Reddy, M.M., Fuhs, G.W., 1981. Poliovirus adsorption by 34 minerals and soils. Appl. Environ. Microbiol. 42, 963–975.

Moreira, N.A., Bondelind, M., 2017. Safe drinking water and waterborne outbreaks. J. Water Health 15, 83–96. https://doi.org/10.2166/wh.2016.103

Moulin, L., Richard, F., Stefania, S., Goulet, M., Gosselin, S., Gonçalves, A., Rocher, V., Paffoni, C., Dumètre, A., 2010. Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. Water Res. 44, 5222–5231. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.037

Mudd, J.B., Leavitt, R., Ongun, A., McManus, T.T., 1969. Reaction of ozone with amino acids and proteins. Atmos. Environ. 3, 669–682.

Murray, J.P., Parks, G., Schwerdt, C., 1978. Poliovirus adsorption on oxide surfaces. Presented at the ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMER CHEMICAL SOC 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036, pp. 24–24.

Nasheri, N., Petronella, N., Ronholm, J., Bidawid, S., Corneau, N., 2017. Characterization of the Genomic Diversity of Norovirus in Linked Patients Using a Metagenomic Deep Sequencing Approach. Front. Microbiol. 8, 73. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00073

Nasser, A., Battagelli, D., Sobsey, M., 1991. Isoelectric focusing of hepatitis A virus in sucrose gradients. Isr J Med Sci 28, 73.

National Water Research Institute, 2012. Ultraviolet Disinfection Guidelines, Third Edition. ed.

Nemerow, G.R., Stewart, P.L., Reddy, V.S., 2012. Structure of human adenovirus. Curr. Opin. Virol. 2, 115–121. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.12.008

Ng, T.F.F., Magaña, L., Montmayeur, A., Lopez, M.R., Gregoricus, N., Oberste, M.S., Vinjé, J., Nix, W.A., 2016. Characterization of a Salivirus (Picornaviridae) from a Diarrheal Child in Guatemala. Genome Announc. 4. https://doi.org/10.1128/genomeA.01751-15

Nguyen, Y., Jesudhasan, P.R., Aguilera, E.R., Pfeiffer, J.K., 2019. Identification and Characterization of a Poliovirus Capsid Mutant with Enhanced Thermal Stability. J. Virol. 93. https://doi.org/10.1128/JVI.01510-18

Nieto-Juarez, J.I., Pierzchła, K., Sienkiewicz, A., Kohn, T., 2010. Inactivation of MS2 coliphage in Fenton and Fenton-like systems: role of transition metals, hydrogen peroxide and sunlight. Environ. Sci. Technol. 44, 3351–3356. https://doi.org/10.1021/es903739f

Nieuwstad, Th.J., Havelaar, A.H., 1994. The kinetics of batch ultraviolet inactivation of bacteriophage ms2 and microbiological calibration of an ultraviolet pilot plant. J. Environ. Sci. Health Part Environ. Sci. Eng. Toxicol. 29, 1993–2007. https://doi.org/10.1080/10934529409376160

Noss, C.I., Hauchman, F.S., Olivieri, V.P., 1986. Chlorine dioxide reactivity with proteins. Water Res. 20, 351–356.

Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., 2003. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. Appl. Environ. Microbiol. 69, 350–357. https://doi.org/10.1128/aem.69.1.350-357.2003

Nuanualsuwan, S., Mariam, T., Himathongkham, S., Cliver, D.O., 2002. Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. Photochem. Photobiol. 76, 406–410.

Nwachuku, N., Gerba, C.P., Oswald, A., Mashadi, F.D., 2005. Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5633–5636. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5633-5636.2005

Nygård, K., Vold, L., Halvorsen, E., Bringeland, E., Røttingen, J.A., Aavitsland, P., 2004. Waterborne outbreak of gastroenteritis in a religious summer camp in Norway, 2002. Epidemiol. Infect. 132, 223–229.

O'Brien, R.T., Newman, J., 1979. Structural and compositional changes associated with chlorine inactivation of polioviruses. Appl. Environ. Microbiol. 38, 1034–1039.

O'Brien, R.T., Newman, J.S., 1977. Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. Appl. Environ. Microbiol. 33, 334–340.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.00917-10

Ohgaki, S., Mongkonsiri, P., 1990. Effects of Floc-Virus Association on Chlorine Disinfection Efficiency, in: Hahn, H.H., Klute, R. (Eds.), Chemical Water and Wastewater Treatment. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 75–84. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76093-8_5

Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., Saif, L.J., 2015. Comprehensive review of human sapoviruses. Clin. Microbiol. Rev. 28, 32–53. https://doi.org/10.1128/CMR.00011-14

Okamoto, H., 2011. Hepatitis E virus cell culture models. Virus Res. 161, 65–77. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.01.015

O'Mahony, J., O'Donoghue, M., Morgan, J.G., Hill, C., 2000. Rotavirus survival and stability in foods as determined by an optimised plaque assay procedure. Int. J. Food Microbiol. 61, 177–185.

OMS, 2017. Directives de qualité pour l'eau de boisson, 4ème. ed. Organisation Mondiale de la Santé.

Orchard, R.C., Wilen, C.B., Doench, J.G., Baldridge, M.T., McCune, B.T., Lee, Y.-C.J., Lee, S., Pruett-Miller, S.M., Nelson, C.A., Fremont, D.H., Virgin, H.W., 2016. Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus. Science 353, 933–936. https://doi.org/10.1126/science.aaf1220

O'Reilly, C.E., Bowen, A.B., Perez, N.E., Sarisky, J.P., Shepherd, C.A., Miller, M.D., Hubbard, B.C., Herring, M., Buchanan, S.D., Fitzgerald, C.C., Hill, V., Arrowood, M.J., Xiao, L.X., Hoekstra, R.M., Mintz, E.D., Lynch, M.F., Outbreak Working Group, 2007. A waterborne outbreak of gastroenteritis with multiple etiologies among resort island visitors and residents: Ohio, 2004. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 44, 506–512. https://doi.org/10.1086/511043

Ottoson, J., Hansen, A., Westrell, T., Johansen, K., Norder, H., Stenström, T.A., 2006. Removal of noro- and enteroviruses, Giardia cysts, Cryptosporidium oocysts, and fecal indicators at four secondary wastewater treatment plants in Sweden. Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed. 78, 828–834.

