



**HAL**  
open science

# Contributions des principales étapes du traitement des eaux usées à l'abattement des charges en virus entériques humains : approche des mécanismes mis en jeu

Doriane Delafosse

► **To cite this version:**

Doriane Delafosse. Contributions des principales étapes du traitement des eaux usées à l'abattement des charges en virus entériques humains : approche des mécanismes mis en jeu. Ecologie, Environnement. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2024. Français. NNT : 2024GRALV019 . tel-04730735

**HAL Id: tel-04730735**

**<https://theses.hal.science/tel-04730735v1>**

Submitted on 10 Oct 2024

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biodiversité-Ecologie-Environnement

Unité de recherche : Institut de Biologie Structurale

## Contributions des principales étapes du traitement des eaux usées à l'abattement des charges en virus entériques humains : approche des mécanismes mis en jeu

## Contributions of the wastewater treatment main stages to the human enteric virus loads reduction: approach to involved mechanisms

Présentée par :

**Doriane DELAFOSSE**

### Direction de thèse :

**Patrice MORAND**  
Université Grenoble Alpes  
**Laurent DUCLAUX**  
Université de Savoie Mont-Blanc

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

### Rapporteurs :

**Laurent MOULIN**  
DOCTEUR EN SCIENCES HDR, Eau de Paris  
**Isabelle BERTRAND**  
MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université de Lorraine

### Thèse soutenue publiquement le **1 juillet 2024**, devant le jury composé de :

<b>Raphaële GERMI,</b> PROFESSEURE DES UNIVERSITES - PRATICIENNE HOSPITALIERE, CHU Grenoble Alpes	Présidente
<b>Patrice MORAND,</b> PROFESSEUR DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, CHU Grenoble Alpes	Directeur de thèse
<b>Laurent DUCLAUX,</b> PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université de Chambéry	Co-directeur de thèse
<b>Laurent MOULIN,</b> DOCTEUR EN SCIENCES HDR, Eau de Paris	Rapporteur
<b>Isabelle BERTRAND,</b> MAITRESSE DE CONFERENCES HDR, Université de Lorraine	Rapporteuse
<b>Emile SYLVESTRE,</b> ASSISTANT PROFESSOR, Delft University of Technology	Examineur

### Invités :

**Marie-Eve GSTALDER**  
DOCTEURE EN SCIENCES, Dalkia  
**Dominique FONTVIEILLE**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES EMERITE,





## Remerciements

J'aimerais tout d'abord exprimer ma reconnaissance à **Alain Gautier**, le président d'Abiolab, pour l'intérêt qu'il a su porter à la recherche en virologie et la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de réaliser ce travail au sein de son entreprise durant cette période compliquée.

J'adresse ensuite mes remerciements à **Laurent Moulin** et **Isabelle Bertrand** qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également **Emile Sylvestre**, pour son implication dans ce travail en tant qu'examinateur. Un grand merci à **Raphaële Germi**, qui, après m'avoir suivie tout au long de ces 3 années en tant que membre de mon Comité de Suivi de Thèse (CSI), a accepté d'endosser le rôle d'examinatrice. Merci également à **Marie-Eve Gstalder** qui a accepté de se replonger dans le monde de la recherche académique afin de participer à l'évaluation de ce travail.

Je souhaite également remercier **Patrice Morand**, pour avoir accepté de diriger cette thèse malgré les responsabilités qui incombent au poste de doyen de la faculté de médecine, et pour ses encouragements dans l'avancée de mon travail.

A **Laurent Duclaux**, mon co-directeur de thèse, j'aimerais également exprimer ma gratitude pour m'avoir fait découvrir la chimie des matériaux, un monde que je n'aurais pas pensé côtoyer en débutant cette thèse, mais qui me paraît tellement complémentaire de la virologie environnementale maintenant. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

**Dominique Fontvieille**, qui m'a fait l'honneur de m'encadrer au sein de l'entreprise Abiolab, et dont le soutien, la bienveillance, et les conseils avisés m'ont accompagnée tout au long de ce travail. Je n'ai pas assez de mots pour vous exprimer ma gratitude. Je garderai votre passion, votre dévouement à la science (et l'ingéniosité de vos prototypes) comme source d'inspiration pour le reste de ma carrière.

Je remercie **Laurence Reinert** pour m'avoir partagé ses connaissances des matériaux, et pour son regard pertinent sur nos projets de recherche communs.

J'adresse également ma reconnaissance au professeur **Roger Gadiou** pour avoir accepté de présider mon CSI, et pour ses remarques et suggestions sur les matériaux adsorbants.

A **Sébastien Wurtzer**, dernier membre de mon CSI, toujours disponible pour partager ses connaissances en biologie moléculaire : un grand merci pour la patience et la pédagogie dont tu as fait preuve pour me guider dans mon projet de séquençage.

Je tiens également à exprimer ma gratitude aux membres du conseil scientifique Asposan que je n'ai pas encore cités, **Jean-Marie Seigneurin**, **Jacques Croizé**, **Renée Grillot**, **Max Maurin**, **Caroline Landelle** et **Jean-Marc Lévêque**, pour leur intérêt, leurs conseils et leurs encouragements prodigués au cours des réunions de présentation d'avancement de ce travail.

Un immense merci à **Fabienne Belleville**, **Yvon Guitonneau**, **Eric Pinson**, et leurs collaborateurs pour nous avoir ouvert les portes de l'UDEP Grand Chambéry avec beaucoup de gentillesse et d'intérêt pour ce travail. Je remercie également **Hubert Charbonnier**, **François Voelker** et **Laurent Biotteau** de

SNF, pour nous avoir partagé leurs connaissances des polymères (et leur matériel). Merci également aux membres de la plateforme de microscopie électronique M4D, et en particulier **Jean-Philippe Kleman**, pour sa disponibilité, ses conseils techniques et son aide sur le plan administratif. J'aimerais également remercier **Philippe Azaïs** et **Yannick Mugnier** pour leur collaboration dans certains projets présentés (ou non) dans ce manuscrit.

A mes compagnons de laboratoire : **Benoît**, qui m'a accueillie dans sa petite équipe R&D. Je me souviendrai longtemps de ta gentillesse, tes conseils et tes questions étranges mais toujours très drôles (tu préfères... ?). **Alex**, avec qui j'ai partagé un bureau pendant quelques mois avant qu'il ne parte vers d'autres horizons. Je te souhaite de t'épanouir dans ta carrière de jeune ingénieur. **Corine**, présente sur tous les fronts, entre l'alim', l'environnement, la biomol et la R&D, et toujours avec bonne humeur. Et **Sylvain** (également sur tous les fronts) avec qui j'ai partagé quelques bières autour de parties de Mölkky ou de blindtests ! Je vous souhaite d'être heureux encore de longues années avec Noémie (et Pistache).

Aux (anciens) étudiants que j'ai eu le plaisir d'encadrer pour leurs stages de Master, **Habiba**, **Mathieu** et **Clément**, j'aimerais également présenter ma gratitude. J'espère avoir pu vous aider dans votre parcours scientifique autant que vous m'avez aidé à développer mes connaissances en chimie et ma pédagogie. A Clément notamment, qui prépare maintenant sa thèse, un grand merci pour me permettre de suivre, à travers ton travail, la continuité de mes travaux sur les matériaux adsorbants. Je vous souhaite à tous les trois de réussir vos projets futurs.

J'aimerais également remercier les **autres collaborateurs** d'Abiolab ou d'ailleurs, que j'ai pu côtoyer, de près ou de loin, pour une analyse, un renseignement au détour d'un couloir ou un détail administratif.

Je n'oublie pas non plus toutes les personnes qui m'ont amenée à suivre le chemin jusqu'à ce moment. Mes **professeurs de biologie**, qui ont su, au fil des années, me captiver bien plus que les autres, **Eric Cascalès**, qui m'a ouvert la porte de la microbiologie quand j'hésitais encore avec l'immunologie et les neurosciences, mais surtout **Bernard La Scola**, qui m'a accueillie dans son équipe quand je doutais de ma légitimité en tant que scientifique, et grâce à qui j'ai (re-)découvert une passion pour les virus.

Je finirai ces remerciements par mes proches, famille et amis, avec qui j'ai passé de bons moments malgré la distance, mais plus particulièrement...

...A ma grand-mère **Janine**, qui m'a aidée dans ce travail « mais juste moralement ! » (et qui a probablement déjà prévenu tout Marseille de son achèvement).

...A mes parents, **Christine** et **Thierry** qui m'ont soutenue, encouragée et aidée à devenir la personne que je suis aujourd'hui

...A mon frère **Wilhelm**, pour qui cette année marquera également un tournant dans sa vie (et celle de Luz !).

...A **Nox** et **Milky**, mes deux anti-stress à fourrure, qui ont grandi en même temps que ce travail.

...Et enfin, à **Jordan**, qui a accepté de quitter ton sud natal pour me suivre dans cette aventure. Merci pour cette (presque) décennie passée ensemble, et pour les autres qu'il nous reste à vivre.



# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	21
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	23
S.1. Les virus entériques humains : caractéristiques structurales, génomiques et épidémiologiques .....	24
S.1.1. <i>Adenoviridae</i> (Adénovirus humains) .....	26
S.1.2. <i>Astroviridae</i> (Astrovirus humains) .....	26
S.1.3. <i>Caliciviridae</i> (Norovirus et Sapovirus humains).....	27
S.1.4. <i>Hepeviridae</i> (virus de l'Hépatite E) .....	29
S.1.5. <i>Picornaviridae</i> (Cosavirus, Enterovirus, virus de l'Hépatite A, virus Aichi, Parechovirus, Salivirus) .....	29
S.1.6. <i>Reoviridae</i> (Rotavirus A) .....	31
S.2. Les VEH dans le cycle de l'eau .....	32
S.3. Facteurs potentiels du contrôle des charges virales dans les eaux.....	33
S.4. Dispositifs de collecte et de traitement des eaux usées .....	35
S.4.1. Typologie des réseaux de collecte des eaux usées.....	35
S.4.2. Principales étapes du traitement des eaux usées urbaines .....	37
S.5. Efficacité des STEPs dans l'abattement des charges virales .....	41
S.6. Techniques d'analyse des VEH dans les eaux usées (et les boues) de STEP .....	43
S.6.1. Echantillonnage et prétraitements des échantillons.....	45
S.6.2. Extraction et concentration des virus.....	48
S.6.3. Quantification des virus dans les eaux usées .....	50
S.6.4. Les virus modèles.....	57
S.6.5. Contrôle des techniques d'analyse des virus entériques humains dans les eaux usées.....	61
<b>Objectifs</b> .....	65
<b>Matériels et Méthodes</b> .....	67
MM.1. Virus modèles de cette étude : souches, culture et détermination du titre infectieux .....	68
MM.1.1. MNV .....	68
MM.1.2. MS2.....	70
MM.2. Protocole d'analyse des virus dans les eaux usées.....	72
MM.2.1. Prétraitement des échantillons .....	72
MM.2.2. Extraction des virus.....	72
MM.2.3. Extraction, concentration et purification des acides nucléiques.....	73
MM.2.4. Quantification des virus.....	73

MM.3. Etude de l'évolution des charges véhiculées par les eaux usées dans une station d'épuration, à l'exemple de l'UDEP Grand Chambéry.....	77
MM.3.1. Campagne d'échantillonnage .....	77
MM.3.2. Descripteurs analysés .....	77
MM.3.3. Analyses statistiques.....	73
MM.4. Evaluation <i>in vitro</i> , des effets des traitements de station d'épuration sur les charges virales et l'infectivité.....	80
MM.4.1. Traitements physiques et chimiques.....	81
MM.4.2. Traitements biologiques .....	82
MM.4.3. Séquençage par la technologie Next Generation Sequencing .....	90
<b>Résultats</b> .....	97
<b>Chapitre I</b> – Le défi de l'analyse virale dans les eaux des stations d'épuration : pratiques courantes, pistes d'amélioration et approches innovantes.....	99
I.1. Adaptation et essais d'amélioration de méthodes d'extraction existantes.....	101
I.1.1. Prétraitement des échantillons .....	102
I.1.2. Extraction des virus .....	106
I.1.3. Extraction des acides nucléiques.....	109
I.1.4. Quantification génomique.....	111
I.1.5. Protocole retenu pour l'extraction des VEH à partir d'eaux usées et de boues de station d'épuration .....	113
I.2. Approche d'une technique d'échantillonnage innovante : les matériaux adsorbants .....	115
I.2.1. Adsorption et récupération des virus par l'utilisation d'un charbon actif - Article publié (2022) .....	116
I.2.2. Adsorption et récupération des virus par l'utilisation d'un chitosan - Projet de publication .....	140
I.3. Conclusions du chapitre I .....	169
<b>Chapitre II</b> – Evolution des charges véhiculées par les eaux usées dans une station d'épuration, à l'exemple de l'UDEP Grand Chambéry .....	171
II.1. Fonctionnement de la station à travers les valeurs des charges en MES, DCO et DBO .....	175
II.1.1. Distribution des valeurs des charges en MES, DCO et DBO aux trois points d'échantillonnage .....	175
II.1.2. Identification d'épisodes particuliers du point de vue de la composition des eaux reçues par la station.....	180
II.1.3. Relations entre les descripteurs au sein de chacun des régimes hydriques précédemment définis .....	190
II.1.4. Corrélations entre les précipitations, le débit et les charges entrantes .....	195
II.2. Evolution des charges en VEH des eaux usées dans leur transit au sein de l'UDEP.....	200
II.2.1. Ordres de grandeurs et variabilité des charges virales dans les eaux d'entrée .....	200

II.2.2. Relations avec les charges physiques et chimiques des eaux usées à l'entrée de l'UDEP	202
II.2.3. Effets des traitements sur les charges virales	204
II.3. Ordre de grandeur et variabilité des processus d'inhibition de l'analyse PCR	205
II.3.1. Relation avec les précipitations du jour de l'échantillonnage et des jours précédents	206
II.3.2. Relations avec les descripteurs abiotiques de l'eau d'entrée de l'UDEP	207
II.4. Conclusions du chapitre II	208
<b>Chapitre III – Incidences des traitements physiques et chimiques sur les charges en virus</b>	
entériques humains	211
III.1. Choix des polymères	213
III.2. Descripteurs étudiés	215
III.3. Mise en place du protocole expérimental	216
III.4. Effet des polymères sur des suspensions virales	217
III.4.1. Effet des polymères sur une suspension virale de MNV	218
III.4.2. Effet du FeCl <sub>3</sub> sur l'analyse des MNV par RT-qPCR	219
III.5. Essais d'optimisation du protocole expérimental	220
III.5.1. Essai d'optimisation de la quantification des VEH par cumul des floccs (boues) obtenus après floculation d'une eau usée	220
III.5.2. Essai d'optimisation de la quantification des VEH par dilution des extraits de floccs (boues)	222
III.5.3. Influence de l'âge de la solution de flocculant (FO4490) sur la rétention des VEH	223
III.5.4. Influence de l'âge du spiking sur l'évaluation de la récupération des virus	225
III.6. Effet des polymères sur les charges virales dans les eaux usées	227
III.6.1. Effet de la concentration en FeCl <sub>3</sub> en tant que coagulant combiné au AN934, (flocculant) sur la rétention des VEH dans les eaux usées	228
III.6.2. Effet des polymères organiques sur la rétention des VEH dans les eaux usées	230
III.7. Effet des polymères sur l'infectivité virale	232
III.7.1. Effet des polymères sur l'infectivité du bactériophage MS2 en suspension NaCl 0.1M	234
III.7.2. Effet des polymères sur l'infectivité du MS2 en eaux usées	235
III.8. Approche NGS de l'évolution de la diversité de VEH à travers les principales étapes de traitements de la station d'épuration	236
III.9. Conclusions du chapitre III	238
<b>Chapitre IV - Incidences du traitement biologique sur les charges en VEH des eaux usées</b>	239
IV.1 . Comparaison de biofilms de maturité différente pour leur charge en VEH et leur capacité de rétention de virus spikés	243
IV.2 . Efficacité des pilotes dans l'abattement des charges virales autochtones et spikées	244
IV.2.1 . Evolution à moyen terme (9 jours) de la capacité de rétention des charges virales	245
IV.2.2 . Evolution à court terme (24h) de la capacité de rétention des charges virales	249

IV.2.3 . Conclusions.....	261
IV.3 . Contribution de certains des mécanismes impliqués dans l'abattement des charges en VEH .....	262
IV.3.1 . Essai de mise en évidence, hors du contexte des biofiltres, de la contribution du vecteur biologique à la rétention des VEH .....	262
IV.3.2 . Effet de l'enrobage de la pouzzolane par des biofilms sur la rétention des charges virales .....	265
IV.3.3 . Effet de l'enrobage de la pouzzolane par de la matière organique (fraction < 1.2µm) sur la cinétique de rétention des virus.....	269
IV.3.4 . Approche du rôle joué par les métazoaires : contribution des annélides aux abattements des charges virales.....	281
IV.3.5 . Rétention des VEH par accrochage spécifique et non spécifique aux éléments des biofilms .....	284
IV.4 . Conclusions du Chapitre IV.....	289
<b>Conclusions générales et perspectives</b> .....	291
<b>Références</b> .....	296
<b>Résumé</b> .....	316
<b>Abstact</b> .....	317