Page, M.A., Shisler, J.L., Marinas, B.J., 2010. Mechanistic Aspects of Adenovirus Serotype 2 Inactivation with Free Chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 76, 2946–2954. https://doi.org/10.1128/AEM.02267-09

Palombo, E.A., Bishop, R.F., 1996. Annual incidence, serotype distribution, and genetic diversity of human astrovirus isolates from hospitalized children in Melbourne, Australia. J. Clin. Microbiol. 34, 1750–1753.

Pancorbo, O.C., Evanshen, B.G., Campbell, W.F., Lambert, S., Curtis, S.K., Woolley, T.W., 1987. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh waters. Appl. Environ. Microbiol. 53, 1803–1811.

Pang, X., Qiu, Y., Gao, T., Zurawell, R., Neumann, N.F., Craik, S., Lee, B.E., 2019. Prevalence, levels and seasonal variations of human enteric viruses in six major rivers in Alberta, Canada. Water Res. 153, 349–356. https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.01.034

Papadopoulos, V.P., Vlachos, O., Isidoriou, E., Kasmeridis, C., Pappa, Z., Goutzouvelidis, A., Filippou, F., 2006. A gastroenteritis outbreak due to Norovirus infection in Xanthi, Northern Greece: management and public health consequences. J. Gastrointest. Liver Dis. JGLD 15, 27–30.

Park, G.W., Linden, K.G., Sobsey, M.D., 2011. Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (NoV) and coliphage (F+) MS2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on UV inactivation: Comparison of UV disinfection of MNV, FCV and echovirus 12. Lett. Appl. Microbiol. 52, 162–167. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02982.x

Parkes, E., 2014. Mode of Communication of Cholera. By John Snow, MD: Second Edition – London, 1855, pp 162.1. Int. J. Epidemiol. 42, 1543–1552. https://doi.org/10.1093/ije/dyt193

Parry, J.V., Mortimer, P.P., 1984. The heat sensitivity of hepatitis A virus determined by a simple tissue culture method. J. Med. Virol. 14, 277–283.

Passantino, L., Malley, J., Knudson, M., Ward, R., Kim, J., 2004. Effect of Low Turbidity and Algae on UV Disinfection Performance. J. - Am. Water Works Assoc. 96, 128–137. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2004.tb10786.x

Payment, P., Locas, A., 2011. Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators. Ground Water 49, 4–11. https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2010.00710.x

Payment, P., Morin, E., Trudel, M., 1988. Coliphages and enteric viruses in the particulate phase of river water. Can. J. Microbiol. 34, 907–910. https://doi.org/10.1139/m88-158

Payment, P., Tremblay, M., Trudel, M., 1985. Relative resistance to chlorine of poliovirus and coxsackievirus isolates from environmental sources and drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 49, 981–983.

Pecson, B.M., Martin, L.V., Kohn, T., 2009. Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation, and singlet oxygen: advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5544–5554. https://doi.org/10.1128/AEM.00425-09

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

Perdue, E.M., Ritchie, J.D., 2003. Dissolved Organic Matter in Freshwaters, in: Treatise on Geochemistry. Elsevier, pp. 273–318. https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/05080-5

Pereira, H.G., Valentine, R.C., Russell, W.C., 1968. Crystallization of an adenovirus protein (the hexon). Nature 219, 946–947.

Pernet-Coudrier, B., Varrault, G., Saad, M., Croue, J.P., Dignac, M.-F., Mouchel, J.-M., 2011. Characterisation of dissolved organic matter in Parisian urban aquatic systems: predominance of hydrophilic and proteinaceous structures. Biogeochemistry 106, 89–106. https://doi.org/10.1007/s10533-010-9480-z

Pérot, P., Lecuit, M., Eloit, M., 2017. Astrovirus Diagnostics. Viruses 9. https://doi.org/10.3390/v9010010

Pham, M., Mintz, E.A., Nguyen, T.H., 2009. Deposition kinetics of bacteriophage MS2 to natural organic matter: role of divalent cations. J. Colloid Interface Sci. 338, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.06.025

Piccolo, A., 2002. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science, in: Advances in Agronomy. Elsevier, pp. 57–134.

Pieper, A.P., Ryan, J.N., Harvey, R.W., Amy, G.L., Illangasekare, T.H., Metge, D.W., 1997. Transport and recovery of bacteriophage PRD1 in a sand and gravel aquifer: Effect of sewage-derived organic matter. Environ. Sci. Technol. 31, 1163–1170.

Pinon, A., Vialette, M., 2018. Survival of Viruses in Water. Intervirology 61, 214–222. https://doi.org/10.1159/000484899

Pires, S.M., Fischer-Walker, C.L., Lanata, C.F., Devleesschauwer, B., Hall, A.J., Kirk, M.D., Duarte, A.S.R., Black, R.E., Angulo, F.J., 2015. Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. PloS One 10, e0142927. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142927

Poirier, E.Z., Vignuzzi, M., 2017. Virus population dynamics during infection. Curr. Opin. Virol. 23, 82–87. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.013

Posada-Cespedes, S., Seifert, D., Beerenwinkel, N., 2017. Recent advances in inferring viral diversity from high-throughput sequencing data. Virus Res. 239, 17–32. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.09.016

Prasad, B.V., Hardy, M.E., Dokland, T., Bella, J., Rossmann, M.G., Estes, M.K., 1999. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. Science 286, 287–290.