# Abréviations

<b>(H)AdV</b>	Adénovirus (humain)	<b>NoV</b>	Norovirus
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique	<b>ORF</b>	Cadre ouvert de lecture
<b>ACP</b>	Analyse en composantes principales	<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique	<b>PCR</b>	Réaction de Polymérisation en Chaîne
<b>Ct</b>	Cycle seuil	<b>PEG</b>	PolyEthylène Glycol
<b>db</b>	double brin	<b>PFU</b>	Unité de Formation de Plaque
<b>DBO</b>	Demande Biologique en Oxygène	<b>pl</b>	point isoélectrique
<b>DCO</b>	Demande Chimique en Oxygène	<b>qPCR</b>	Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative
<b>DO</b>	Densité Optique	<b>R&amp;D</b>	Recherche et Développement
<b>ECP</b>	Effet CytoPathique	<b>rpm</b>	rotation par minute
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediaminetétraacétique	<b>RT-qPCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative après rétro-transcription
<b>HBGA</b>	Antigène tissulaire de groupe sanguin	<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
<b>kb</b>	kilobase	<b>sb</b>	simple brin
<b>LB</b>	Milieu de culture nutritif (Lysogeny Broth)	<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>MAD</b>	Median Absolute Deviation	<b>STEP</b>	STation d'EPuration
<b>MEB</b>	Microscopie Electronique à Balayage	<b>TCID50</b>	Dose infectieuse en culture cellulaire 50%
<b>MES</b>	Matières En Suspension	<b>Tm</b>	Température de fusion
<b>MET</b>	Microscopie Electronique à Transmission	<b>Tris</b>	Trisaminométhane
<b>MNV</b>	Norovirus Murin	<b>UDEP</b>	Usine de DEPollution
<b>NaCl</b>	Chlorure de sodium	<b>VEH</b>	Virus Entériques Humains
<b>NGS</b>	Séquençage nouvelle génération		

## Liste des Figures

<b>Figure S-1.</b> Représentation schématique des virions de virus entériques humains selon la famille à laquelle ils appartiennent (adapté de ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity (PMID:20947564, DOI:/10.1093/nar/gkq901).....	24
<b>Figure S-2.</b> Adenovirus serotype 5 observé par cryo-microscopie. Echelle = 100 nm. Les flèches indiquent les fibres de la capsid, caractéristiques des adénovirus (Goosney et Nemerow, 2003).....	26
<b>Figure S-3.</b> Astrovirus observés par microscopie électronique. Echelle = 100 nm (Moser et Shultz-Cherry, 2008, tiré initialement de Matsui SM and Greenberg HB, 1996) .....	27
<b>Figure S-4.</b> Observation de Norovirus au microscope électronique (Kapikian <i>et al.</i> 1972).....	27
<b>Figure S-5.</b> Virus de l'hépatite E observés au microscope électronique. Echelle = 50 nm (Xing <i>et al.</i> 2010).....	29
<b>Figure S-6.</b> Enterovirus 71 observés au microscope électronique. Echelle = 50 nm (Chia <i>et al.</i> 2014).....	30
<b>Figure S-7.</b> Rotavirus observés par cryomicroscopie électronique. Echelle = 50 µm (Grant et Grigorieff, 2015) .....	31
<b>Figure S-8.</b> Circulation des virus entériques humains dans le cycle des eaux urbaines (adapté de Schwartzbrod, 1991) .....	33
<b>Figure S-9.</b> Représentation schématique des principales étapes du traitement de l'usine de dépollution des eaux usées de l'agglomération chambérienne (UDEP Grand Chambéry). Le traitement primaire fait appel à des polymères. Ils sont utilisés également pour l'épaississement des boues issues des biofiltres. ....	36
<b>Figure S-10.</b> Principe de la coagulation.....	38
<b>Figure S-11.</b> Principe de la floculation. ....	39
<b>Figure S-12.</b> Exemples de coagulants et de floculants utilisés pour le traitement des eaux usées essentiellement au niveau du traitements primaire. ....	39
<b>Figure S-13.</b> Exemples de valeurs d'occurrence de VEH dans les influents et effluents de STEP (adapté des données publiées par Corpus <i>et al.</i> 2020). ....	43
<b>Figure S-14.</b> Principales étapes de l'analyse des virus dans les échantillons environnementaux. Une liste non-exhaustive des techniques décrites dans la littérature est donnée pour chacune des étapes. ....	44
<b>Figure MM-1.</b> Protocole retenu pour l'analyse des virus dans les eaux usées de station d'épuration.....	76
<b>Figure MM-2.</b> Vue aérienne de l'UDEP Grand Chambéry. Les croix représentent les sites d'échantillonnages au niveau desquels les charges en NoV GI, NoV GII et AdV ont été mesurées : entrée de station, entrée de réacteurs biologiques, sortie de station. ....	77
<b>Figure MM-3.</b> Design expérimental des expériences sur l'effet des polymères sur les charges virales en eaux usées.....	81
<b>Figure MM-4.</b> Protocole expérimental des expériences sur l'effet du temps de contact de l'eau avec les biofilms sur la rétention des charges virales .....	82
<b>Figure MM-5.</b> Protocole expérimental des expériences relatives à l'effet de la croissance du biofilm sur la rétention des virus .....	83

<b>Figure MM-6.</b> Protocole expérimental visant à mettre en évidence le rôle du vecteur biologique sur la rétention des VEH à l'exemple de grains de pouzzolane isolés du contexte des biofiltres.....	85
<b>Figure MM-7.</b> Protocole expérimental de l'essai sur la comparaison de la rétention des virus sur la pouzzolane calcinée et sur la pouzzolane colonisée par des biofilms. ....	86
<b>Figure MM-8.</b> Design expérimental pour l'évaluation de l'effet de la matière organique dissoute sur la rétention des virus. ....	87
<b>Figure MM-9.</b> Protocole expérimental pour la recherche des VEH dans le tube digestif des vers oligochètes <i>Tubifex tubifex</i> . ....	88
<b>Figure MM-10.</b> Protocole expérimental pour la visualisation par immunofluorescence d'HBGA-like dans les biofilms de station d'épuration.....	89
<b>Figure MM-11.</b> Principales étapes de la préparation des bibliothèques et du séquençage NGS par une approche de séquençage d'amplicons, sur séquenceur MiSeq Illumina.....	91
<b>Figure MM-12.</b> Alignement des amorces proposées par Allard <i>et al.</i> (2001) avec une séquence consensus des Adénovirus. Les bases inadaptées sont surlignées en rouge. A = adénine ; T = thymine ; G = guanine ; C = cytosine ; S = C ou G ; R = A ou G ; K = G ou T ; W = A ou T ; D = A, G ou T, I = inosine .....	94
<b>Figure I-1.</b> Boues primaires (gauche) et boues biologiques (droite) obtenues après dessiccation.....	103
<b>Figure I-2.</b> Influence de l'ajout de tensioactif sur l'adsorption des virus sur les parois de tubes en polypropylène. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	105
<b>Figure I-3.</b> Représentation schématique des méthodes testées pour l'extraction des VEH à partir de boues ou d'eaux usées. Tampon d'éluion = Glycine 50 mM + extrait de bœuf 3% pH9,6 ; Tampon de lyse = tampon commercial NucliSENS® ; PBS 2X pH7 ; RT = Room Temperature (20°C ± 2°C). ....	107
<b>Figure I-4.</b> Comparaison de deux méthodes d'extraction des virus à partir d'eaux usées et de boues. La méthode 1 est adaptée d'un protocole initialement décrit par Guzman <i>et al.</i> (2003, la méthode 2 est, elle, adaptée d'un protocole initialement décrit par Pina <i>et al.</i> (1998). Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	108
<b>Figure I-5.</b> Comparaison de l'efficacité de deux tampons de lyse sur la mesure de VEH par RT-qPCR. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).....	110
<b>Figure I-6.</b> Protocole retenu pour l'analyse des virus dans les eaux usées de station d'épuration.....	114
<b>Figure I-7.</b> Charbon actif en poudre (gauche) et billes d'hydrogel de chitosan (droite) utilisés dans nos travaux sur la recherche de stratégies alternatives de récupération des virus dans les matrices hydriques.....	115
<b>Figure II-1.</b> (A) Fréquences des charges en MES aux trois points d'échantillonnage, (B) Médianes, écarts interquartiles, minima et maxima des MES aux trois points d'échantillonnage.....	176
<b>Figure II-2.</b> Fréquences des charges organiques (DCO, DBO) aux trois points d'échantillonnage. ....	176

<b>Figure II-3.</b> Médianes, écarts interquartiles, minima et maxima de la DCO et de la DBO aux trois points d'échantillonnage.....	176
<b>Figure II-4.</b> Comparaison des traitements sur le plan de l'abattement des charges. (A) Valeurs du rapport $[C]_{\text{aval}}/[C]_{\text{amont}}$ en %, (B) Valeurs résultant du calcul : $([C]_{\text{amont}} - [C]_{\text{aval}}) \times 100 / [C]_{\text{amont}}$ .....	178
<b>Figure II-5.</b> Comparaison des distributions des 3 descripteurs sur le plan de la relation entre médiane et dispersion (IQR).....	179
<b>Figure II-6.</b> Valeurs des écarts interquartiles selon les variables et les points d'échantillonnage. (A) valeurs brutes, (B) valeurs standardisées par la médiane.....	180
<b>Figure II-7.</b> Evolution de la concentration en MES durant la période d'étude.....	181
<b>Figure II-8.</b> Evolution de la DCO durant la période d'étude.....	181
<b>Figure II-9.</b> Evolution de la DBO durant la période d'étude.....	182
<b>Figure II-10.</b> Variations du débit et de la concentration en MES de l'eau d'entrée de la station, durant la période d'étude. ....	183
<b>Figure II-11.</b> Relation entre le débit et les charges en MES, DCO et DBO dans l'eau d'entrée de la station.....	184
<b>Figure II-12.</b> Situation des types de régimes pluies-débit durant la période d'étude. Les encadrés bleus correspondent aux périodes Qd <sub>éc.</sub> , les rouges aux périodes QInst-2. Leurs définitions sont données dans le texte. ....	185
<b>Figure II-13.</b> Evolutions des précipitations et du débit durant les périodes d'absence ou de faibles précipitations. ....	186
<b>Figure II-14.</b> Evolutions des précipitations et du débit durant les périodes de forte instabilité du régime pluie-débit.....	186
<b>Figure II-15.</b> Médianes et écarts interquartiles des descripteurs pour les périodes correspondant aux régimes pluies-débit choisis (DECR = périodes d'absence de précipitation ou de faibles précipitations, INST-2 = périodes de forte instabilité. ....	188
<b>Figure II-16.</b> Comparaison des rapports (médianes) entre les descripteurs de la charge des eaux entre les deux régimes pluie-débit (DECR, INST-2). Cadre : vert intervalle de confiance de la médiane, cadre orange : écart interquartile. ....	189
<b>Figure II-17.</b> Evolution des pluies et du débit en fonction du temps dans les 4 intervalles sélectionnées pour représenter les périodes d'absence de précipitation ou de faibles précipitations. Eau d'entrée de l'UDEP. ....	190
<b>Figure II-18.</b> Evolution des descripteurs en fonction du temps. Eau d'entrée de l'UDEP, périodes d'absence de précipitation ou de faibles précipitations.....	191
<b>Figure II-19.</b> Matrice de scattergrams croisant les valeurs du débit à l'entrée de la station et les descripteurs MES, DCO, DBO et DBO/DCO durant les périodes sans précipitation. r= coefficient rho. p= probabilité de l'hypothèse H0. ....	192
<b>Figure II-20.</b> Evolution des pluies et du débit en fonction du temps dans les 4 intervalles sélectionnées pour représenter les périodes de forte instabilité. Eau d'entrée de l'UDEP. .	193
<b>Figure II-21.</b> Evolution des descripteurs en fonction du temps. Eau d'entrée de l'UDEP, périodes de forte instabilité.....	194
<b>Figure II-22.</b> Matrice de scattergrams croisant les valeurs du débit à l'entrée de la station et les descripteurs MES, DCO, DBO et DBO/DCO durant les périodes de forte instabilité. r= coefficient rho. p= probabilité de l'hypothèse H0. ....	195
<b>Figure II-23.</b> Variations du rapport DCO/MES en fonction des précipitations du jour d'analyse et du rapport DBO/DCO en fonction de la moyenne des précipitations du jour d'analyse et du jour précédent. Période INST-2. r = coefficient de Spearman. ....	200

<b>Figure II-24.</b> Situation des analyses de norovirus vis-à-vis des variations des concentrations en MES durant la période d'étude. ....	201
<b>Figure II-25.</b> Comparaison des concentrations virales (médianes en unité génome/L) aux trois points d'échantillonnage (A : entrée de la station, B : amont des biofiltres, C : sortie de la station). Cadre vert intervalle de confiance de la médiane, cadre orange : écart interquartile. ....	202
<b>Figure II-26.</b> Taux d'inhibition des analyses RT-qPCR mesurés dans les 3 types d'échantillons (n=15, 3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	205
<b>Figure II-27.</b> Evolution du taux d'inhibition de l'analyse PCR en regard de celle des précipitations (moyennes du jour d'analyse et des 5 jours précédents) durant la période d'étude. ....	207
<b>Figure III-1.</b> Version modifiée du Jar-tester (gauche) et dispositif de suivi de la turbidimétrie (droite).....	213
<b>Figure III-2.</b> Formules des polymères utilisés dans les essais .....	214
<b>Figure III-3.</b> Protocole analytique des expériences sur l'effet des polymères sur la rétention des virus.....	216
<b>Figure III-4.</b> Estimation d'une durée standard de décantation par mesure de la turbidité de l'eau à mi-hauteur des jar testers. Ici après floculation au FO4490. L'intensité lumineuse est exprimée en unité arbitraire (ua). La flèche marque la durée de décantation choisie pour toutes les expériences présentées dans ce chapitre. ....	217
<b>Figure III-5.</b> Effet des polymères sur l'analyse par RT-qPCR de MNV en suspension dans NaCl 0.1M. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).....	218
<b>Figure III-6.</b> Comparaison de différentes concentrations en FeCl <sub>3</sub> pour leurs effets sur l'analyse virale par RT-qPCR. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	220
<b>Figure III-7.</b> Comparaison des proportions des virus retrouvés dans les floccs après traitement de l'eau usées au flocculant FO4490. Les floccs cumulés sont obtenus à partir de 2L d'eaux usées. Les floccs non cumulés sont obtenus à partir de 500 mL. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	221
<b>Figure III-8.</b> Effet de la dilution au 1/2 et 1/10 des extraits d'acides nucléiques de floccs sur la quantification des MNV, NoV GI et AdV par RT-qPCR. ....	222
<b>Figure III-9.</b> Influence de l'âge de la solution de polymère sur la floculation des virus en eaux usées. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).....	224
<b>Figure III-10.</b> Influence de l'âge du spiking sur la récupération des MNV dans les différentes fractions. L'eau usée a été spikée avec une suspension calibrée de MNV, entre 1 et 72h avant le début de l'expérience, sous agitation, et stockée à 4°C jusqu'à l'analyse. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	226
<b>Figure III-11.</b> Eaux usées traitées par différentes concentrations de FeCl <sub>3</sub> après 2 minutes de sédimentation (de gauche à droite : 0.025 - 0.05 - 0.1 - 0.2 g/L) .....	228
<b>Figure III-12.</b> Incidence de la concentration en FeCl <sub>3</sub> (g/L) sur les charges virales des eaux usées. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	229

<b>Figure III-13.</b> Effet des polymères sur les charges virales en eaux usées. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). .....	231
<b>Figure III-14.</b> Comparaison des effets des polymères sur les charges (mesurées par RT-qPCR) en MNV et MS2 en suspension dans NaCl 0.1M, Les résultats sont exprimés en pourcentage par référence aux concentrations mesurées en l'absence de polymère. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). .....	233
<b>Figure III-15.</b> Effets des polymères, seuls ou en combinaison, sur l'infektivité des MS2 en suspension NaCl 0.1M. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition). .....	234
<b>Figure III-16.</b> Comparaison des effets des polymères sur l'infektivité des MS2 en eaux usées spikées. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition). .....	235
<b>Figure IV-1.</b> Représentation schématique d'un pilote de biofiltre .....	240
<b>Figure IV-2.</b> Principaux facteurs potentiellement impliqués dans la rétention des virus dans les biofiltres de l'UDEP Grand Chambéry .....	242
<b>Figure IV-3.</b> Quantités de VEH mesurées dans les biofilms "jeunes" (issus des biofiltres) et dans des biofilms "matures" du canal de sortie de la STEP. Le C+ correspond à un poids équivalent d'eau ultrapure stérile spikée au MNV. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). .....	243
<b>Figure IV-4.</b> Organisation des deux expériences du suivi de l'évolution des abattements viraux. ....	244
<b>Figure IV-5.</b> Design expérimental des expériences sur l'effet de l'âge des biofilms sur la rétention des charges virales. ....	246
<b>Figure IV-6.</b> Incidence de l'âge des biofilms sur les charges virales en NoV GI, AdV et MNV restantes dans l'eau de percolation. Les mesures des jours 3-4 et 7-9 ont été regroupées pour obtenir une vision d'ensemble des évènements. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (minimum 3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	247
<b>Figure IV-7.</b> Design expérimental des expériences sur l'effet de la croissance du biofilm sur la rétention des virus .....	250
<b>Figure IV-8.</b> Evolution en fonction du temps de la réduction des charges virales dans l'eau de percolation des réacteurs. Les valeurs correspondent au rapport $(C_0 - C) \times 100 / C_0$ où $C_0$ = concentration initiale du virus dans l'eau spikées, avant son introduction dans les réacteurs, C = concentration virale dans l'eau de percolation à l'heure du prélèvement. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (n=6, avec 3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). .....	251
<b>Figure IV-9.</b> Comparaison des valeurs observées de l'évolution des concentrations virales (copies/L) en fonction du temps avec les valeurs calculées et application de deux taux de rétention successifs. Le détail des calculs est donné dans le texte. Ligne grisée : valeurs observées, ligne verte : valeurs calculées. RC = coefficient d'ajustement du modèle. Les périodes pour lesquelles le même coefficient a été appliqué sont délimitées par les lignes pointillées rouge. ....	253
<b>Figure IV-10.</b> Evolution du colmatage du remplissage des pilotes au cours de 6 répétitions de l'expérience. Indice de colmatage = 1/vitesse de percolation. ....	255