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

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

Provost, P.J., Giesa, P.A., McAleer, W.J., Hilleman, M.R., 1981. Isolation of Hepatitis A Virus in Vitro in Cell Culture Directly from Human Specimens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167, 201–206. https://doi.org/10.3181/00379727-167-41149

Qin, M., Dong, X.-G., Jing, Y.-Y., Wei, X.-X., Wang, Z.-E., Feng, H.-R., Yu, H., Li, J.-S., Li, J., 2016. A Waterborne Gastroenteritis Outbreak Caused by Norovirus GII.17 in a Hotel, Hebei, China, December 2014. Food Environ. Virol. 8, 180–186. https://doi.org/10.1007/s12560-016-9237-5

Quignon, F., Sardin, M., Kiene, L., Schwartzbrod, L., 1997. Poliovirus-1 inactivation and interaction with biofilm: a pilot-scale study. Appl. Environ. Microbiol. 63, 978–982.

Rachmadi, A.T., Kitajima, M., Watanabe, K., Okabe, S., Sano, D., 2018a. Disinfection as a Selection Pressure on RNA Virus Evolution. Environ. Sci. Technol. 52, 2434–2435. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00590

Rachmadi, A.T., Kitajima, M., Watanabe, K., Yaegashi, S., Serrana, J., Nakamura, A., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Katayama, K., Okabe, S., Sano, D., 2018b. Free chlorine disinfection as a selection pressure on norovirus. Appl. Environ. Microbiol. AEM.00244-18. https://doi.org/10.1128/AEM.00244-18

Radomski, N., Betelli, L., Moilleron, R., Haenn, S., Moulin, L., Cambau, E., Rocher, V., Gonçalves, A., Lucas, F.S., 2011. Mycobacterium behavior in wastewater treatment plant, a bacterial model distinct from Escherichia coli and Enterococci. Environ. Sci. Technol. 45, 5380–5386. https://doi.org/10.1021/es104084c

Rainbow, A.J., 1977. UV-induced alkaline labile DNA damage in human adenovirus and its repair after infection of human cells. Photochem. Photobiol. 25, 457–463.

Rao, V.C., Melnick, J.L., 2019. HUMAN VIRUSES IN SEDIMENTS SLUDGES & SOILS. CRC PRESS, S.l.

Raphael, R.A., Sattar, S.A., Springthorpe, V.S., 1985. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. Can. J. Microbiol. 31, 124–128.

Rattanakul, S., Oguma, K., Sakai, H., Takizawa, S., 2014. Inactivation of Viruses by Combination Processes of UV and Chlorine. J. Water Environ. Technol. 12, 511–523. https://doi.org/10.2965/jwet.2014.511

Rattanakul, S., Oguma, K., Takizawa, S., 2015. Sequential and Simultaneous Applications of UV and Chlorine for Adenovirus Inactivation. Food Environ. Virol. 7, 295–304. https://doi.org/10.1007/s12560-015-9202-8

Regli, S., Rose, J.B., Haas, C.N., Gerba, C.P., 1991. Modeling the Risk From Giardia and Viruses in Drinking Water. J. - Am. Water Works Assoc. 83, 76–84. https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1991.tb07252.x

Rice, R.G., Robson, C.M., Miller, G.W., Hill, A.G., 1981. Uses of ozone in drinking water treatment. Journal-American Water Works Assoc. 73, 44–57.

Riera-Montes, M., Brus SjöLander, K., Allestam, G., Hallin, E., Hedlund, K.-O., LöFdahl, M., 2011. Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. Epidemiol. Infect. 139, 1928–1935. https://doi.org/10.1017/S0950268810003146

Riesser, V., Perrich, J., Silver, B., McCammon, J., 1977. Possible mechanisms of poliovirus inactivation by ozone. Presented at the Forum on Ozone Disinfection, International Ozone Institute Cleveland, OH, pp. 186–192.

Rivera-Serrano, E.E., González-López, O., Das, A., Lemon, S.M., 2019. Cellular entry and uncoating of naked and quasi-enveloped human hepatoviruses. eLife 8. https://doi.org/10.7554/eLife.43983

Robinson, C.M., Jesudhasan, P.R., Pfeiffer, J.K., 2014a. Bacterial Lipopolysaccharide Binding Enhances Virion Stability and Promotes Environmental Fitness of an Enteric Virus. Cell Host Microbe 15, 36–46. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.004

Robinson, C.M., Jesudhasan, P.R., Pfeiffer, J.K., 2014b. Bacterial Lipopolysaccharide Binding Enhances Virion Stability and Promotes Environmental Fitness of an Enteric Virus. Cell Host Microbe 15, 36–46. https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.004

Rodríguez, R.A., Gundy, P.M., Rijal, G.K., Gerba, C.P., 2012. The impact of combined sewage overflows on the viral contamination of receiving waters. Food Environ. Virol. 4, 34–40. https://doi.org/10.1007/s12560-011-9076-3

Rodríguez-Díaz, J., García-Mantrana, I., Vila-Vicent, S., Gozalbo-Rovira, R., Buesa, J., Monedero, V., Collado, M.C., 2017. Relevance of secretor status genotype and microbiota composition in susceptibility to rotavirus and norovirus infections in humans. Sci. Rep. 7, 45559. https://doi.org/10.1038/srep45559

Romero, O.C., Straub, A.P., Kohn, T., Nguyen, T.H., 2011. Role of Temperature and Suwannee River Natural Organic Matter on Inactivation Kinetics of Rotavirus and Bacteriophage MS2 by Solar Irradiation. Environ. Sci. Technol. 45, 10385–10393. https://doi.org/10.1021/es202067f

Rook, J.J., 1976. Haloforms in Drinking Water. J. Am. Water Works Assoc. 68, 168–172.

Rosiles-González, G., Ávila-Torres, G., Moreno-Valenzuela, O.A., Acosta-González, G., Leal-Bautista, R.M., Grimaldo-Hernández, C.D., Brown, J.K., Chaidez-Quiroz, C., Betancourt, W.Q., Gerba, C.P., Hernández-Zepeda, C., 2017. Occurrence of Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) in Groundwater from a Karst Aquifer System in the Yucatan Peninsula, Mexico. Food Environ. Virol. 9, 487–497. https://doi.org/10.1007/s12560-017-9309-1

Rostami, S., He, J., Hassan, K.Q., 2018. Riverine Water Quality Response to Precipitation and Its Change. Environments 5. https://doi.org/10.3390/environments5010008

Roy, D., Englebrecht, R., Chian, E., 1982. Comparative inactivation of six enteroviruses by ozone. Journal-American Water Works Assoc. 74, 660–664.

Roy, D., Wong, P.K., Engelbrecht, R.S., Chian, E.S., 1981. Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. Appl. Environ. Microbiol. 41, 718–723.

Rule Wigginton, K., Menin, L., Montoya, J.P., Kohn, T., 2010. Oxidation of Virus Proteins during UV $_{254}$ and Singlet Oxygen Mediated Inactivation. Environ. Sci. Technol. 44, 5437–5443. https://doi.org/10.1021/es100435a

Russell, W.C., Valentine, R.C., Pereira, H.G., 1967. The effect of heat on the anatomy of the adenovirus. J. Gen. Virol. 1, 509–522. https://doi.org/10.1099/0022-1317-1-4-509

Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, K.C., Naseem, S., Sattar, S., 2018. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. Rev. Med. Virol. 28, e2003. https://doi.org/10.1002/rmv.2003

Saif, L., I. Rosen, B., Kang, S.-Y., L. Miller, K., 1988. Cell culture propagation of rotaviruses. https://doi.org/10.1007/BF01404268

Saliba, G.S., Franklin, S.L., Jackson, G.G., 1968. ECHO-11 as a respiratory virus: quantitation of infection in man. J. Clin. Invest. 47, 1303–1313.

Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M., Belshaw, R., 2010. Viral mutation rates. J. Virol. 84, 9733–9748. https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10

Sano, D., Amarasiri, M., Hata, A., Watanabe, T., Katayama, H., 2016. Risk management of viral infectious diseases in wastewater reclamation and reuse: Review. Environ. Int. 91, 220–229. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.001

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. https://doi.org/10.1021/es9018964

Sassi, H.P., Tuttle, K.D., Betancourt, W.Q., Kitajima, M., Gerba, C.P., 2018. Persistence of Viruses by qPCR Downstream of Three Effluent-Dominated Rivers in the Western United States. Food Environ. Virol. 10, 297–304. https://doi.org/10.1007/s12560-018-9343-7

Scarcella, C., Carasi, S., Cadoria, F., Macchi, L., Pavan, A., Salamana, M., Alborali, G.L., Losio, M.M., Boni, P., Lavazza, A., Seyler, T., 2009. An outbreak of viral gastroenteritis linked to municipal water supply, Lombardy, Italy, June 2009. Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 14.

Scarpino, P.V., Berg, G., Chang, S.L., Dahling, D., Lucas, M., 1972. A comparative study of the inactivation of viruses in water by chlorine. Water Res. 6, 959–965. https://doi.org/10.1016/0043-1354(72)90047-4

Scheid, P., 2015. Viruses in close associations with free-living amoebae. Parasitol. Res. 114, 3959–3967. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4731-5

Scheid, P., Schwarzenberger, R., 2012. Acanthamoeba spp. as vehicle and reservoir of adenoviruses. Parasitol. Res. 111, 479–485. https://doi.org/10.1007/s00436-012-2828-7

Schiff, G.M., Stefanovic', G.M., Young, E.C., Sander, D.S., Pennekamp, J.K., Ward, R.L., 1984. Studies of echovirus-12 in volunteers: determination of minimal infectious dose and the effect of previous infection on infectious dose. J. Infect. Dis. 150, 858–866.

Schuch, A.P., Menck, C.F.M., 2010. The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. J. Photochem. Photobiol. B 99, 111–116. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.03.004

Schwartzbrod, L., 1991. Virologie des milieux hydriques. Tec et Doc, Paris.

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. https://doi.org/10.1128/AEM.05806-11

Seo, K., Lee, J.E., Lim, M.Y., Ko, G., 2012. Effect of temperature, pH, and NaCl on the inactivation kinetics of murine norovirus. J. Food Prot. 75, 533–540. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-199

Servais, P., Garnier, J., Demarteau, N., Brion, N., Billen, G., 1999. Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents. Water Res. 33, 3521–3531.

Sezen, F., Aval, E., AğKurt, T., Yilmaz, ş., Temel, F., GüLeşEn, R., KorukluoğLu, G., Sucakli, M.B., TorunoğLu, M.A., Zhu, B.-P., 2015. A large multi-pathogen gastroenteritis outbreak caused by drinking contaminated water from antique neighbourhood fountains, Erzurum city, Turkey, December 2012. Epidemiol. Infect. 143, 704–710. https://doi.org/10.1017/S0950268814001459

Shaffer, P.T., Metcalf, T.G., Sproul, O.J., 1980. Chlorine resistance of poliovirus isolants recovered from drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 40, 1115–1121.

Sharp, D.G., Leong, J., 1980. Inactivation of poliovirus I (Brunhilde) single particles by chlorine in water. Appl. Environ. Microbiol. 40, 381–385.