<b>Figure IV-11.</b> Relation entre l'abatement de la concentration des charges virales (copies génome/L) durant les 24h d'expérience et l'indice de colmatage des bioréacteurs.....	255
<b>Figure IV-12.</b> Evolution des abattements de charges virales (réduction log <sub>10</sub> ) en fonction de l'âge des biofilms.....	256
<b>Figure IV-13.</b> Evolution des activités hydrolasique et phosphatasique mesurées dans l'eau circulante durant les 24h d'expérience. Les valeurs sont exprimées en pourcentage par référence aux valeurs mesurées dans l'eau usée spikée avant son introduction dans les réacteurs. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (n=6, 3 réplicats par condition). .....	257
<b>Figure IV-14.</b> Evolution de la minéralisation de l'eau de percolation et des biofilms durant les 22 jours de la répétition de l'expérience. L'activité minéralisatrice est mesurée par la différence des conductivités entre deux expériences : $\text{Activité minéralisatrice} = (C_{\text{initiale}} \text{ analyse} - C_{\text{finale}} \text{ analyse précédente}) / (\text{âge biofilms analyse} - \text{âge biofilms analyse précédente}) \times 24$ . Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (n=6, 3 réplicats par condition). .....	258
<b>Figure IV-15.</b> Evolution du nombre de copies de génomes de MS2 (RT-qPCR) et de celui de sa forme infectieuse (PFU) au cours des 24h d'expérimentation. La flèche montre une augmentation de la proportion de virus infectieux à H3. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (n=3, 3 réplicats par condition). .....	259
<b>Figure IV-16.</b> Protocole expérimental de l'expérience. Des grains de pouzzolane colonisés par des biofilms extraits des biofiltres pilotes étaient mis en contact avec une suspension de MNV dans un flacon de culture sous agitation. ....	263
<b>Figure IV-17.</b> Evolution de la rétention de MNV avec le temps d'incubation à 4°C (plage bleue) et à 23°C (plage rouge). A partir de H26, deux expériences sont faites en parallèle : la courbe rouge est celle des virus retenus après ajout d'une solution nutritive (Lysogeny Broth) dans le milieu, la courbe bleue est celle des virus retenus après ajout d'eau stérile. Les valeurs sont données en pourcentages par référence à la concentration de MNV dans la suspension mise en présence des grains de pouzzolane en début d'expérience. Les plages numérotées de 1 à 5 correspondent à des changements de tendance dans l'allure des courbes. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). .....	264
<b>Figure IV-18.</b> Pouzzolane colonisée par des biofilms (A), pouzzolane calcinée (B). Observation à la loupe binoculaire (X10).....	266
<b>Figure IV-19.</b> Protocole expérimental de la comparaison des capacités de rétention des virus de la pouzzolane calcinée et de la pouzzolane colonisée par des biofilms. ....	266
<b>Figure IV-20.</b> Comparaison de la rétention de MNV et MS2 sur de la pouzzolane calcinée, dans deux conditions de température. Les valeurs sont exprimées en pourcentages par référence à la concentration des suspensions virales mises en contact avec la pouzzolane en début d'expérience. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). .....	267
<b>Figure IV-21.</b> Comparaison de la rétention des MNV et MS2 sur de la pouzzolane colonisée par des biofilms, dans deux conditions de température. Les valeurs sont exprimées en pourcentages par référence à la concentration des suspensions virales mises en contact avec la pouzzolane en début d'expérience (H0 < à 1 min de contact). Proc = procaryotes. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). .....	268
<b>Figure IV-22.</b> Protocole expérimental pour l'évaluation de l'effet de la matière organique dissoute sur la rétention des virus. ....	271

<b>Figure IV-23.</b> Variation de la moyenne du pourcentage de virus retenus (MNV) dans le cadre de chacune des variables explicatives. La ligne pointillée (ligne de référence) marque la moyenne générale, toutes valeurs des variables explicatives confondues.....	272
<b>Figure IV-24.</b> Matrice des interactions entre les variables explicatives (incubation m.o., incubation virus, filtration) dans la détermination du pourcentage de virus retenus. ....	273
<b>Figure IV-25.</b> Test de normalité de la variable rétention MNV. ....	274
<b>Figure IV-26.</b> Test de normalité de la variable rétention MS2. ....	274
<b>Figure IV-27.</b> Représentation des variables dans le plan des deux 1ers axes. ....	276
<b>Figure IV-28.</b> Relation entre le taux de rétention de MNV et le temps de contact entre la suspension virale et une pouzzolane dont le temps d'enrobage a été de 15' au contact de deux filtrats (0.45µm et 1.2µm). Témoin = pouzzolane non enrobée. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	277
<b>Figure IV-29.</b> Variation de la moyenne du pourcentage de virus retenus (MS2) dans le cadre de chacune des variables explicatives. La ligne pointillée (ligne de référence) marque la moyenne générale, toutes valeurs des variables explicatives confondues.....	278
<b>Figure IV-30.</b> Matrice des interactions entre les variables explicatives (incubation m.o., incubation virus, filtration) dans la détermination du pourcentage de virus retenus. ....	279
<b>Figure IV-31.</b> Relation entre les taux de rétention des virus et le temps de contact entre la suspension virale et une pouzzolane dont le temps d'enrobage a été de 15' au contact de deux filtrats (0.45µm et 1.2µm). Témoin = pouzzolane non enrobée. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	279
<b>Figure IV-32.</b> Images de Tubifex tubifex à la surface du lit de pouzzolane dans nos biofiltres pilotes (gauche) et après échantillonnage aux fins d'analyses (droite).....	282
<b>Figure IV-33.</b> Schéma expérimental de l'essai réalisé pour la recherche des VEH dans le tube digestif de Tubifex tubifex.....	282
<b>Figure IV-34.</b> Comparaison des concentrations en VEH, MNV et MS2 dans les eaux usées et les tubes digestifs de Tubifex tubifex. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	283
<b>Figure IV-35.</b> Mode opératoire de l'exploration de la distribution des virus dans les compartiments des biofilms. Le spiking aux MNV a été réalisé dans les échantillons de biofilms entiers juste avant leur traitement par broyage ou centrifugation.....	285
<b>Figure IV-36.</b> Concentrations de virus spiké et des virus autochtones dans les biofilms entiers, dans les eaux interstitielles (surnageant biofilms) et dans les surnageants de biofilms broyés. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR). ....	285
<b>Figure IV-37.</b> Protocole expérimental de la recherche d'HBGA-like dans les biofilms de la station d'épuration. 1) marquage des échantillons par immunofluorescence, 2) observation en microscopie confocale laser (CLSM). ....	287
<b>Figure IV-38.</b> Observations au microscope confocal d'HBGA dans des échantillons de biofilms de biofiltres par immunofluorescence. DAPI : corps bactériens. AlexaFluor 488 : HBGA-A. Merged : superposition des deux fluorescences. L'ellipse montre la colocalisation d'HBGA et de bactéries. La flèche montre la présence d'HBGA « libres ». ....	287



## Liste des Tableaux

<b>Tableau S-1.</b> Principales caractéristiques des virus entériques humains susceptibles d'être rencontrés dans les eaux environnementales. ARN = Acide RiboNucléique, ADN = Acide DésoxyriboNucléique, sb = simple brin, db = double brin, (+) brin de polarité positive .....	25
<b>Tableau S-2.</b> Exemples d'études utilisant des virus modèles des VEH. FCV = calicivirus félin : MNV = norovirus murin ; PMMoV = virus de la marbrure légère du piment ; TMV = virus de la mosaïque du tabac ; VLP = Pseudo particule virale. ....	58
<b>Tableau S-3.</b> Principales techniques d'analyses des VEH dans les eaux usées et boues de STEPs, et leurs limites. ....	62
<b>Tableau MM-1.</b> Séquences et concentrations des sondes et amorces utilisées dans notre étude, pour la quantification des virus. Y = T ou C, S = C ou G, R = A ou G, M = A ou C, {X} = base LNA ou acide nucléique verrouillé. Les amorces et sondes ciblant le MS2 sont tirées des publications de Pecson <i>et al.</i> 2009 et Carratalà <i>et al.</i> 2013, celles ciblant les AdV sont tirées de Prévost <i>et al.</i> 2015, les autres ont été désignées au sein du laboratoire Abiolab (séquence de référence GenBank : MNV = KF113527.1 ; NoV GI = KF039737.1 ; NoV GII = KF712510.1)....	74
<b>Tableau MM-2.</b> Caractéristiques RT-qPCR pour chaque cible.....	75
<b>Tableau MM-3.</b> Concentrations des différents polymères utilisés dans les expériences portant sur l'effet des polymères sur les charges virales en eaux usées.....	81
<b>Tableau MM-4.</b> Séquences et concentration des amorces utilisées pour l'évaluation de la diversité de trois VEH, dans les eaux usées, par séquençage NGS. Les amorces ciblant le NoV GII sont tirées de la publication de Abria <i>et al.</i> (2018), celles ciblant les AdV sont tirées de Allard <i>et al.</i> 2001, les autres ont été désignées au sein du laboratoire Abiolab. ....	93
<b>Tableau MM-5.</b> Séquences adaptatrices pour l'ajout ultérieur d'index de séquençage. ....	93
<b>Tableau MM-6.</b> Outils informatiques utilisés pour l'analyse des données de séquençage ....	95
<b>Tableau I-1.</b> Composition des tampons de lyse comparés dans cette étude.....	110
<b>Tableau I-2.</b> Comparaison de deux systèmes de sonde-amorces pour leur efficacité dans la détection par RT-qPCR de NoV GI dans des échantillons d'eaux usées (n=105). Ancien = système désigné à Abiolab ; Nouveau = système tiré de Prévost <i>et al.</i> 2015. Les analyses ont été réalisées simplex (seuls les NoV GI étaient recherchés) en duplicats de RT-qPCR et sur des échantillons en triplicats. ....	112
<b>Tableau I-3.</b> Efficacité de récupération du protocole retenu appliqué à différents types d'échantillons (analysés en triplicats avec duplicats de RT-qPCR).....	113
<b>Tableau II-1.</b> Statistiques descriptives des charges en MES, DCO et DBO. Q1 = 1 <sup>er</sup> quartile ; Q3 = 3 <sup>ème</sup> quartile ; IQR = écart interquartile ; IQR/Md = écart interquartile normalisé par la médiane.....	177
<b>Tableau II-2.</b> Effet des traitements sur la dispersion des valeurs des trois descripteurs. IQR = écart interquartile .....	179
<b>Tableau II-3.</b> Médianes des descripteurs pour les périodes correspondant aux régimes pluies-débit choisis. DECR = périodes d'absence de précipitation ou de faibles précipitations ; INST-2 = périodes de forte instabilité .....	187
<b>Tableau II-4.</b> Corrélations de rang (Spearman) entre le débit et les descripteurs des charges à l'entrée de la station durant les périodes sans précipitation. H0 = pas de corrélations entre les deux variables. P-value = probabilité d'obtenir un résultat au moins égal à celui obtenu ...	192

<b>Tableau II-5.</b> Corrélations de rang (Spearman) entre le débit et les descripteurs des charges à l'entrée de la station durant les périodes de forte instabilité. $p$ = probabilité de l'hypothèse $H_0$ .....	194
<b>Tableau II-6.</b> Corrélation (rho de Spearman) entre le débit et différents calculs de moyenne des précipitations (Détail des calculs donné dans le texte). Période INST-2.....	196
<b>Tableau II-7.</b> Corrélation (rho de Spearman) entre les descripteurs et différents calculs de moyenne des précipitations (Détail des calculs donné dans le texte). Période INST-2.....	197
<b>Tableau II-8.</b> Coefficient de corrélations (rho de Spearman) calculé entre les rapports des descripteurs de charge des eaux et différents calculs de moyenne des précipitations (Détail des calculs donné dans le texte). Période INST-2 .....	199
<b>Tableau II-9.</b> Statistiques descriptives des charges virales aux trois points d'échantillonnage. Les concentrations virales sont calculées sur des triplicats d'échantillons et duplicats de RT-qPCR. Les valeurs sont exprimées en copies de génome/L. ....	201
<b>Tableau II-10.</b> Coefficient de corrélation (rho de Spearman) entre les concentrations virales et les moyennes des descripteurs de la charge de l'eau usée calculées pour un nombre croissant de jours précédant le jour de l'analyse. Seuls ont été conservés les coefficients significatifs au seuil $\alpha = 0.05$ . ....	203
<b>Tableau II-11.</b> Abattements des virus (pourcentage relatif à la valeur amont et $\log_{10}$ réduction) au niveau de chacune des deux étapes de traitement et entre l'entrée et la sortie de l'UDEP. Les valeurs représentent les moyennes des 17 mesures.....	205
<b>Tableau II-12.</b> Corrélation (rho de Spearman) entre le pourcentage d'inhibition et les précipitations du jour de l'échantillonnage (Rain-1) et les moyennes de celles d'un nombre croissant de jours précédents (Rain-x). Les valeurs d'inhibition correspondent aux analyses de l'eau d'entrée de l'UDEP.....	206
<b>Tableau III-1.</b> Caractéristiques et combinaisons des polymères utilisés dans cette étude. Les combinaisons testées sont indiquées par le sigle «✓». Les polymères anioniques sont surlignés en bleu, les cationiques en rouge. ....	214
<b>Tableau III-2.</b> Médianes des valeurs des principaux descripteurs analysés dans les eaux usées. ....	215
<b>Tableau III-3.</b> Pourcentages de virus mesurés dans les échantillons dilués de boues, exprimés par référence aux quantités de virus dans l'extrait non dilué. ....	223
<b>Tableau III-4.</b> Variations du pH des suspensions virales (MNV en NaCl 0.1M) et des eaux usées en fonction de la concentration de $\text{FeCl}_3$ .....	228
<b>Tableau III-5.</b> Indice de diversité (Shannon) calculé à partir du nombre de reads obtenus au niveau des trois points d'échantillonnage. ....	237
<b>Tableau IV-1.</b> Comparatif des caractéristiques des biofiltres de l'UDEP Grand Chambéry et des pilotes de laboratoire .....	241
<b>Tableau IV-2.</b> Taux horaire de rétention des virus autochtones et spikés pour chacune des périodes définies dans le texte. ....	252
<b>Tableau IV-3.</b> Caractéristiques chimiques et biologiques des eaux usées associées aux mesures à J6-J8 et à J20-J22. ....	259
<b>Tableau IV.4.</b> Représentativité des axes définis par l'ACP .....	275
<b>Tableau IV.5.</b> Représentations des variables sur les trois premiers axes de l'analyse.....	275

## Introduction générale

Les virus entériques humains (VEH) appartiennent à plusieurs groupes systématiques potentiellement pathogènes pour l'humain, caractérisés notamment par leur capacité à proliférer dans les muqueuses intestinales et respiratoires des mammifères. Ce sont les principaux agents pathogènes des gastroentérites aiguës, mais peuvent également être responsables d'autres pathologies telles que des hépatites ou des infections des voies respiratoires ou du système nerveux (Lugo *et al.* 2016).

Les VEH peuvent être rejetés par expectoration, mais ils le sont surtout à travers les fèces. La voie principale de leur dispersion dans l'environnement est donc celle des eaux usées qui, en période épidémique, peuvent devenir des vecteurs importants de la transmission virale. L'ensemble constitué d'un réseau de collecte et d'une station d'épuration (STEP) a pour vocation d'assurer une certaine maîtrise de cette voie de contamination.

Les établissements de traitement des eaux usées ont été conçus, initialement, pour réduire tout à la fois les charges organiques des eaux usées et leur charge en microorganismes potentiellement pathogènes pour l'espèce humaine (Smarzewska et Morawska 2021). L'aggravation des problèmes d'approvisionnement en eau des populations, du fait du changement climatique, est venue accroître leur importance en liaison avec la mise en œuvre de dispositifs de réutilisation des eaux usées (Bao *et al.* 2012, Tortajada 2020). Les STEPs sont également confrontées au challenge du changement du régime des eaux avec l'accroissement de la fréquence d'épisodes météorologiques exceptionnels (Kirchhoff *et al.* 2019, Hughes *et al.* 2020) et à celui de la réduction de la consommation d'énergie qui leur est associée (Cardoso *et al.* 2021) dans le respect des objectifs 2030 de l'initiative SDG6 des Nations Unies (Obaideen *et al.* 2022, UN Water\_SDG6\_Synthesis Report 2023).