Shi, Z., Gewirtz, A.T., 2018. Together Forever: Bacterial-Viral Interactions in Infection and Immunity. Viruses 10. https://doi.org/10.3390/v10030122

Shin, G.-A., Lee, J.-K., Linden, K.G., 2009. Enhanced effectiveness of medium-pressure ultraviolet lamps on human adenovirus 2 and its possible mechanism. Water Sci. Technol. 60, 851–857. https://doi.org/10.2166/wst.2009.414

Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. Water Res. 42, 4562–4568. https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.08.001

Shin, G.-A., Sobsey, M.D., 2003. Reduction of Norwalk Virus, Poliovirus 1, and Bacteriophage MS2 by Ozone Disinfection of Water. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3975–3978. https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3975-3978.2003

Shiomi, H., Urasawa, T., Urasawa, S., Kobayashi, N., Abe, S., Taniguchi, K., 2004. Isolation and characterisation of poliovirus mutants resistant to heating at 50°c for 30 min: Heat-Resistant Poliovirus Mutant. J. Med. Virol. 74, 484–491. https://doi.org/10.1002/jmv.20202

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Marubayashi, T., Murai, K., 2016. Investigation of enteric adenovirus and poliovirus removal by coagulation processes and suitability of bacteriophages MS2 and ϕX174 as surrogates for those viruses. Sci. Total Environ. 563–564, 29–39. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.090

Shkoporov, A.N., Khokhlova, E.V., Fitzgerald, C.B., Stockdale, S.R., Draper, L.A., Ross, R.P., Hill, C., 2018. ΦCrAss001 represents the most abundant bacteriophage family in the human gut and infects Bacteroides intestinalis. Nat. Commun. 9, 4781. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07225-7

Sigmon, C., Shin, G.-A., Mieog, J., Linden, K.G., 2015. Establishing Surrogate–Virus Relationships for Ozone Disinfection of Wastewater. Environ. Eng. Sci. 32, 451–460. https://doi.org/10.1089/ees.2014.0496

Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Pecson, B.M., Wigginton, K.R., Kohn, T., 2013. Subtle Differences in Virus Composition Affect Disinfection Kinetics and Mechanisms. Appl. Environ. Microbiol. 79, 3455–3467. https://doi.org/10.1128/AEM.00663-13

Sigstam, T., Rohatschek, A., Zhong, Q., Brennecke, M., Kohn, T., 2014. On the cause of the tailing phenomenon during virus disinfection by chlorine dioxide. Water Res. 48, 82–89. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.09.023

Simmons, F.J., Xagoraraki, I., 2011. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. Water Res. 45, 3590–3598. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.001

Simonet, J., Gantzer, C., 2006a. 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. https://doi.org/10.1128/AEM.01106-06

Simonet, J., Gantzer, C., 2006b. Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. J. Appl. Microbiol. 100, 862–870. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02850.x

Sinclair, R.G., Jones, E.L., Gerba, C.P., 2009. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. J. Appl. Microbiol. 107, 1769–1780. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x

Sindhu, K.N.C., Babji, S., Ganesan, S.K., 2017. Impact of rotavirus vaccines in low and middle-income countries. Curr. Opin. Infect. Dis. 30, 473–481. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000397

Sinton, L.W., Hall, C.H., Lynch, P.A., Davies-Colley, R.J., 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1122–1131. https://doi.org/10.1128/aem.68.3.1122-1131.2002

Skraber, S., Schijven, J., Italiaander, R., de Roda Husman, A.M., 2009. Accumulation of enteric bacteriophage in fresh water sediments. J. Water Health 7, 372–379. https://doi.org/10.2166/wh.2009.098

Smirnov, Y.A., Kapitulets, S.P., Amitina, N.N., Ginevskaya, V.A., Kaverin, N.V., 1991. Effect of UV-irradiation on rotavirus. Acta Virol. 35, 1–6.

Smith, E.M., Gerba, C.P., Melnick, J.L., 1978. Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol. 35, 685–689.

Smith, J.G., Wiethoff, C.M., Stewart, P.L., Nemerow, G.R., 2010. Adenovirus. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 343, 195–224. https://doi.org/10.1007/82_2010_16

Sobsey, M., Battigelli, D., Shin, G.-A., Newland, S., 1998. RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. Water Sci. Technol. 38, 91–94. https://doi.org/10.2166/wst.1998.0511

Sobsey, M.D., Fuji, T., Hall, R.M., 1991. Inactivation of Cell-Associated and Dispersed Hepatitis A Virus in Water. J. Am. Water Works Assoc. 83, 64–67.

Sobsey, M.D., Fuji, T., Shields, P.A., 1988. Inactivation of Hepatitis a Virus and Model Viruses in Water by Free Chlorine and Monochloramine. Water Sci. Technol. 20, 385–391. https://doi.org/10.2166/wst.1988.0310

Sobsey, M.D., Shields, P.A., Hauchman, F.H., Hazard, R.L., Caton, L.W., III, 1986. Survival and Transport of Hepatitis a Virus in Soils, Groundwater and Wastewater. Water Sci. Technol. 18, 97–106. https://doi.org/10.2166/wst.1986.0116

Sommer, R., Cabaj, A., Hirschmann, G., Haider, T., 2008. Disinfection of Drinking Water by UV Irradiation: Basic Principles - Specific Requirements - International Implementations. Ozone Sci. Eng. 30, 43–48. https://doi.org/10.1080/01919510701759181

Spellman, F.R., 2003. Handbook of water & wastewater treatment plant operations. Lewis, Boca Raton, Fla.

Springer, G.F., Williamson, P., Brandes, W.C., 1961. BLOOD GROUP ACTIVITY OF GRAM-NEGATIVE BACTERIA. J. Exp. Med. 113, 1077–1093. https://doi.org/10.1084/jem.113.6.1077

Sprunck, G., Wigand, R., 1981. Stabilization of adenovirus infectivity against thermoinactivation by lowered ionic strength. Med. Microbiol. Immunol. (Berl.) 170, 37–43.

Stagg, C.H., Wallis, C., Ward, C.H., 1977. Inactivation of clay-associated bacteriophage MS-2 by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 33, 385.

Stedmon, C.A., Markager, S., Bro, R., 2003. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. Mar. Chem. 82, 239–254. https://doi.org/10.1016/S0304-4203(03)00072-0

Stencel-Baerenwald, J.E., Reiss, K., Reiter, D.M., Stehle, T., Dermody, T.S., 2014. The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions. Nat. Rev. Microbiol. 12, 739–749. https://doi.org/10.1038/nrmicro3346

Strazynski, M., Krämer, J., Becker, B., 2002. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. Int. J. Food Microbiol. 74, 73–78.

Stuart, A.D., Eustace, H.E., McKee, T.A., Brown, T.D.K., 2002. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. J. Virol. 76, 9307–9322. https://doi.org/10.1128/jvi.76.18.9307-9322.2002

Stuempfig, N.D., Seroy, J., 2019. Viral Gastroenteritis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Sullender, M.E., Baldridge, M.T., 2018. Norovirus interactions with the commensal microbiota. PLoS Pathog. 14, e1007183. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007183

Sun, C.-X., Kitajima, M., Gin, K.Y.-H., 2016. Sunlight inactivation of somatic coliphage in the presence of natural organic matter. Sci. Total Environ. 541, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.136

Susan Springthorpe, V., Loh, C.L., Robertson, W.J., Sattar, S.A., 1993. In Situ Survival of Indicator Bacteria, MS-2 Phage and Human Pathogenic Viruses in River Water. Water Sci. Technol. 27, 413–420. https://doi.org/10.2166/wst.1993.0383

Symonds, E.M., Nguyen, K.H., Harwood, V.J., Breitbart, M., 2018. Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. Water Res. 144, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.06.066

Tadros, T.F., Gregory, J. (Eds.), 1993. Colloids in the aquatic environment. European Environmental Research Organisation, London ; New York.

Tan, M., Jiang, X., 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. Trends Microbiol. 13, 285–293. https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.004

Tapparel, C., Siegrist, F., Petty, T.J., Kaiser, L., 2013. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis. 14, 282–293. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.10.016

Taube, S., Perry, J.W., Yetming, K., Patel, S.P., Auble, H., Shu, L., Nawar, H.F., Lee, C.H., Connell, T.D., Shayman, J.A., Wobus, C.E., 2009. Ganglioside-linked terminal sialic acid moieties on murine macrophages function as attachment receptors for murine noroviruses. J. Virol. 83, 4092–4101. https://doi.org/10.1128/JVI.02245-08

Templeton, M.R., Andrews, R.C., Hofmann, R., 2008. Particle-Associated Viruses in Water: Impacts on Disinfection Processes. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 38, 137–164. https://doi.org/10.1080/10643380601174764

Templeton, M.R., Andrews, R.C., Hofmann, R., 2005. Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light. Water Res. 39, 3487–3500. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.010

ter Waarbeek, H.L.G., Dukers-Muijrers, N.H.T.M., Vennema, H., Hoebe, C.J.P.A., 2010. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol. 47, 268–272. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.12.002

Teunis, P.F., Havelaar, A.H., 2000. The Beta Poisson dose-response model is not a single-hit model. Risk Anal. Off. Publ. Soc. Risk Anal. 20, 513–520.

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. https://doi.org/10.1002/jmv.21237

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2005a. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by chlorine dioxide. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3100–3105. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3100-3105.2005

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2005b. Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. Water Res. 39, 3650–3656. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.006

Thurston-Enriquez, J. A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Gerba, C.P., 2003. Chlorine Inactivation of Adenovirus Type 40 and Feline Calicivirus. Appl. Environ. Microbiol. 69, 3979–3985. https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3979-3985.2003

Thurston-Enriquez, Jeanette A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Riley, K., Gerba, C.P., 2003. Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. Appl. Environ. Microbiol. 69, 577–582. https://doi.org/10.1128/aem.69.1.577-582.2003

Tian, P., Yang, D., Quigley, C., Chou, M., Jiang, X., 2013. Inactivation of the Tulane virus, a novel surrogate for the human norovirus. J. Food Prot. 76, 712–718. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-361

Tillaut, H., Encrenaz, N., Checlair, E., Alexandre-Bird, A., Comes Do Esperito Santo, E., Beaudeau, P., 2004. Epidémie de gastro-entérite, Isère, novembre 2002. BEH.

Torner, N., Martinez, A., Broner, S., Moreno, A., Camps, N., Domínguez, A., Working Group for the Study of Acute Viral Gastroenteritis Outbreaks in Catalonia, 2016. Epidemiology of Acute Gastroenteritis Outbreaks Caused by Human Calicivirus (Norovirus and Sapovirus) in Catalonia: A Two Year Prospective Study, 2010-2011. PloS One 11, e0152503. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152503

Tornevi, A., Bergstedt, O., Forsberg, B., 2014. Precipitation effects on microbial pollution in a river: lag structures and seasonal effect modification. PloS One 9, e98546. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098546

Trilisky, E.I., Lenhoff, A.M., 2007. Sorption processes in ion-exchange chromatography of viruses. J. Chromatogr. A 1142, 2–12. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.094

Tuladhar, E., Bouwknegt, M., Zwietering, M.H., Koopmans, M., Duizer, E., 2012a. Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety: Thermal inactivation of viruses. J. Appl. Microbiol. 112, 1050–1057. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05282.x

Tuladhar, E., Bouwknegt, M., Zwietering, M.H., Koopmans, M., Duizer, E., 2012b. Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety. J. Appl. Microbiol. 112, 1050–1057. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05282.x

Ubeda, C., Djukovic, A., Isaac, S., 2017. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. Clin. Transl. Immunol. 6, e128. https://doi.org/10.1038/cti.2017.2

Uchiyama, R., Chassaing, B., Zhang, B., Gewirtz, A.T., 2014. Antibiotic treatment suppresses rotavirus infection and enhances specific humoral immunity. J. Infect. Dis. 210, 171–182. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu037

Unesco (Ed.), 2015. Water for a sustainable world, The United Nations world water development report. UNESCO, Paris.

Unicomb, L.E., Banu, N.N., Azim, T., Islam, A., Bardhan, P.K., Faruque, A.S., Hall, A., Moe, C.L., Noel, J.S., Monroe, S.S., Albert, M.J., Glass, R.I., 1998. Astrovirus infection in association with acute, persistent and nosocomial diarrhea in Bangladesh. Pediatr. Infect. Dis. J. 17, 611–614.

USEPA, US Environmental Protection Agency, 2006. Ultraviolet Disinfection Guidance Manual.