De nombreuses études ont été consacrées à la détection et à la quantification des virus dans les eaux usées et le rythme des publications s'est accéléré, récemment, en liaison avec la mise en évidence de l'intérêt de ces analyses en tant qu'indicateur de premier niveau, du degré de contamination des populations par le SARS-CoV-2 (Medema 2020, La Rosa *et al.* 2020, Wurtzer *et al.* 2020, Serra-Comte *et al.* 2021).

Les travaux sur les performances des STEPs dans l'abattement des charges virales sont moins nombreux et font état d'une grande variabilité en liaison avec la diversité des situations et des procédés de traitement mis en œuvre (Bhatt *et al.* 2020, Wade *et al.* 2022). A minima, les mesures sont effectuées à l'entrée et à la sortie de l'établissement, en tenant compte du temps de transit, ou de son estimation, une précision néanmoins très souvent absente. Certaines études donnent le détail des contributions relatives des deux principales étapes de traitement, primaire et secondaire (Fong *et al.* 2010, Tandukar *et al.* 2021), ou

seulement sur celle du réacteur du traitement secondaire (*Sima et al. 2011, Schmitz et al. 2016, Miura et al. 2017*).

Les difficultés de l'évaluation des charges virales dans un milieu complexe tel que celui des eaux usées concernent trois points : l'échantillonnage, l'extraction des virus et les interférences avec les composés chimiques présents dans ces eaux (*Da Silva et al. 2007*). Une revue récente des techniques de détection des virus dans les eaux usées et dans les boues en apporte la confirmation, en insistant sur la nécessité de leur apporter des améliorations (*Corpuz et al. 2020*).

La plupart des études utilisent l'efficacité globale des traitements (log du rapport entre les concentrations virales de l'amont et celles de l'aval du traitement), comme terme de comparaison des stations d'épuration ou des procédés, sans que soient données plus d'explications sur les raisons pour lesquelles l'abattement des charges s'établit au niveau constaté. Rares sont les auteurs qui en avancent une interprétation plus détaillée (*Sima et al. 2011, Maurya et al. 2020*) et qui, avec d'autres, évoquent la nécessité d'une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents (*Verbyla et al. 2015, Li et al. 2021*).

Il nous paraît utile de préciser ici que le sujet de notre travail, les points qui devaient être abordés, sa planification et le périmètre des dépenses qui pouvaient être engagées, ont été définis au cours du second semestre 2019. Le démarrage effectif du projet a eu lieu en septembre de la même année, avant même le début de cette thèse, en février 2021, et avant donc les premières alertes relatives à l'apparition d'une pneumopathie atypique à Wuhan (décembre 2019).

Sauf à renoncer à une partie des résultats qui avaient déjà été obtenus, il n'a donc pas toujours été possible de tenir compte des résultats du très grand nombre d'études sur les eaux usées qui ont été initiées à la suite de la pandémie.

# Synthèse bibliographique

## S.1. Les virus entériques humains : caractéristiques structurelles, génomiques et épidémiologiques

La gastroentérite est une maladie causée par une inflammation des tissus du tube digestif entraînant divers symptômes tels que vomissements, diarrhées et des douleurs abdominales. Chaque année, cette maladie est responsable d'environ 2 milliards de cas à travers le monde et est à l'origine d'environ 2 millions de décès par déshydratation, majoritairement dans les pays en voie de développement. Elle est considérée comme l'une des principales causes de mortalité infantile puisqu'elle est, à elle seule, responsable d'environ 18% des décès infantiles, dont 78% sont observés dans la plupart des pays d'Afrique et d'Asie du sud-est où l'accès à des soins adaptés reste difficile pour une grande partie de la population (Farthing *et al.* 2013). En France, les gastroentérites d'origine virale seraient à l'origine de près de 3 millions de consultations médicales et l'on estime à plus de 21 millions le nombre d'épisode infectieux par an (CNR virus entériques, Santé-publique France, réseau Sentinelles)

Les virus entériques, dont la réplication se tient principalement dans le tractus gastro-intestinal, sont considérés comme la première cause mondiale de gastroentérites aiguës chez l'humain. Ils se répartissent dans 6 familles : *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Hepeviridae*, *Picornaviridae* et *Reoviridae*. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le Tableau S-1 et une représentation schématique de chaque famille est proposée dans la Figure S-1.

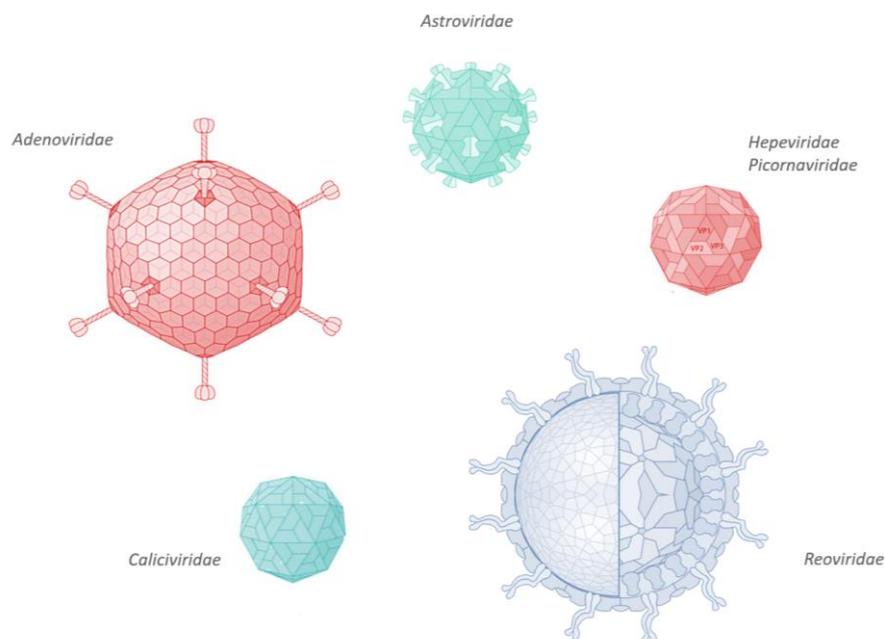


Figure S-1 Représentation schématique des virions de virus entériques humains selon la famille à laquelle ils appartiennent (adapté de ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity (PMID:20947564, DOI:/10.1093/nar/gkq901).

Tableau S-1. Principales caractéristiques des virus entériques humains susceptibles d'être rencontrés dans les eaux environnementales. ARN = Acide Ribonucléique, ADN = Acide Désoxyribonucléique, sb = simple brin, db = double brin, (+) brin de polarité positive

Famille	Genre	Espèce	Taille (nm)	Type d'acide nucléique	Taille de l'acide nucléique (kb)	Pathologies associées
<b>Adenoviridae</b>	<i>Mastadenovirus</i>	Adénovirus humain	65 – 80	ADN db	34 – 36	Respiratoires, oculaires, gastroentérites
	<i>Mastostovirus</i>	Astrovirus humain	28 – 30	ARN sb (+)	6,8 – 7,9	Gastroentérites, neurologiques
<b>Caliciviridae</b>	<i>Norovirus</i>	Norovirus humain	27 – 38	ARN sb (+)	7,7	Gastroentérites
	<i>Sapovirus</i>	Sapovirus humain	28 – 40	ARN sb (+)	7,1 – 7,7	Gastroentérites
<b>Hepeviridae</b>	<i>Orthohepevirus</i>	Virus de l'Hépatite E	26 – 34	ARN sb (+)	7,2	Hépatites
	<i>Cosavirus</i>	Cosavirus	≈ 30	ARN sb (+)	7,6	Gastroentérites suspectées
<b>Picornaviridae</b>	<i>Enterovirus</i>	Enterovirus A à D	22 – 30	ARN sb (+)	7,1 – 8,9	Respiratoires, oculaires, neurologiques, musculaires, cardiaques, gastroentérites
	<i>Hepatovirus</i>	Virus de l'Hépatite A	28 – 30	ARN sb (+)	7,5	Hépatites
	<i>Kobuvirus</i>	Aichivirus A	≈ 30	ARN sb (+)	7,0 – 8,2	Gastroentérites suspectées
	<i>Salivirus</i>	Salivirus A	≈ 30	ARN sb (+)	6,0 – 8,0	Gastroentérites suspectées
<b>Reoviridae</b>	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus	75 – 100	ARN db	18,5	Gastroentérites
	<i>Orthoreovirus</i>	(Ortho)reovirus de mammifère	60 – 100	ARN db	23.5	Respiratoires, oculaires, neurologiques, gastroentérites

### S.1.1. *Adenoviridae* (Adénovirus humains)

La famille des *Adenoviridae* se compose de cinq genres ([Harrach et al. 2012](#)) : les *Mastadenovirus*, les *Aviadenovirus*, les *Atadenovirus*, les *Ichtadenovirus* et les *Siadenovirus*. Les virus de cette famille peuvent infecter divers hôtes tels que les oiseaux, les reptiles, les poissons et les mammifères, mais seuls les *Mastadenovirus* sont infectieux pour l'humain.

Les **adénovirus humains** (HAdV) sont constitués d'une capsidie icosaédrique complexe mesurant

entre 65 et 80 nm de diamètre, et contenant un génome d'ADN double brin linéaire d'environ 34 à 36 kb. A l'heure actuelle, Les HAdV sont classés en 7 espèces (HAdV-A à HAdV-G). Leur nom fait référence aux tissus adénoïdes à partir desquels ils ont été isolés pour la première fois en 1953 ([Rowe et al. 1953](#)).

Les HAdV 40 et 41 (espèce F), sont les principaux agents de gastroentérites parmi les AdV, entraînant des symptômes tels que diarrhée, fièvre et parfois vomissements sur une période de 5 à 15 jours, avec une excrétion fécale d'environ  $10^6$  particules virales/g ([Nicand et al. 1998](#)). Ils sont identifiés comme les principaux agents de gastroentérites chez les enfants de moins de 5 ans, après les rotavirus et les norovirus ([Haramoto et al. 2007](#), [Banyai et al. 2009](#), [Sdiri-Loulizi et al. 2009](#), [Haramoto et al. 2010](#), [Rodriguez-Lazaro et al. 2012](#)). Ces infections sont généralement asymptomatiques chez les adultes ([Kaneko et al. 2008](#)). La séroprévalence mondiale pour au moins l'un des sérotypes d'HAdV est estimée à environ 90% ([Fong et al. 2010](#)). Les épidémies de gastroentérites dues aux HAdV surviennent tout au long de l'année ([Akello et al. 2020](#)). Certaines études rapportent des pics épidémiques en hiver et au printemps ([Silva et al. 2011](#), [Dey et al. 2013](#)).

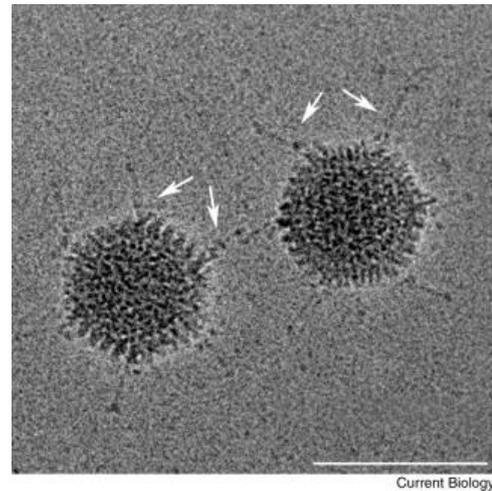


Figure S-2. *Adenovirus serotype 5* observé par cryo-microscopie. Echelle = 100 nm. Les flèches indiquent les fibres de la capsidie, caractéristiques des adénovirus ([Goosney et Nemerow, 2003](#)).

### S.1.2. *Astroviridae* (Astrovirus humains)

La famille des *Astroviridae* comprend actuellement deux genres, à savoir les *Mamastrovirus* (dont font partie les astrovirus humains), infectant les mammifères, et les *Avastrovirus*, infectant exclusivement les oiseaux ([Guix et al. 2013](#)).

Les **astrovirus humains** (HAstV) ont été initialement identifiés en 1975 par microscopie électronique ([Appleton et Higgins 1975](#), [Madeley et Cosgrove 1975](#)). Leur capsidie mesure

entre 28 et 30 nm de diamètre, et renferme un génome de type ARN à polarité positive, d'une taille comprise entre 6,8 à 7,9 kb. À ce jour, les astrovirus humains sont classés en 3 groupes : huit sérotypes « classiques » (HAstV-1 à HAstV-8) (Herrmann *et al.* 1988, Mendez-Toss *et al.* 2000) auxquels viennent s'ajouter plus récemment les sérotypes des groupes MLB (Melbourne) et VA/HMO (Virginia/Human-Mink-Ovine like) (Cordey *et al.* 2016, Janowski *et Wang* 2019). Les symptômes causés par les

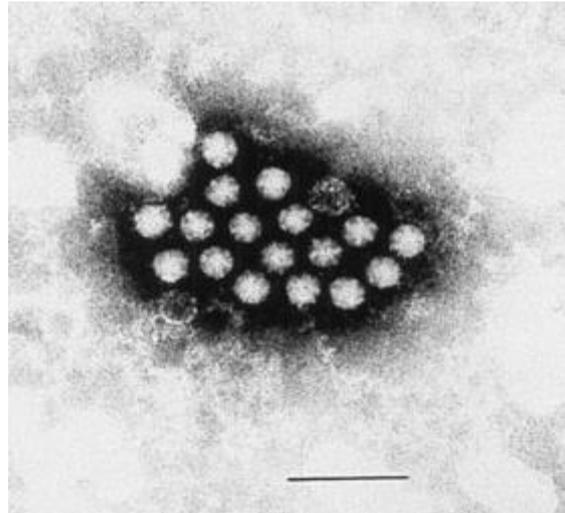


Figure S-3. Astrovirus observés par microscopie électronique. Echelle = 100 nm (Moser et Schultz-Cherry, 2008, tiré initialement de Matsui et Greenberg, 1996)

HAstV sont principalement ceux d'une gastroentérite, bien que les vomissements soient moins fréquents par rapport aux infections à norovirus ou à rotavirus (Dennehy *et al.* 2001). Les astrovirus des groupes MLB et VA ont également été associés à des pathologies touchant le système nerveux d'individus immunodéficients ou immunocompétents (Cordey *et al.* 2016, Koukou *et al.* 2019, Maximova *et al.* 2023). La gravité globale des symptômes liés aux gastroentérites est moindre que celle des rotavirus, entraînant moins d'hospitalisations. L'excrétion virale dure environ 12 jours, atteignant environ  $10^6$  particules virales/g de selles (Nicand *et al.* 1998). Les HAstV sont une cause majeure de gastroentérites aiguës chez les personnes à risque, telles que les personnes âgées, les jeunes enfants et les immunodéprimés, ainsi que chez les adultes. Les épidémies de HAstV surviennent pendant l'hiver dans les pays à climat tempéré, tandis qu'elles se produisent généralement pendant la saison des pluies dans les pays tropicaux (Mustafa *et al.* 2001).

### S.1.3. *Caliciviridae* (Norovirus et Sapovirus humains)

Actuellement, la famille des *Caliciviridae* se compose de cinq genres : *Lagovirus*, *Nebovirus*, *Norovirus*, *Sapovirus* et *Vesivirus* (Clarke *et al.* 2012). De plus, six nouveaux genres (*Bavovirus*, *Nacovirus*, *Recovirus*, *Valovirus*, *Salovirus* et *Secalivirus*) ont été

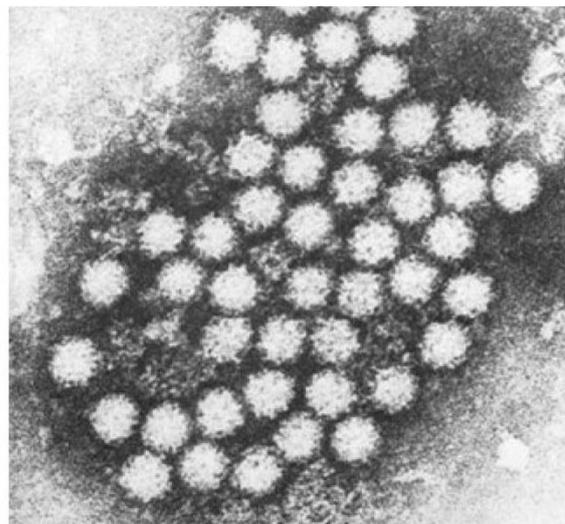


Figure S-4. Observation de Norovirus au microscope électronique (Kapikian *et al.* 1972)

2011, Ng *et al.* 2012, Wolf *et al.* 2012, Mikalsen *et al.* 2014). Le nom de cette famille provient d'observations en microscopie électronique après révélation de motifs en forme de calice. Bien que ces virus aient la capacité d'infecter divers hôtes tels que les oiseaux, les poissons et les mammifères, seuls les genres *Norovirus* (NoV) et *Sapovirus* (SapoV) ont été identifiés comme infectieux pour l'humain, pouvant entraîner des troubles gastro-intestinaux.