Valentine, R.C., Pereira, H.G., 1965. Antigens and structure of the adenovirus. J. Mol. Biol. 13, 13-IN13. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80076-6

van Alphen, L.B., Dorléans, F., Schultz, A.C., Fonager, J., Ethelberg, S., Dalgaard, C., Adelhardt, M., Engberg, J.H., Fischer, T.K., Lassen, S.G., 2014. The application of new molecular methods in the investigation of a waterborne outbreak of norovirus in Denmark, 2012. PloS One 9, e105053. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105053

van Voorthuizen, E.M., Ashbolt, N.J., Schäfer, A.I., 2001. Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. J. Membr. Sci. 194, 69–79. https://doi.org/10.1016/S0376-7388(01)00522-1

Vantarakis, A., Mellou, K., Spala, G., Kokkinos, P., Alamanos, Y., 2011. A Gastroenteritis Outbreak Caused by Noroviruses in Greece. Int. J. Environ. Res. Public. Health 8, 3468–3478. https://doi.org/10.3390/ijerph8083468

Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Lindburg, K., Morales, D., 1987. Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2218–2221.

Verani, M., Di Giuseppe, G., Tammaro, C., Carducci, A., 2016. Investigating the role of Acanthamoeba polyphaga in protecting Human Adenovirus from water disinfection treatment. Eur. J. Protistol. 54, 11–18. https://doi.org/10.1016/j.ejop.2016.02.006

Vestergaard, L.S., Olsen, K.E., Stensvold, C.R., Böttiger, B.E., Adelhardt, M., Lisby, M., Mørk, L., Mølbak, K., 2007. Outbreak of severe gastroenteritis with multiple aetiologies caused by contaminated drinking water in Denmark, January 2007. Eurosurveillance 13.

Vikram, T., Kumar, P., 2018. Analysis of Hepatitis E virus (HEV) X-domain structural model. Bioinformation 14, 398–403. https://doi.org/10.6026/97320630014398

Vincent, G.P., Macmahon, J.D., Synan, J.F., 1946. The Use of Chlorine Dioxide in Water Treatment. Am. J. Public Health Nations Health 36, 1035–1037.

Volkin, D.B., Burke, C.J., Marfia, K.E., Oswald, C.B., Wolanski, B., Middaugh, C.R., 1997. Size and conformational stability of the hepatitis A virus used to prepare VAQTA, a highly purified inactivated vaccine. J. Pharm. Sci. 86, 666–673. https://doi.org/10.1021/js960475h

Waldman, P., Meseguer, A., Lucas, F., Moulin, L., Wurtzer, S., 2017. Interaction of Human Enteric Viruses with Microbial Compounds: Implication for Virus Persistence and Disinfection

Treatments. Environ. Sci. Technol. 51, 13633–13640. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03875

Wallis, C., Melnick, J.L., 1961. Stabilization of poliovirus by cations. Tex. Rep. Biol. Med. 19, 683–700.

Wallis, C., Yang, C.-S., Melnick, J.L., 1962. Effect of Cations on Thermal Inactivation of Vaccinia, Herpes Simplex, and Adenoviruses. J. Immunol. 89, 41.

Walshe, G.E., Pang, L., Flury, M., Close, M.E., Flintoft, M., 2010. Effects of pH, ionic strength, dissolved organic matter, and flow rate on the co-transport of MS2 bacteriophages with kaolinite in gravel aquifer media. Water Res. 44, 1255–1269. https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.11.034

Wang, X., Hu, X., Wang, H., Hu, C., 2012. Synergistic effect of the sequential use of UV irradiation and chlorine to disinfect reclaimed water. Water Res. 46, 1225–1232. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.027

Waqar, S., Koirala, J., 2019. Hepatitis E, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Ward, R.L., Knowlton, D.R., Winston, P.E., 1986. Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. Appl. Environ. Microbiol. 52, 450–459.

Watson, H.E., 1908. A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant. J. Hyg. (Lond.) 8, 536–542. https://doi.org/10.1017/s0022172400015928

Wei, C., Farkas, T., Sestak, K., Jiang, X., 2008. Recovery of infectious virus by transfection of in vitro-generated RNA from tulane calicivirus cDNA. J. Virol. 82, 11429–11436. https://doi.org/10.1128/JVI.00696-08

Werber, D., Lausević, D., Mugosa, B., Vratnica, Z., Ivanović-Nikolić, L., Zizić, L., Alexandre-Bird, A., Fiore, L., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Battistone, A., Gassilloud, B., Perelle, S., Nitzan Kaluski, D., Kivi, M., Andraghetti, R., Pollock, K.G.J., 2009. Massive outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of municipal drinking water in a European capital city. Epidemiol. Infect. 137, 1713–1720. https://doi.org/10.1017/S095026880999015X

WHO, 2006. Excreta and greywater use in agriculture, 3. ed. ed, Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. World Health Organization, Geneva.

Wigginton, K.R., Kohn, T., 2012. Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. Curr. Opin. Virol. 2, 84–89. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.11.003

Wigginton, K.R., Menin, L., Sigstam, T., Gannon, G., Cascella, M., Hamidane, H.B., Tsybin, Y.O., Waridel, P., Kohn, T., 2012a. UV Radiation Induces Genome-Mediated, Site-Specific Cleavage in Viral Proteins. ChemBioChem 13, 837–845. https://doi.org/10.1002/cbic.201100601

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

Wigginton, R.K., Menin, L., Montoya, J.P., Kohn, T., 2010. Oxidation of Virus Proteins during UV $_{254}$ and Singlet Oxygen Mediated Inactivation. Environ. Sci. Technol. 44, 5437–5443. https://doi.org/10.1021/es100435a

Wiktor, S.Z., 2017. Viral Hepatitis, in: Holmes, K.K., Bertozzi, S., Bloom, B.R., Jha, P. (Eds.), Major Infectious Diseases. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank, Washington (DC).