Les **norovirus** (anciennement *Norwalk virus* ou *Norwalk-like virus*) présentent une capsidie d'environ 27 à 38 nm de diamètre, contenant un génome ARN simple brin de polarité positive d'environ 7,7 kb. En l'absence de modèle cellulaire, leur classification repose sur des critères génétiques. Les NoV sont classés en 10 génogroupes, dont seuls les génogroupes GI, GII et GIV sont capables d'infecter les humains (Chhabra *et al.* 2019). Bien que les infections à NoV soient généralement de courte durée, de l'ordre de quelques jours, elles peuvent être plus sévères, voire mortelles, chez les populations à risques. L'excrétion des particules virales ( $10^5$  à  $10^{11}$  copies par gramme de fèces) peut survenir dans les 18h après l'infection, et durer en moyenne 10 à 30 jours chez des adultes sains, mais varie en fonction de l'âge et de l'état de santé (Atmar *et al.* 2008, Teunis *et al.* 2008, Aoki *et al.* 2010, Wu *et al.* 2019). Les NoV sont considérés comme la principale cause de gastro-entérites d'origine non bactérienne, responsables de la moitié des cas de gastro-entérites tous âges confondus. Les NoV se transmettent principalement par voie interhumaine, mais peuvent également être associés à des infections liées à la consommation d'aliments ou d'eau contaminée, représentant environ 10% des cas. Les infections liées aux NoV surviennent tout au long de l'année, avec un pic en période hivernale.

Les **sapovirus** ont une capsidie de 28 à 40 nm de diamètre renfermant un génome de 7,1 à 7,7 kb. A l'heure actuelle, on considère qu'il existe 19 génogroupes de sapovirus, dont seulement 4 sont associés des infections chez l'humain (GI, GII, GIV et GV). Les symptômes résultant d'une infection par des SapoV comprennent ceux de la gastro-entérite, tels que les vomissements et la diarrhée, ainsi que des symptômes associés (nausées, des crampes abdominales et des maux de tête) (Johansson *et al.* 2005, Mikula *et al.* 2010, Lee *et al.* 2012). En général, les symptômes durent moins d'une semaine, bien qu'ils aient parfois été observés jusqu'à 20 jours (Sakai *et al.* 2001, Wu *et al.* 2008). Si de nombreuses infections à SapoV sont asymptomatiques (de Wit *et al.* 2001, Bucardo *et al.* 2012, Chhabra *et al.* 2013), elles peuvent néanmoins donner lieu à une excrétion virale similaire à celle des personnes présentant effectivement des symptômes de gastro-entérite. Cette excrétion peut persister jusqu'à 4 semaines après la disparition des symptômes, et libérer jusqu'à  $10^{11}$  copies de génome par gramme (Rockx *et al.* 2002, Iwakiri *et al.* 2009, Yoshida *et al.* 2009, Miyoshi *et al.* 2010, Yamashita *et al.* 2010). La période hivernale est généralement la période de l'année durant laquelle le plus grand nombre d'infections liées aux sapovirus est observé (Phan *et al.* 2004, Dey *et al.* 2012, Harada *et al.* 2013, de Oliveira-Tozetto *et al.* 2021).

#### S.1.4. *Hepeviridae* (virus de l'Hépatite E)

La famille des *Hepeviridae* se compose actuellement de quatre genres : *Avihepevirus*, regroupant les souches aviaires ; *Orthohepevirus*, regroupant la majorité des souches de mammifères ; *Chiropteranhepevirus*, regroupant les souches de chauve-souris ; et *Piscihepevirus*, contenant la souche de la truite (Johne *et al.* 2014). À ce jour, seules les souches appartenant au genre *Orthohepevirus* sont considérées capables d'infecter l'humain.

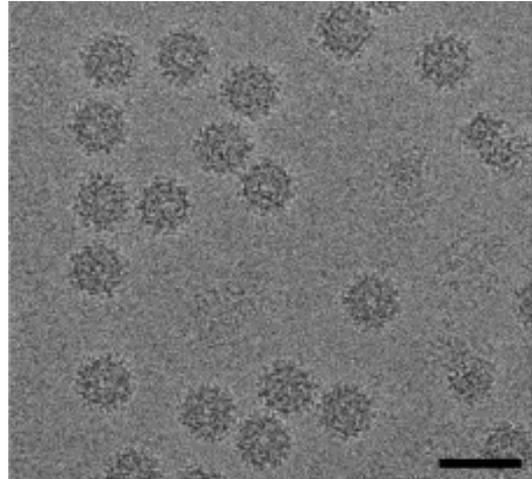


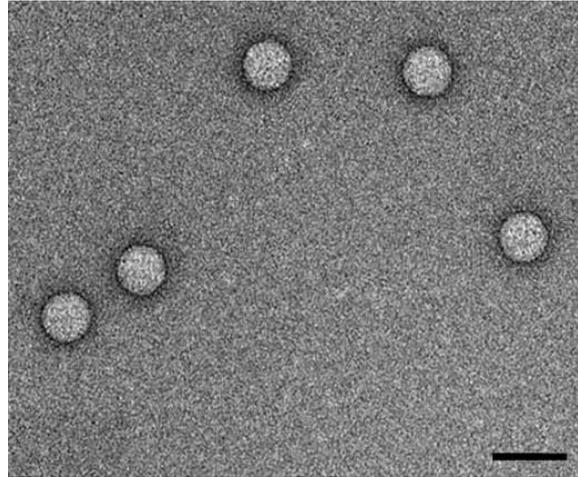
Figure S-5. Virus de l'hépatite E observés au microscope électronique. Echelle = 50 nm (Xing *et al.* 2010)

Le **virus de l'hépatite E** (HEV) présente une capsid e d'un diamètre compris entre 26 et 34 nm et un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7,2 kb. Il est probable que plus de 50% des infections soient asymptomatiques, étant donné le nombre d'individus présentant des anticorps IgM anti-HEV sans atteinte hépatique déclarée (Aggarwal 2013). Les symptômes engendrés par une infection aux HEV sont similaires à ceux de l'ensemble des hépatites d'origine virale. Le HEV est reconnu comme un vecteur potentiellement zoonotique, principalement transmis par la voie oro-fécale. Dans les pays en développement, l'ingestion d'eau contaminée est considérée comme la principale cause des épidémies de HEV, tandis que dans les pays industrialisés, la transmission zoonotique par la consommation de viandes contaminées est proposée comme principal vecteur de contamination (Said *et al.* 2009, Tei *et al.* 2004). La transmission de personne à personne est considérée comme peu fréquente, tant dans les cas épidémiques que sporadiques (Aggarwal et Naik 1994, Somani *et al.* 2003). La période épidémique du HEV se situe généralement au printemps et en été (Dalton *et al.* 2008).

#### S.1.5. *Picornaviridae* (Cosavirus, Enterovirus, virus de l'Hépatite A, virus Aichi, Parechovirus, Salivirus)

Les virus faisant partie de la famille des *Picornaviridae* sont constitués de particules virales renfermant un génome à ARN simple brin de polarité positive. Chez l'humain, seuls certains genres ont été identifiés, à savoir *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Parechovirus*, *Salivirus*. Parmi ceux-ci, seuls les *Cardiovirus* ne sont pas transmis.

Les **cosavirus humains** (HCoSV) sont actuellement répartis en 6 groupes (de A à F), avec une capsidie d'environ 30 nm de diamètre, renfermant un génome de 7,6 kb. Découverts en 2008 en Asie du Sud, ils ont été identifiés dans des selles d'enfants atteints de paralysie flasque ([Kapoor et al. 2008](#)). Bien que suspectés d'être à l'origine de troubles gastro-intestinaux, leur pathogénicité est encore mal renseignée. Ils



ont été observés dans des selles d'individus avec ou sans symptômes de gastroentérite à travers le monde.

Figure S-6. *Enterovirus 71* observés au microscope électronique. Echelle = 50 nm ([Chia et al. 2014](#))

Le genre **Enterovirus** (EV) est composé de 12 espèces, dont 7 d'entre elles peuvent infecter l'humain : 4 *Enterovirus* (EV-A, EV-B, EV-C, EV-D), et 3 *Rhinovirus* (RV-A, RV-B et RV-C). Les EV humains ont un génome d'environ 7,1 à 8,9 kb, protégé par une capsidie de 22 à 30 nm de diamètre ([Lin et Ganesh 2013](#)). Les EV sont associés à la maladie pieds-mains-bouche, pouvant causer des troubles neurologiques, mais peuvent également entraîner de nombreuses autres pathologies telles que des troubles respiratoires, méningites, paralysies, péricardites, myocardites et poliomyélites. Les épidémies à EV ne suivent pas de saisonnalité et peuvent survenir tout au long de l'année ([Jubelt et Lipton 2014](#)).

Le genre *Hepatovirus* se compose d'une unique espèce, le **virus de l'hépatite A** (VHA), avec 7 génotypes identifiés (VHA I à VHA VII), les 3 premiers infectant l'humain. Les VHA ont une capsidie de 28 à 30 nm de diamètre, avec un génome ARN simple brin d'environ 7,5 kb. Ils traversent les cellules de l'épithélium intestinal par transcytose pour atteindre les hépatocytes, leurs principaux sites de réplication. Les VHA sont responsables d'infections hépatiques généralement bénignes accompagnées de symptômes tels que maux de tête, vomissements et douleurs abdominales. Chez les jeunes enfants, la plupart des infections à VHA sont asymptomatiques, tandis que chez les adultes, elles sont principalement symptomatiques. La durée d'incubation peut aller jusqu'à un mois, avec une excrétion dans les selles débutant jusqu'à 14 jours avant l'apparition des symptômes. Les individus infectés par le VHA peuvent excréter jusqu'à  $10^9$  particules virales par gramme de fèces ([Coursaget et al. 1980](#), [Koopmans et al. 2002](#)).

Les **virus Aichi** (AiV), du genre *Kobuvirus*, sont composés d'une capsidie d'environ 30 nm de diamètre renfermant un génome de 7 à 8,2 kb ([Yamashita et al. 1998](#)). Les AiV, capables d'infecter l'humain, sont actuellement répartis en trois génotypes (AiV-A, AiV-B et AiV-C). Découverts pour la première fois à Sapporo au Japon en 1989, leur présence en Europe est principalement liée aux génotypes AiV-A et AiV-B ([Ambert-Balay et al. 2008](#), [Kaikkonen et al.](#)

2010, Rivadulla *et al.* 2019). Les infections à AiV ne semblent pas suivre un modèle saisonnier (Nielsen *et al.* 2013 Thongprachum *et al.* 2018).

Le genre *Salivirus* (SaV) ne comprend actuellement qu'une seule espèce, **Salivirus A**, découverte en 2009 (Greninger *et al.* 2009). Ces virus présentent une capsid e d'environ 30 nm de diamètre et un génome à ARN simple brin de 6 à 8 kb. Les infections à SaV touchent principalement les enfants, entraînant des symptômes de gastroentérite (Mobini-Kesheh *et al.* 2021). Elles ne semblent pas suivre de modèle saisonnier.

### S.1.6.Reoviridae (Rotavirus A)

La famille des *Reoviridae* se divise en 2 sous-familles : les *Spinareoviridae* constituée de 9 genres (*Orthoreovirus*, *Aquareovirus*, *Oryzavirus*, *Fijivirus*, *Mycoreovirus*, *Cypovirus*, *Idnoreovirus*, *Dinovernavirus* et *Coltivirus*) et les *Sedoreoviridae* constituée de 6 genres (*Orbivirus*, *Rotavirus*, *Seadornavirus*, *Phytoreovirus*, *Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*). Un large spectre d'hôte est susceptible d'être infecté par l'un des virus appartenant à cette famille mais seulement 4 genres (*Orthoreovirus*, *Coltivirus*, *Rotavirus* et *Orbivirus*) sont connus pour infecter l'humain. Parmi eux, seuls les rotavirus et les orthoreovirus sont susceptibles d'engendrer des troubles gastro-intestinaux.

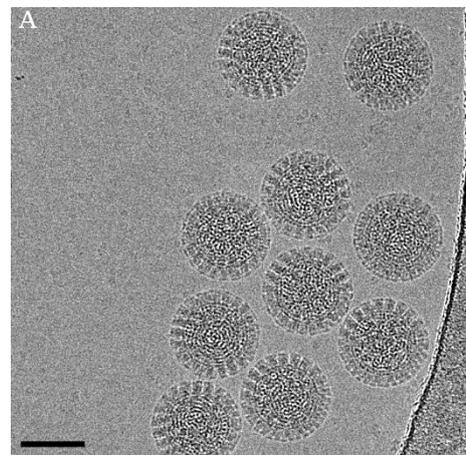


Figure S-7. Rotavirus observés par cryomicroscopie électronique. Echelle = 50 µm (Grant et Grigorieff, 2015)

Les **rotavirus** (RoV) sont constitués d'une capsid e composée de trois couches protéiques concentriques dont le diamètre est compris entre 75 et 80 nm (100 nm avec les fibres). Ils possèdent un génome segmenté à ARN linéaire double brins de 18,5 kb, et peuvent être divisé en 8 groupes ou espèces (classifiés de A à H) (Matthijnsens *et al.* 2012). Seuls les groupes A, B et C ont été identifiés comme étant infectieux chez l'humain. Les rotavirus sont considérés comme hautement contagieux du fait de leur faible dose infectieuse qui a été estimée comme étant comprise entre 10 et 100 particules virales infectieuses (Graham *et al.* 1987, Ward *et al.* 1986), du fait des quantités importantes excrétées dans les selles qui peuvent aller jusqu'à  $10^{11}$  particules virales/g durant la phase aiguë de l'infection (Blacklow et Greenberg 1991). Leur transmission se fait par la voie oro-fécale et leur période d'incubation dure généralement entre 1 et 2 jours. Les RoV sont considérés comme étant les principaux agents étiologiques des gastroentérites infantile d'origine virale, avec plus de 400 000 morts d'enfants de moins de 5 ans ce qui représente 37% du nombre de morts liés à une

gastroentérite dans le monde chaque année. Dans les pays à climat tempéré, les infections à RoV surviennent principalement durant la période hivernale.

Les caractéristiques des **orthoreovirus** rejoignent globalement celles des rotavirus, avec une capsid e d'environ 65 à 80 nm de diamètre (100 nm avec les fibres) et un génome ARN double brin segmenté d'environ 23.5 kb (Dermod y *et al.* 2013). Les infections aux orthoreovirus touchent principalement les enfants en bas âge, et sont rarement symptomatiques (Dermod y *et al.* 2013). Toutefois, lorsque les symptômes se manifestent, ils sont associés à des gastroentérites, coryzas, pharyngites, toux et plus rarement à des méningites (Jackson *et Muldoon* 1973, Giordano *et al.* 2002).

## S.2. Les VEH dans le cycle de l'eau

La principale voie d'entrée des virus entériques humains dans le cycle des eaux urbaines est celle des selles d'individus infectés après leur libération dans les eaux usées. Dans les pays disposant de systèmes d'épuration avancés, ces eaux sont collectées par des réseaux dédiés ou communs avec les eaux de ruissellement et conduites à des stations d'épuration pour y être traitées. La Figure S-8 illustre les différentes voies par lesquelles les virus entériques pathogènes peuvent se propager dans l'environnement hydrique et, *in fine*, contaminer les humains. Cette contamination peut ainsi se produire par l'ingestion d'eau potabilisée à partir du captage d'eaux souterraines ou de surface (Maunula *et al.* 2005, Giammanco *et al.* 2014, Kunz *et al.* 2024), voire d'une manière plus directe, par contact avec des eaux qualifiées de "récréatives", telles que les lacs, rivières ou piscines naturelles (Aslan *et al.* 2011, Polkowska *et al.* 2018, Carol *et al.* 2021). Une autre voie d'exposition à la contamination par les virus entériques humains passe par l'alimentation. Chaque année, de nombreuses épidémies virales liées à la consommation de fruits de mer sont signalées, notamment des infections causées par les norovirus (Le Guyader *et al.* 2008, Alfano-Sobsey *et al.* 2011, Cho *et al.* 2016, Hardstaff *et al.* 2018). La contamination par l'intermédiaire de cultures agricoles (fruits, légumes, céréales), que ce soit pendant l'irrigation des cultures par la génération d'aérosols ou lors de leur consommation a également été largement décrite dans la bibliographie, avec de nouvelles épidémies régulièrement mises en évidence (Cheong *et al.* 2009, Marsh *et al.* 2018, Raymond *et al.* 2022).

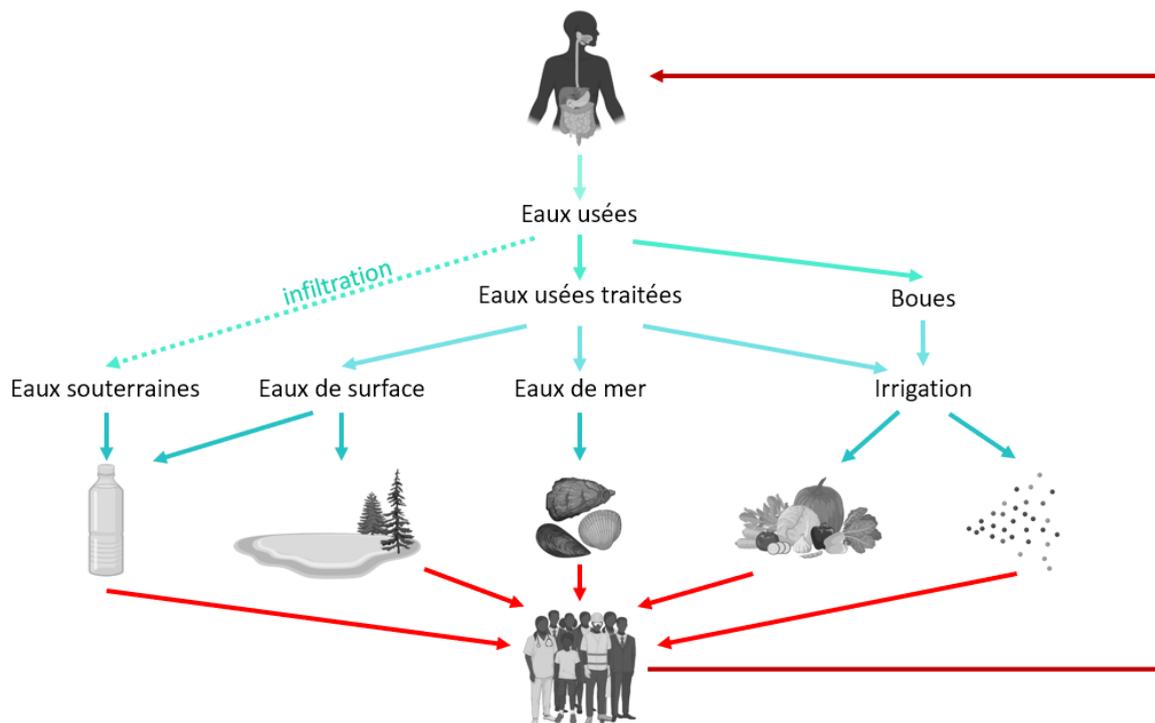


Figure S-8. Circulation des virus entériques humains dans le cycle des eaux urbaines (adapté de Schwartzbrod, 1991)

### S.3. Facteurs potentiels du contrôle des charges virales dans les eaux

La plupart des éléments qui entrent dans la composition des eaux usées, qu'ils soient inertes (et sous forme dissoute ou particulaire) ou vivants sont susceptibles d'interagir avec les particules virales, et donc de jouer un rôle déterminant dans leur persistance ou dans leur élimination des eaux.

Concernant les traitements primaires, diverses études indiquent que des facteurs physiques ou chimiques, tels que le pH, le type de matières organiques, ou encore le taux de salinité, affectent significativement l'adsorption des virus entériques sur les surfaces (Burge et Enkiri 1978, Sobsey *et al.* 1980, Grant *et al.* 1993, Redman *et al.* 1999, Cao *et al.* 2009, Walshe *et al.* 2010, Sadeghi *et al.* 2010). Cette relation complexe implique également le degré d'hydrophobie des supports potentiels et le point isoélectrique du virus concerné. L'association de particules virales avec des matières organiques peut contribuer à la préservation de leur intégrité et au maintien de leur virulence dans l'environnement (Moore *et al.* 1982, Ryan *et al.* 2002). Selon Silverman *et al.* (2013), la protection des particules virales pourrait se faire par encombrement stérique. A l'inverse, l'agrégation des virus à des matières organiques colloïdales, susceptibles de former des floccs, devrait faciliter leur élimination par les processus de sédimentation. C'est en agissant sur ces paramètres

physiques et chimiques qu'ont été faites diverses propositions d'améliorations des traitements primaires (Shewa *et al.* 2020).

Les modifications des charges virales attendues de la confrontation des virus avec le vecteur biologique (traitement secondaire) peuvent être liées à la concentration et à la diversité des communautés microbiennes. Ces mécanismes restent cependant largement sous-documentés. La biomasse microbienne est principalement localisée dans les biofilms (Richards et Melander 2009) des réacteurs biologiques (boues activées, lits bactériens). Elle est également présente dans l'ensemble des canalisations et des bâches de toute nature des STEPs (Gao *et al.* 2023). Les biofilms sont constitués d'une matrice polymérique attachée aux surfaces en contact avec l'eau, au sein de laquelle le développement des microorganismes est favorisé. Cette matrice constitue en effet, un environnement semi-confiné dans lequel se concentrent des particules piégées depuis l'eau sus-jacente et de nombreux composés dissous, issus ou non, du métabolisme des bactéries (exoenzymes) et des protistes (Flemming et Wingender 2010). En pénétrant partiellement dans, et sous la matrice, cette eau contribue au renouvellement des nutriments et notamment de l'oxygène.

Une petite partie de la biomasse microbienne est localisée dans les eaux circulantes, mais là encore, essentiellement associée à des particules (Chahal *et al.* 2016). Quelques études concernent les relations entre des particules virales et les biofilms bactériens. Elles traitent essentiellement des bactériophages (Flood et Ashbolt 2000, Storey et Ashbolt 2001, Sutherland *et al.* 2004, Wingender et Flemming 2011) et, dans une moindre mesure, des virus entériques humains (Quignon *et al.* 1997, Mazaheritehrani *et al.* 2014). L'effet de ces interactions sur des pathogènes humains reste mal documenté. Plusieurs travaux montrent que des norovirus humains peuvent se fixer sur certaines bactéries du tractus intestinal humain (Almand *et al.* 2017). Associés aux fèces, ils seraient donc émis simultanément dans les eaux usées. S'il est démontré qu'elle a un caractère général, cette association serait l'un des vecteurs du transit des norovirus dans les eaux usées à travers les différentes étapes de traitement des STEPs.

Les virus entériques peuvent aussi interagir avec des organismes eucaryotes. Chang *et al.* (1960) ont ainsi mis en évidence la persistance de certains Entérovirus dans des nématodes, et le fait que le caractère infectieux des particules virales relarguées est préservé. Il a également été montré que des amibes libres de l'environnement peuvent héberger d'autres micro-organismes tels que des bactéries (Delafont *et al.* 2013), des champignons (Novohradská *et al.* 2017), et des virus (Hsueh et Gibson 2015). Elles leur offrent ainsi une certaine forme de protection, mais constituent aussi un piège qui amène ces organismes à être éliminés par le biais des boues biologiques. Lorenzo-Morales *et al.* (2007) ont été les premiers à isoler, dans un réseau d'eau potable, des adénovirus humains qui étaient contenus dans des amibes libres du genre *Acanthamoeba*. Diverses études ont également montré la capacité des adénovirus humains, à être internalisés puis libérés tout en conservant leur pouvoir infectieux (Scheid *et al.* 2012, Hsueh et Gibson 2015, Atanasova *et*

al. 2018). Verani *et al.* (2016), ont mis en évidence un effet protecteur de l'internalisation des AdV dans des *Acanthamoeba* vis à vis des procédés de désinfection.

L'analyse de la bibliographie souligne donc le caractère encore très fragmentaire des connaissances sur les mécanismes biologiques qui participent à la rétention des virus dans le contexte des établissements de traitement des eaux usées, et sur leur temporalité, en liaison avec celle de la gestion qui est faite des réacteurs biologiques.

Si l'on fait exception des techniques de désinfection, ce sont surtout les mécanismes associés à la sédimentation qui ont été étudiés, notamment à propos de la contribution des processus d'adsorption (Shin *et al.* 2015, Verbyla *et al.* 2015). Les analyses restent cependant globales, sans prendre en considération, par exemple, le fait que différents groupes viraux peuvent ne pas être concernés à la même hauteur, par le mécanisme étudié.

## S.4. Dispositifs de collecte et de traitement des eaux usées

### S.4.1. Typologie des réseaux de collecte des eaux usées

Dans les agglomérations urbaines où l'assainissement est bien développé, les eaux usées domestiques, industrielles et parfois pluviales, sont collectées par des réseaux qui les acheminent vers les stations d'épuration. Globalement, ils s'inscrivent dans deux types :

- 1) Les réseaux dits **unitaires**, dans lesquels sont collectés les eaux usées domestiques et, dans des proportions variables, les eaux pluviales. Ce type de réseau complique la gestion des eaux usées notamment en raison des surcharges de débit liées aux épisodes pluvieux. Au-delà d'un certain seuil, les eaux doivent être délestées, via un ou plusieurs bypass, vers les milieux aquatiques avoisinants.
- 2) Les réseaux dits **séparatifs**, dans lesquels les deux types d'eaux sont collectés séparément.

Quel que soit le type de réseau auquel elles sont connectées, les STEPs ont pour rôle d'éliminer le plus possible des charges véhiculées, qu'elles soient trophiques (organiques et minérales) ou non trophiques, ou qu'il s'agisse de microorganismes potentiellement pathogènes ou non.

Elles participent à la protection des milieux aquatiques situés en aval et des activités humaines qui leur sont associés : activités récréatives, (baignade, pêche, autres activités nautiques, Aslan *et al.* 2011), irrigation de cultures maraichères (Cheong *et al.* 2009) et captages pour la production d'eau potable (Maunula *et al.* 2005).

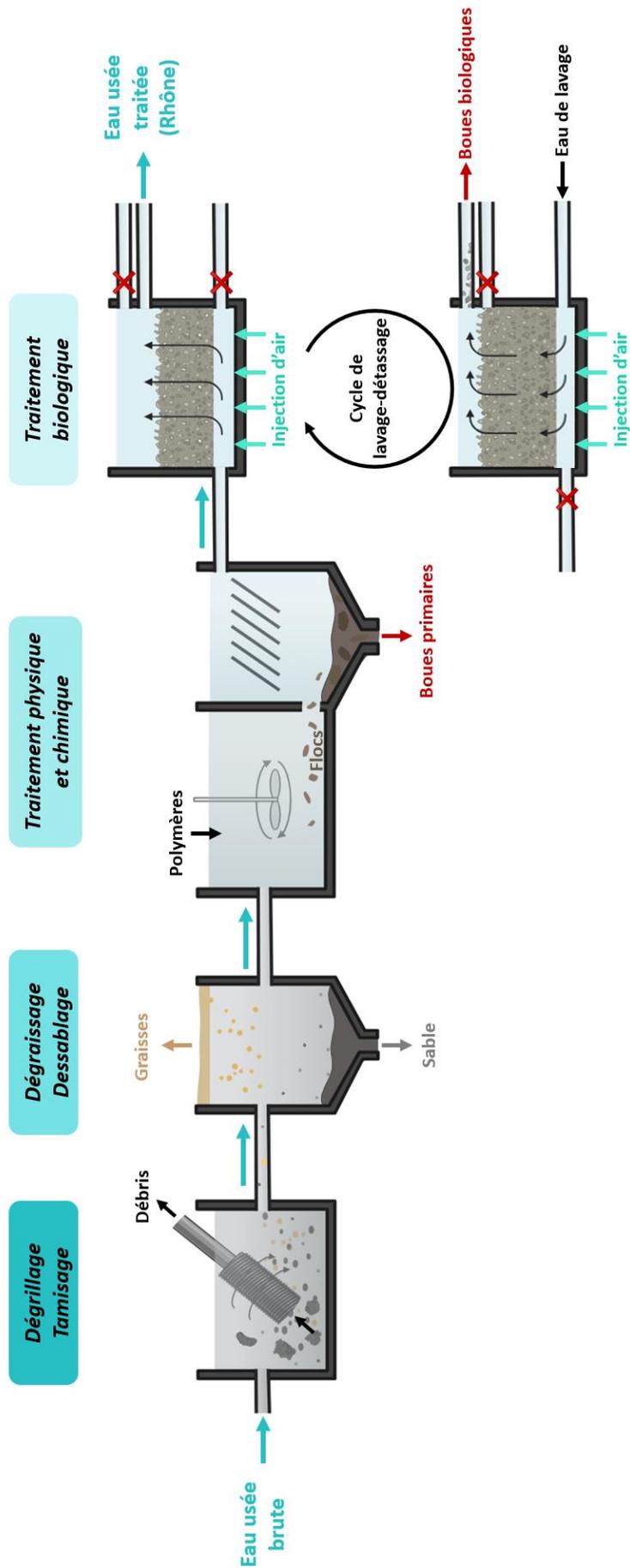


Figure S-9. Représentation schématique des principales étapes du traitement de l'usine de dépollution des eaux usées de l'agglomération chambérienne (UDEP Grand Chambéry). Le traitement primaire fait appel à des polymères. Ils sont utilisés également pour l'épaississement des boues issues des biofiltres.

## S.4.2. Principales étapes du traitement des eaux usées urbaines

Le schéma fonctionnel de l'UDEP Grand Chambéry (capacité 260 000 EH, pour une conurbation d'environ 140 000 habitants) donne l'exemple de l'organisation "classique" d'une station d'épuration subdivisée en trois parties : prétraitements, traitement primaire et traitement secondaire (Figure S-9).

### S.4.2.1. Prétraitements

#### S.4.2.1.1. Dégrillage/tamissage

La première étape, le **dégrillage**, cible les débris volumineux (de taille centimétrique) tels que les feuilles, les branches et les déchets de gros volume liés aux activités humaines. Des grilles de mailles différentes, peuvent se succéder.

Dans l'étape suivante de **tamissage**, l'eau est dirigée vers des tamis ou des grilles de maille plus fines, de taille millimétrique, statiques ou vibrantes.

#### S.4.2.1.2. Dégraissage et dessablage

La phase de dégraissage a pour objectif de débarrasser les eaux usées des graisses, huiles et autres matières dont la densité est inférieure à celle de l'eau. L'eau traitée provenant des étapes précédentes entre dans un bassin, où la vitesse d'écoulement est réduite pour favoriser la flottation des graisses et des huiles (facilitée par l'injection de micro bulles) et simultanément, la décantation des sables. La séparation de la galette graisseuse est effectuée par des dispositifs mécaniques, tels que des racleurs ou des skimmers. Les sables tombent dans une goulotte dans laquelle ils sont pompés et envoyés vers un dispositif de lavage.

### S.4.2.2. Traitements primaires (physiques et chimiques)

L'objectif de cette étape est de réduire la charge des eaux en matières en suspension par décantation. Dans certains établissements (dont UDEP Grand Chambéry), le traitement est optimisé par l'ajout à l'eau, de coagulants et/ou de flocculants. Des effets spécifiques sur l'abattement des charges virales peuvent en être attendus (Shewa *et al.* 2020) et c'est la raison pour laquelle une partie de notre travail leur a été consacrée.

La **coagulation** correspond à une déstabilisation des particules colloïdales en suspension par la neutralisation de leurs charges de surfaces, ce qui induit leur agrégation (Figure S-10). Les particules colloïdales peuvent être de nature minérale (limons, argiles colloïdales, silices hydroxydes et sels métalliques) ou organique (acides humiques et fulviques, colorants, tensioactifs). Les bactéries et les virus sont souvent assimilés à des particules colloïdales (Armanious *et al.* 2023). Leur stabilité dépend des forces d'attraction et de répulsion qui peuvent les affecter, forces de Van der Waals, forces électrostatiques, forces gravitationnelles, mouvements browniens. Deux types de coagulants sont mis en œuvre, selon les installations :

Les **coagulants minéraux**, peu coûteux et polyvalents, sont les plus utilisés. Ils contiennent généralement des sels de fer ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{SO})_4^{2-}$ , etc.) ou d'aluminium (chlorure de polyaluminium, sulfate d'alumine, etc.). Leur charge cationique est apportée par les ions  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Al}^{3+}$ , qui, en présence d'eau, forment des hydroxydes de fer  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  ou d'aluminium  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . Le chlorure ferrique (Figure S-12) est parfois considéré comme un coagulant (El Samrani *et al.* 2004) et parfois comme un floculant (Lagenfeld *et al.* 2020).

Les **coagulant organiques**, sont constitués d'une charge cationique, portée par une fonction ammonium quaternaire, fixée sur une chaîne polymérique. Il en existe 4 familles principales : les polyamines, les polyDADMAC, les résines dicyandiamines et les résines mélamine-formaldéhyde. Des exemples de polyamine et de polyDADMAC (chlorure de polydiallyldiméthylammonium) sont présentés dans la Figure S-12. Les coagulants organiques présentent l'avantage d'être efficaces à faible dose, de générer de faibles volumes de boues et d'avoir peu d'impact sur le pH du milieu (Sellami *et al.* 2014, Heiderscheidt *et al.* 2016, Xue *et al.* 2019).