Wilen, C.B., Lee, S., Hsieh, L.L., Orchard, R.C., Desai, C., Hykes, B.L., McAllaster, M.R., Balce, D.R., Feehley, T., Brestoff, J.R., Hickey, C.A., Yokoyama, C.C., Wang, Y.-T., MacDuff, D.A., Kreamalmayer, D., Howitt, M.R., Neil, J.A., Cadwell, K., Allen, P.M., Handley, S.A., van Lookeren Campagne, M., Baldridge, M.T., Virgin, H.W., 2018. Tropism for tuft cells determines immune promotion of norovirus pathogenesis. Science 360, 204–208. https://doi.org/10.1126/science.aar3799

Wilson, S.S., Wiens, M.E., Smith, J.G., 2013. Antiviral mechanisms of human defensins. J. Mol. Biol. 425, 4965–4980. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.038

Wingender, J., Flemming, H.-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 417–423. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009

Wobus, C.E., Thackray, L.B., Virgin, H.W., 2006. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. J. Virol. 80, 5104–5112. https://doi.org/10.1128/JVI.02346-05

Wolf, C., von Gunten, U., Kohn, T., 2018. Kinetics of Inactivation of Waterborne Enteric Viruses by Ozone. Environ. Sci. Technol. 52, 2170–2177. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05111

Wommack, K.E., Hill, R.T., Muller, T.A., Colwell, R.R., 1996. Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1336–1341.

Wong, K., Mukherjee, B., Kahler, A.M., Zepp, R., Molina, M., 2012. Influence of Inorganic Ions on Aggregation and Adsorption Behaviors of Human Adenovirus. Environ. Sci. Technol. 46, 11145–11153. https://doi.org/10.1021/es3028764

World Health Organization, Global Hepatitis Programme, 2017. Global hepatitis report, 2017.

Wurtzer, S., Prevost, B., Lucas, F.S., Moulin, L., 2014. Detection of enterovirus in environmental waters: A new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. J. Virol. Methods 209, 47–54. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.08.016

Yamada, Y., Shigeta, A., Nozu, K., 1973. Ultraviolet effects on biological function of RNA phage MS2. Biochim. Biophys. Acta 299, 121–135. https://doi.org/10.1016/0005-2787(73)90403-6

Yamamoto, H., Shimojo, H., 1971. Multiplicity reactivation of human adenovirus type 12 and simian virus 40 irradiated by ultraviolet light. Virology 45, 529–531. https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90355-2

Yamashita, T., Kobayashi, S., Sakac, K., Nakata, S., Chiba, S., Ishihara, Y., Isomura, S., 1991. Isolation of Cytopathic Small Round Viruses with BS-C-l Cells from Patients with Gastroenteritis. J. Infect. Dis. 164, 954–957. https://doi.org/10.1093/infdis/164.5.954

Yates, M.V., Gerba, C.P., Kelley, L.M., 1985. Virus persistence in groundwater. Appl. Environ. Microbiol. 49, 778–781.

Yates, M.V., Yates, S.R., Gerba, C.P., 1988. Modeling microbial fate in the subsurface environment. Crit. Rev. Environ. Control 17, 307–344. https://doi.org/10.1080/10643388809388339

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. https://doi.org/10.1007/s12560-011-9056-7

Yin, X., Ambardekar, C., Lu, Y., Feng, Z., 2016. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. J. Virol. 90, 4232–4242. https://doi.org/10.1128/JVI.02804-15

Young, D.C., Sharp, D.G., 1977. Poliovirus aggregates and their survival in water. Appl. Environ. Microbiol. 33, 168–177.

Youngner, J.S., 1957. Thermal inactivation studies with different strains of poliovirus. J. Immunol. Baltim. Md 1950 78, 282–290.

Yu, J.-M., Ao, Y.-Y., Li, L.-L., Duan, Z.-J., 2017. Identification of a novel cosavirus species in faeces of children and its relationship with acute gastroenteritis in China. Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 23, 550–554. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.02.018

Yvon, J., Vincent, N., Bourrin, S., 2019. Investigation d'une épidémie de gastro-entérites aiguës d'origine hydrique à Vif-Le Gua, Isère, mars 2016.

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. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040003

Zhang, Y., Cremer, P.S., 2006. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. Curr. Opin. Chem. Biol. 10, 658–663. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.09.020

Zhong, Q., Carratalà, A., Nazarov, S., Guerrero-Ferreira, R.C., Piccinini, L., Bachmann, V., Leiman, P.G., Kohn, T., 2016. Genetic, Structural, and Phenotypic Properties of MS2 Coliphage with

Resistance to ClO_2 Disinfection. Environ. Sci. Technol. 50, 13520–13528. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04170

Zhong, Q., Carratalà, A., Ossola, R., Bachmann, V., Kohn, T., 2017a. Cross-Resistance of UV- or Chlorine Dioxide-Resistant Echovirus 11 to Other Disinfectants. Front. Microbiol. 8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01928

Zhong, Q., Carratalà, A., Shim, H., Bachmann, V., Jensen, J.D., Kohn, T., 2017b. Resistance of Echovirus 11 to ClO_2 Is Associated with Enhanced Host Receptor Use, Altered Entry Routes, and High Fitness. Environ. Sci. Technol. 51, 10746–10755. https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03288

Zhou, N., Zhang, H., Lin, X., Hou, P., Wang, S., Tao, Z., Bi, Z., Xu, A., 2016. A waterborne norovirus gastroenteritis outbreak in a school, eastern China. Epidemiol. Infect. 144, 1212–1219. https://doi.org/10.1017/S0950268815002526

Zhuang, J., Jin, Y., 2003. Virus retention and transport as influenced by different forms of soil organic matter. J. Environ. Qual. 32, 816–823.

Zoni, R., Zanelli, R., Riboldi, E., Bigliardi, L., Sansebastiano, G., 2007. Investigation on virucidal activity of chlorine dioxide. experimental data on feline calicivirus, HAV and Coxsackie B5. J. Prev. Med. Hyg. 48, 91–95.