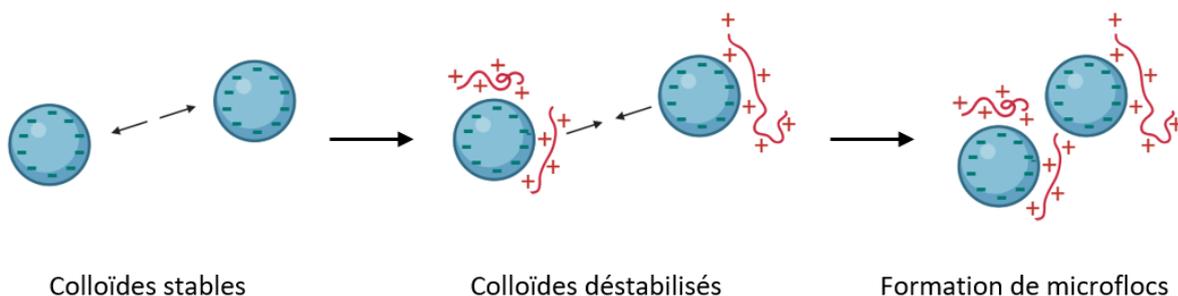


Figure S-10. Principe de la coagulation

La **floculation** correspond à une fixation de particules neutralisées sur les chaînes d'un floculant. Les agglomérats constituent des floccs qui, du fait de leur densité, sont amenés à sédimenter (Figure S-11). Les interactions entre les floculants et les particules déstabilisées sont majoritairement des liaisons ioniques et hydrogènes (Gregory 2013). Les boues, dites

primaires, issues de la sédimentation sont dirigées vers des installations où elles sont déshydratées, puis calcinées ou vers des unités de production de biogaz.

Les floculants sont formés de longues chaînes de monomères, linéaires ou ramifiées qui leur confèrent un haut poids moléculaire. Ils peuvent être de nature anionique ou cationique. Les **floculants anioniques** sont préférentiellement utilisés pour la floculation de particules minérales ou ayant subi une étape préalable de coagulation. Les **floculants cationiques** sont plutôt utilisés pour la floculation de particules organiques en l'absence de coagulant.

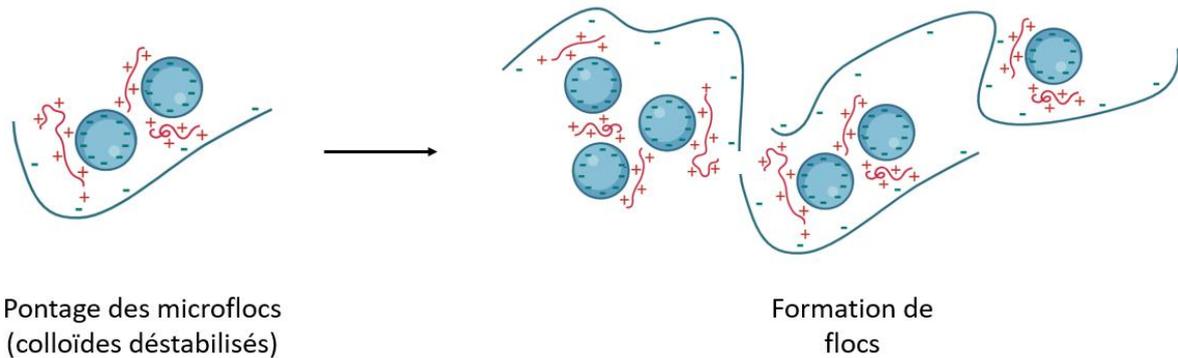


Figure S-11. Principe de la floculation.

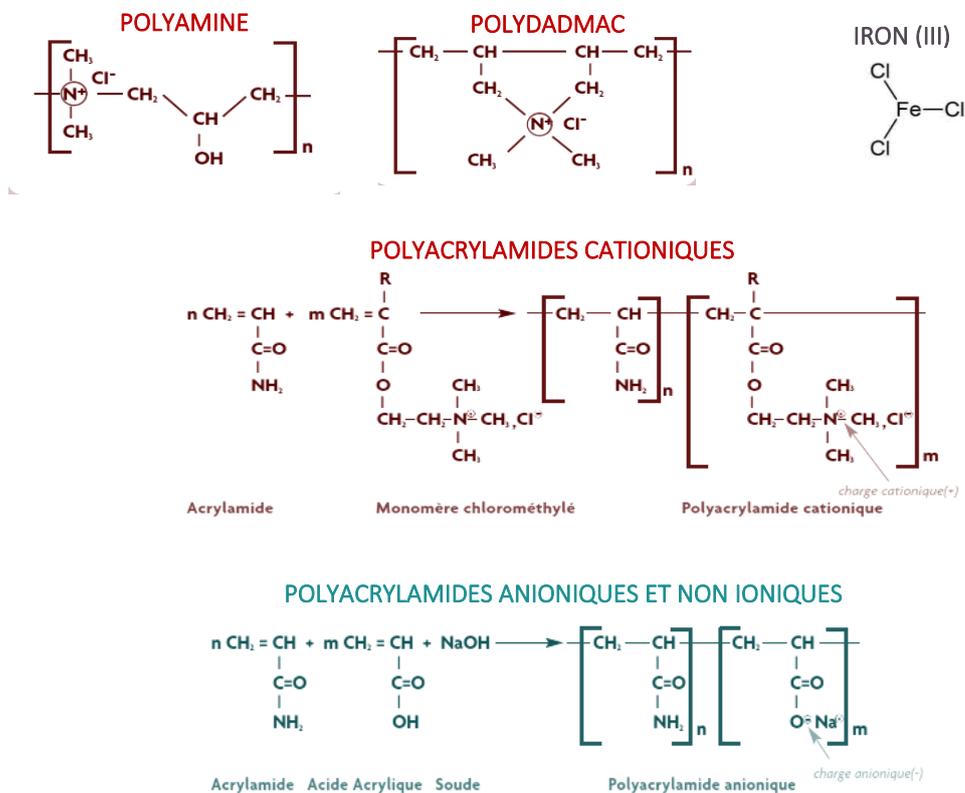


Figure S-12. Exemples de coagulants et de floculants utilisés pour le traitement des eaux usées essentiellement au niveau du traitements primaire.

Le choix des coagulants et flocculants dépend des caractéristiques de l'eau à traiter (pH, concentration en matières sèches, ratio minéral/organique, etc.), des infrastructures de la STEP (point d'injection, conditions de mélange, type de décanteur, etc.) et des taux d'abattement de charge recherchés (turbidité, MES, DCO, etc.) (Teh *et al.* 2016, Chemtech International, 2021).

#### *S.4.2.3. Traitements biologiques*

Les réacteurs biologiques sont des enceintes dans lesquelles sont favorisés les mécanismes microbiens de décomposition des matières organiques dissoutes et particulaires. Cette étape contribue également à filtrer les particules qui n'ont pas été retenues par le traitement primaire. Dans ces réacteurs, la prise en charge de la matière organique entrante par les microorganismes (bactéries, essentiellement) conduit à sa minéralisation. Il en résulte notamment une production de CO<sub>2</sub> qui, pour le système, correspond à une perte effective de carbone. Il en résulte également un accroissement de la biomasse sous la forme de floccs et de biofilms, dont les excès sont séparés de l'eau, généralement par décantation, pour conduire à la production de boues biologiques. Le principe est mis en œuvre dans le cadre de trois types de dispositifs qui diffèrent essentiellement par l'absence ou la présence de supports qui sont offerts au développement des biofilms : les boues activées, les biofiltres ou lits bactériens et les systèmes à membranes dans lesquels le bioréacteur est complété par un dispositif de filtration immergé (MBR).

Les bassins de lagunage relèvent également des systèmes biologiques des traitement des eaux usées. Ils diffèrent des autres procédés par le fait que l'eau s'y écoule par gravité entre des bassins de faible profondeur, dans lesquels se succèdent des communautés à dominante hétérotrophe (traitement des charges organiques) puis des communautés à dominante autotrophe (jacinthes d'eau, par exemple), pour le traitement des fertilisants minéraux.

Dans les **biofiltres** (modèle auquel notre travail s'est consacré) une grande surface de développement est offerte aux microorganismes sous la forme de granules minéraux (pouzzolane de diamètre inférieur à 5 mm, par exemple) qui remplissent des bâches de plusieurs mètres cubes. L'eau à traiter est injectée dans la partie haute de ces unités, simultanément à l'injection d'air à partir de diffuseurs situés sous le remplissage. Le colmatage progressif du système avec le développement des biofilms, en dégrade les performances. C'est pourquoi, ces systèmes travaillent de façon cyclique, au rythme d'opérations de lavage-détassage (renouvelées à la fréquence d'une dizaine d'heures) durant lesquelles l'excès de biofilms est éliminé par l'injection d'eau et d'air à haut débit, dans le sens inverse de celui du fonctionnement "normal". Les eaux de détassage passent ensuite dans un décanteur à partir duquel sont récupérées des boues dites secondaires (ou boues biologiques).

#### S.4.2.4. Traitements tertiaires et rejet de l'eau traitée dans l'environnement

Dans certaines installations, des traitements complémentaires (traitements tertiaires) de dénitrification, de déphosphatation et de désinfection (chloration, ozonation, ultra-violet) sont appliqués aux eaux, en aval du traitement secondaire. Plusieurs études montrent l'intérêt d'associer un dispositif de désinfection, aux réacteurs biologiques à membrane (Chaudhry *et al.* 2015, Chen *et al.* 2021). L'utilisation massive de composés désinfectants, en correspondance avec les débits importants des eaux usées, peut, à son tour, poser de graves problèmes environnementaux (Xue *et al.* 2023), notamment avec les sous-produits du chlore et de ses dérivés. Des solutions alternatives ont été proposées et mises en œuvre, telles que celle basée sur des peracides tels que l'acide peracétique (Kitis 2004, Garg *et al.* 2016, Ao *et al.* 2021). Son efficacité sur les microorganismes, dont les virus, a fait l'objet de plusieurs études (Veschetti *et al.* 2003, Sousa *et al.* 2023) ainsi que certains détails de son mode d'action (Schmitz *et al.* 2021, Wang *et al.* 2023)

Le rejet des eaux traitées dans l'environnement est fait de préférence dans les cours d'eau, dont la turbulence facilite la dilution des composés non retenus par les STEPs, tout en assurant des conditions d'aération favorables aux organismes qui les prennent en charge.

### S.5. Efficacité des STEPs dans l'abattement des charges virales

De nombreuses études ont été consacrées à la détection et à la quantification des virus dans les eaux usées. Le rythme des publications s'est récemment accéléré, en liaison avec l'intérêt qui a été mis en évidence, d'interpréter leur analyse en tant qu'indicateur de premier niveau du degré de contamination des populations par le SARS-CoV-2 (Medema 2020, La Rosa *et al.* 2020, Wurtzer *et al.* 2020, Serra-Comte *et al.* 2021).

Dans les eaux usées brutes, les charges virales rapportées par les auteurs dans la bibliographie varient globalement entre  $1^{E05}$ - $9^{E09}$  et entre  $5^{E04}$ - $3^{E10}$  copies de génome/L pour les NoV et les HAdV respectivement. Dans les eaux usées traitées, les estimations varient de  $2^{E03}$  à  $2^{E09}$  copies/L pour les NoV et de  $1^{E04}$  à  $8^{E09}$  pour les HAdV (Figure S.13, da Silva *et al.* 2007, da Silva *et al.* 2008, Katayama *et al.* 2008, La Rosa *et al.* 2010, Schlindwein *et al.* 2010, Wong *et al.* 2010, Calgua *et al.* 2011, Simmons et Xagorarakis 2011, Masclaux *et al.* 2013, Cunliffe *et al.* 2014, Kitajima *et al.* 2014, Prado *et al.* 2014, Montazeri *et al.* 2015, Qiu *et al.* 2015, Payne 2017, Haramoto *et al.* 2018, Qiu *et al.* 2018, Sidhu *et al.* 2018, Prado *et al.* 2019, La Rosa *et al.* 2020).

Dans la majorité des études portant sur la performance des STEPs du point de vue de l'abattement des charges virales, les mesures ne sont réalisées qu'en entrée et sortie des stations. Certains auteurs font état de performances acceptables, voire importantes, notamment dans les installations équipées de bioréacteurs à membrane (MBR, Kuo *et al.*

2010, Hewitt *et al.* 2011, Saba *et al.* 2021). De plus faibles efficacités de rétention des charges virales par les STEPs sont observées par ailleurs, à l'exemple des travaux de Victoria *et al.* (2010), qui rapportent des réductions de 0.6 et 0.3 log<sub>10</sub> pour les NoV GI et NoV GII respectivement, entre l'entrée et la sortie d'une STEP brésilienne équipée d'un traitement tertiaire de dénitrification. Les valeurs de réduction mesurées par Tandukar *et al.* (2021) dans deux STEPs népalaises, l'une basée sur un traitement aux boues activées, l'autre sur un lagunage anaérobie, étaient de 0.4-0.7 log<sub>10</sub> pour les NoV GI et 0-0.4 log<sub>10</sub> pour les HAdV. Aux Etats-Unis, Schmitz *et al.* (2016) ont observé une réduction des charges en HAdV de 0.6 log<sub>10</sub> pour une STEP basée sur des boues activées et 1 log<sub>10</sub> pour celle utilisant des lits bactériens.

Certains auteurs vont plus loin dans l'analyse en évaluant la réduction des concentrations en virus entériques à une ou plusieurs des étapes intermédiaires du cheminement des eaux. Une étude portant sur la réduction des charges en NoV GI, NoV GII et Sapov par des bioréacteurs à membrane a montré une efficacité de réduction entre 1.3 et 5.8 log<sub>10</sub> (Sima *et al.* 2011). Dans une étude similaire, Chaudhry *et al.* (2015) ont mesuré des réductions allant de 4.6 à 5.7 log<sub>10</sub> pour les NoV GII et 3.9 à 5.5 log<sub>10</sub> pour les AdV après passage des eaux dans les MBR. En Suède, Nordgren *et al.* (2009) ont observé des réductions plus modestes en NoV de 0.1-1.0, 0.6-1.2 et 0.0-0.5 log<sub>10</sub> par les étages de décantation primaire, secondaire, et les lits bactériens, respectivement. Fong *et al.* (2010) ont quant à eux mesuré des réductions en HAdV de 0.01, 1.77 et 1.14 log<sub>10</sub> respectivement après traitements primaire (sédimentation), secondaire (aération, boues activées et sédimentation) et tertiaire (chloration/dé-chloration et filtrations). Qiu *et al.* (2015) ont évalué l'efficacité de réduction à différentes étapes du traitement d'une STEP canadienne incluant une sédimentation primaire, un traitement secondaire aux boues activées puis une désinfection aux UV ou une ultrafiltration puis chloration, sur un panel de 7 VEH. Pour cet établissement, les valeurs de réduction étaient comprises entre 0 et 4.9 log<sub>10</sub> selon l'étape du traitement et le virus étudié (les valeurs les plus hautes étant obtenue pour l'étape d'ultrafiltration), avec en moyenne 1.1 à 7.0 log<sub>10</sub> de réduction sur l'ensemble du process.

Il apparait donc difficile de faire une généralité des résultats publiés, en raison de la diversité des situations et des procédés mis en œuvre, comme le constate d'ailleurs plusieurs auteurs (Qiu *et al.* 2015, Schmitz *et al.* 2016).

Certaines études apportent la preuve de rejet de virus entériques infectieux dans des eaux usées traitées. Simmons et Xagorarakis (2011) ont mesuré une concentration moyenne de 1.6<sup>E</sup>01 NPP/100L dans des eaux brutes traitées par des STEPs impliquant notamment des traitements biologiques par MBR ou par boues activées et des traitements de désinfection par UV ou par chloration. Hewitt *et al.* (2011) ont montré que les quantités d'HAdV et d'EV infectieux rejetés par un panel de STEPs utilisant divers procédés de traitement (MBR, lits bactériens, boues activées, lagunage) et traitant différentes tailles de population pouvaient atteindre respectivement 3.3 log<sub>10</sub> unité infectieuses/L et 2.2 log<sub>10</sub> PFU/L.

Cette incapacité des STEPs à assurer la rétention, ou tout du moins l'inactivation, complète des virus dans les eaux usées traitées constitue un réel problème de santé publique et souligne l'intérêt d'une étude plus poussée des mécanismes intervenant aux différentes étapes de traitement sur la rétention des charges en VEH.

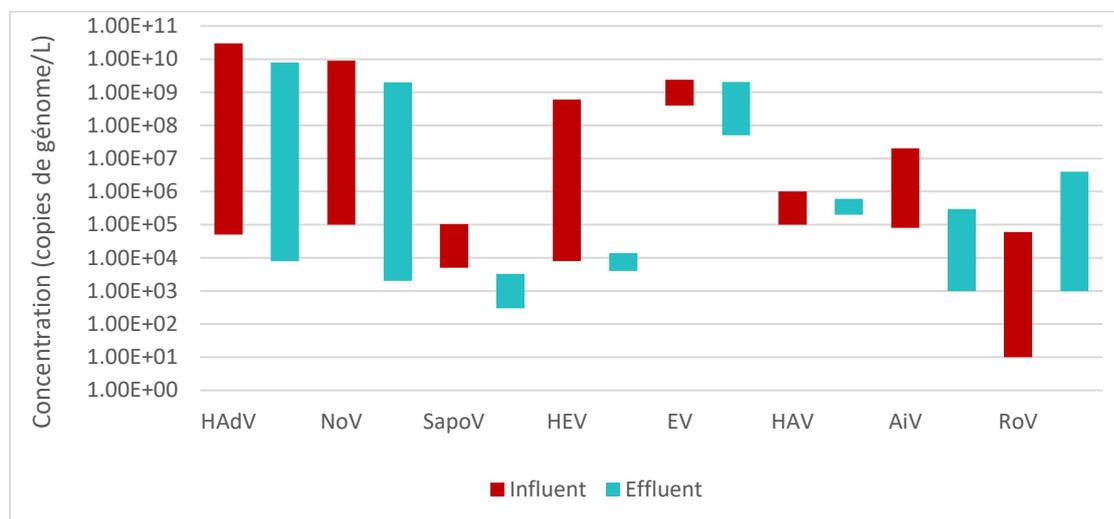


Figure S-13. Exemples de valeurs d'occurrence de VEH dans les eaux usées brutes (influent) et les eaux usées traitées (effluent) de STEPs (adapté des données publiées par Corpus et al. 2020).

## S.6. Techniques d'analyse des VEH dans les eaux usées (et les boues) de STEP

Le choix d'une méthode d'analyse des virus repose sur plusieurs paramètres : la taille et la polarité des particules virales que l'on envisage d'étudier, l'ordre de grandeur attendu des concentrations, le type de matrice à traiter... Il doit également être tenu compte de contraintes pratiques telles que la durée de manipulation, le coût des réactifs et la facilité de mise en œuvre.

Avec les effluents de STEP le facteur concentration n'est généralement pas un problème pour les analyses, car les charges virales y sont plus élevées que dans tout autre échantillon d'eau environnementale (Haramoto et al. 2018). Les problèmes viennent des fortes valeurs de leur turbidité et de leur concentration en matières organiques, en acides humiques/fulviques et en métaux lourds, qui interfèrent avec les techniques d'analyse moléculaire des virus (Sidhu et al. 2013, Qiu et al. 2016, Prado et al. 2019, Falman et al. 2019). Les difficultés sont encore accentuées dans le cas des boues issues des traitements de ces eaux usées. La méthode utilisée pour minimiser ces interférences, consiste à séparer les

virus (entiers ou réduits à leurs acides nucléiques) du milieu original avant d'en faire l'analyse.

Les protocoles d'analyse des virus dans les eaux suivent généralement 4 grandes étapes (Figure S-14).

- 1) L'échantillonnage et le prétraitement de l'échantillon
- 2) L'extraction des virus de la matrice
- 3) La concentration et la purification des particules virales ou des acides nucléiques
- 4) La détection/quantification des particules virales ou des acides nucléiques

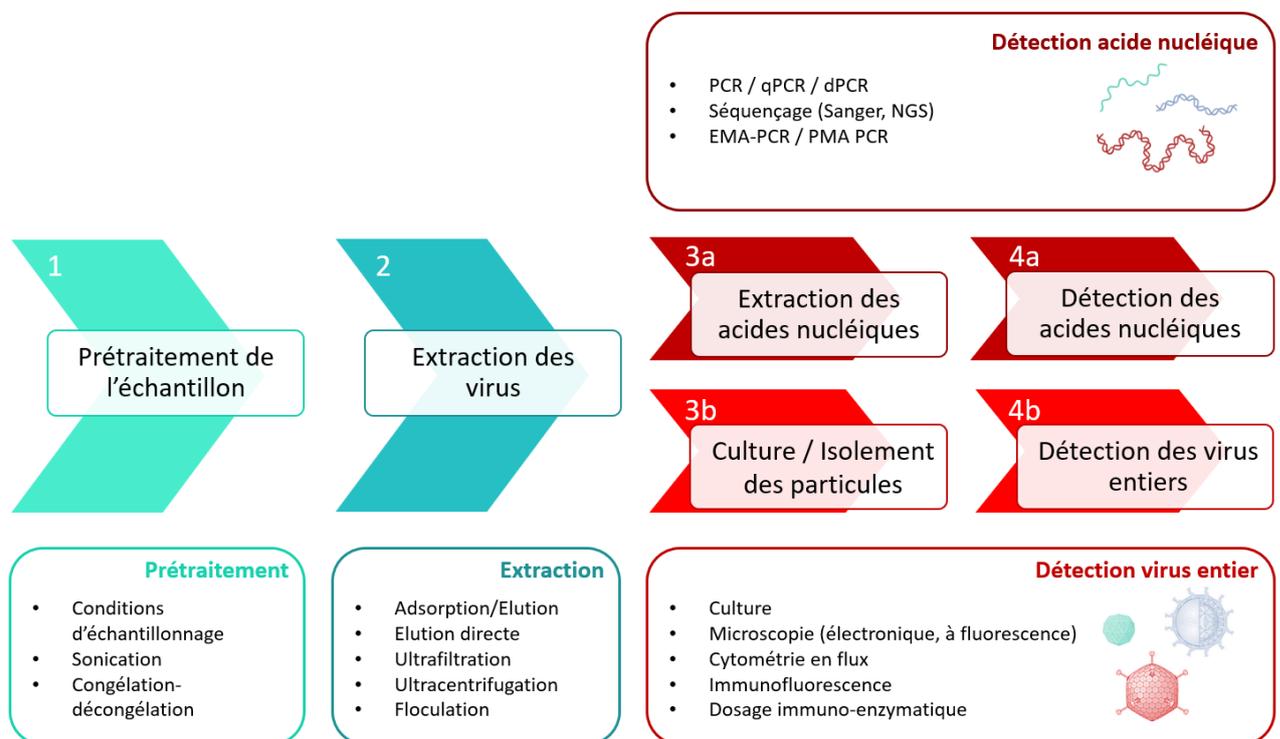


Figure S-14. Principales étapes de l'analyse des virus dans les échantillons environnementaux. Une liste non-exhaustive des techniques décrites dans la bibliographie est donnée pour chacune des étapes.

## S.6.1. Echantillonnage et prétraitements des échantillons

### S.6.1.1. Stratégies et techniques d'échantillonnage

Dans tous les domaines, de la physique, de la chimie et de la biologie, l'échantillonnage est l'un des principaux points déterminant les incertitudes qui affectent les mesures faites dans l'environnement, Il comporte deux volets, celui de la stratégie d'échantillonnage et celui de la technique d'échantillonnage.

La stratégie d'échantillonnage est définie sur la base de la géométrie et du "fonctionnement" du milieu dans lequel les échantillons doivent être prélevés. Le facteur temps, en particulier, est l'un des principaux points de la définition d'une stratégie. Dans le cas des eaux usées, le moment auquel l'opération doit être conduite (heure, jour de la semaine, date dans la saison) est déterminant, en raison du lien avec les activités humaines mais aussi avec les conditions météorologiques, dans le cas d'un réseau unitaire ([Wang et al. 2014](#), [Cassidy et al. 2020](#), [O'Reilly et al. 2022](#)). La diversité des modes opératoires d'échantillonnage ou les indications partielles qui en sont souvent données, sont est l'un des points de la difficulté des comparaisons qui pourraient être faites des valeurs d'élimination des virus données dans la bibliographie, à propos de STEPs ou de procédés de traitement considérés isolément.

Quelques études ont été consacrées spécifiquement à la définition d'une stratégie d'échantillonnage. [Sidhu et al. \(2017\)](#), par exemple, montrent, dans le cas d'un traitement par boues activées et pour trois groupes de virus, que les prélèvements peuvent être faits sans tenir compte du temps de séjour de l'eau dans le réacteur. Ils estiment qu'une valeur représentative de l'efficacité d'élimination des virus nécessite la prise d'un minimum de 10 échantillons répartis sur l'ensemble des saisons.

Il reste difficile de faire une généralité des résultats publiés à ce sujet. La définition d'un protocole standard "universel" ne semble pas envisageable compte tenu de la diversité des situations ([Servetas et al. 2022](#)). L'incitation à une forme de standardisation pourrait venir de la production de guides définissant des stratégies d'échantillonnage en correspondance à des "contextes types" en termes de traitement et de type de réseau, notamment ([Cassidy et al. 2020](#)).

Le second volet de l'échantillonnage est celui des dispositifs utilisés pour la prise d'échantillons. Outre le prélèvement manuel et l'utilisation d'échantillonneurs automatiques, un certain intérêt est maintenant porté à l'application de techniques d'échantillonnage passif à la capture des virus pour le suivi des charges virales dans les eaux usées ([Li et al. 2022](#)). De leur revue de 11 publications dans lesquelles ce type de technique est appliquée à la recherche du SARS-CoV2, [Bivins et al. \(2022\)](#) concluent à la supériorité de

la technique, par comparaison à l'échantillonnage manuel, pour la détection du virus. Sur le plan quantitatif, par contre les auteurs font le constat de résultats beaucoup plus contrastés

[Kevill et al. \(2022\)](#) ont comparé l'efficacité du papier Whatman et d'un tampon hygiénique pour la récupération de différents virus dans les eaux usées, dont le SARS-CoV-2, le NoV GII et l'AdV. Leurs résultats font apparaître une bonne performance du second matériau et une récupération plus importante des virus non enveloppés (0.63%) par rapport aux virus enveloppés (0.32%). Dans une autre étude, [Vincent-Hubert et al. \(2017\)](#) ont testé différents types de membranes commerciales (nylon, gaze, polyfluorure de vinylidène, polyéthylène faible densité et Zetapor) pour la détection de NoV dans des échantillons d'eau usée notamment. Leurs essais montrent une efficacité supérieure des membranes Zetapore, avec un taux de récupération de 0.9% après 24h d'incubation dans l'échantillon. [Jones et al. \(2022\)](#) comparent l'efficacité de divers matériaux (fibre de verre, coton, cellulose et nylon notamment) pour la capture de SARS-CoV-2 et du bactériophage Phi6, notamment dans des échantillons d'eau usée. Leurs résultats font apparaître une supériorité des échantillonneurs à base de coton, en termes d'efficacité de récupération des virus, mais également de coût et de facilité de mise en place. Dans leur étude, [Li et al. \(2022\)](#) proposent d'adapter le type d'échantillonneur à l'objectif recherché et à la durée de son déploiement. Leurs résultats montrent que les échantillonneurs à base de coton paraissent mieux adaptés à la détection de virus sur de courtes périodes, comme celle des pics journaliers d'utilisation des eaux liée à l'activité humaines. Les échantillonneurs à base de membrane (nylon, cellulose) seraient quant à eux plus efficaces pour les suivis intégrés dans le temps (sur 24h par exemple), car ils seraient moins susceptibles de produire de faux négatifs. D'autres matériaux ont fait l'objet d'essai. [Hayes et al. 2022](#) ont ainsi utilisé avec succès des grains de charbon actif pour la récupération de SARS-CoV-2 dans les eaux usées.

La récente institution d'une "épidémiologie basée sur les eaux usées" justifie la poursuite de la mise au point d'échantillonneurs passifs et des stratégies de sa mise en œuvre pour en étendre le développement ([Bivins et al. 2022](#)). C'est dans ce sens qu'a été orientée la 1<sup>ère</sup> partie de notre travail dès septembre 2019 et au 1<sup>er</sup> semestre 2020, avec la mise en œuvre de deux matériaux originaux, un type particulier de carbone activé et des billes de chitosan et l'objectif de mettre au point une technique de récupération d'une partie au moins des virus capturés, aux fins d'analyses ultérieures.

### *S.6.1.2. Pré-traitements des échantillons*

#### *S.6.1.2.1. Pasteurisation*

La stérilisation devrait faire partie des prétraitements à appliquer aux échantillons d'eaux usées et de boues de STEP, en raison des risques de contamination qu'ils présentent pour les opérateurs. Le sujet n'est pas très documenté dans la bibliographie, mais quelques auteurs font état de la compatibilité d'une pasteurisation à 57 – 60°C, avec les analyses réalisées ultérieurement (La Rosa *et al.* 2020, Wu *et al.* 2020)

#### *S.6.1.2.2. Sonication*

La sonication a pour objectif de libérer les virus des supports auxquels ils sont associés, mais aussi de fractionner les agrégats et plus généralement, d'homogénéiser les échantillons. Plusieurs auteurs rapportent l'amélioration effective du rendement de leur protocole de détection des virus, apportée par une sonication, dans le cas d'échantillons d'eaux usées et de boues (Wu et Liu 2009, Ma *et al.* 2013, Strubbia *et al.* 2019, Juel *et al.* 2021).

Les conditions d'application de la sonication (bain ou sonde) et son paramétrage (amplitude et durée du traitement), doivent cependant être soigneusement choisis pour éviter de compromettre l'intégrité des virus. Wu et Liu (2009) ont ainsi montré, que, dans leurs conditions opératoires, l'allongement du temps de sonication au-delà d'une minute avait pour conséquence d'inverser le bénéfice du traitement.

#### *S.6.1.2.3. Ajout de surfactant*

L'ajout de surfactant dans les matrices complexes, telles que les eaux usées et les boues est utilisé pour perturber, voire rompre les interactions entre les virus et les particules auxquelles ils sont fixés. Plusieurs études ont montré l'efficacité du pyrophosphate de sodium, un dispersant ionique, et du Tween 80, un surfactant non ionique, pour l'amélioration de la récupération des virus à partir de boues de STEP (Wu et Liu 2009, Brown *et al.* 2015).

## S.6.2.Extraction et concentration des virus

### S.6.2.1. Techniques basées sur des processus chimiques

L'**élution directe (sans pré-concentration)** des virus à partir des échantillons d'eaux usées et de boues peut être réalisée par l'ajout d'un tampon chimique (glycine, extrait de bœuf) ou enzymatique. [Rock et al. \(2010\)](#) ont comparé l'élution à l'extrait de bœuf et l'élution à la glycine du point de vue de la réduction des inhibiteurs d'analyse moléculaire présents dans des échantillons de boues. Dans cette étude, ils mettent en évidence une diminution de l'efficacité de quantification des acides nucléiques liée à l'augmentation de la charge des échantillons en matières organiques consécutive à l'addition d'extrait de bœuf.

L'**élution enzymatique** des virus, a potentiellement deux effets bénéfiques : celui de libérer les virus par la digestion des composés organiques auxquels ils sont accrochés, et celui de réduire la concentration des inhibiteurs d'analyse moléculaire. [Sano et al. \(2003\)](#) ont montré que des solutions de lysozyme, de chymotrypsine et de papaine, permettaient d'améliorer significativement la quantification des virus dans des échantillons de boues.

Ces techniques présentent chacune, son inconvénient : l'élution à l'extrait de bœuf par l'apport potentiel d'inhibiteurs de quantification des acides nucléiques, l'élution enzymatique par le coût des enzymes et la nécessité de respecter les conditions optimales de pH et de température requises par leur activité.

### S.6.2.2. Techniques basées sur des processus physiques

L'**ultrafiltration** utilise des membranes de porosité inférieure au diamètre des virus ([Morales-Morales et al. 2003](#), [Olszewski et al. 2005](#)). L'**ultrafiltration frontale**, (passage de l'échantillon perpendiculairement à la surface de la membrane), est sensible au colmatage. Elle nécessite de réduire considérablement le volume filtré ou de le soumettre au préalable à plusieurs pré filtrations. Dans le cas de la plupart des échantillons d'eau environnementale, l'**ultrafiltration tangentielle** lui est préférée ([Farkas et al. 2018](#)). Une méthode d'ultrafiltration centrifuge a également été développée pour concentrer les virus humains des eaux usées ([Qiu et al. 2016](#), [Fores et al. 2021](#)).

Dans leur revue, [Olszewski et al. 2005](#) passent en revue les performances d'un grand nombre de techniques de filtration pour l'élimination d'éléments indésirables de l'eau, mais aussi pour la concentration et la récupération de virus.

L'**ultracentrifugation** est utilisée pour la simple concentration de particules virales dans un culot (Schwartzbrod 2000), mais principalement, en combinaison avec des gradients de chlorure de césium (Redman *et al.* 1997) ou de sucrose (Croxon et Bellamy 1981, Hurwitz *et al.* 2013) pour séparer les virus des autres particules présentes dans un échantillon.

Le coût élevé de l'équipement et le petit volume d'échantillon qui peut être analysé, constituent les deux principaux inconvénients de la technique (Fumian *et al.* 2010, Prata *et al.* 2012). Il semble également qu'elle puisse conduire à une concentration d'inhibiteurs qui affectent les analyses d'acides nucléiques faites en aval (Prado *et al.* 2014).

### *5.6.2.3. Techniques combinant processus physiques et chimiques*

La méthode d'**adsorption-élution** repose sur la réversibilité de l'accrochage des particules virales sur un support chargé positivement ou négativement (Prado *et al.* 2011, Grøndahl-Rosado *et al.* 2014). Plusieurs facteurs entrent en jeu dans les phénomènes d'absorption-élution : la charge globale de surface des particules virales, le pH, la force ionique, la composition du milieu, ainsi que les caractéristiques du support. Les points isoélectriques des virus entériques humains sont globalement inférieurs au pH des eaux usées (Michen et Graule 2010). Par conséquent la charge globale de leur surface, dans ces eaux, est négative (Hamza *et al.* 2009, Mayer *et al.* 2015). Certains composants de la matière organique de bouillons, tels que l'extrait de bœuf, sont susceptibles d'entrer en compétition avec les virus pour les processus d'adsorption. De ce fait, ils sont utilisés pour en favoriser l'élution (Pepper et Gerba 2015). Ces solutions peuvent cependant contenir des inhibiteurs qui interfèrent avec les réactions des techniques d'analyse moléculaires. La méthode est plutôt adaptée à des échantillons faiblement chargés en matières organiques.

La **floculation organique** combine un processus physico-chimique, l'adsorption des particules virales sur des protéines, qui induit la formation de floccs et une sédimentation, à la suite de laquelle les virus sont récupérés dans le culot. Dans de nombreuses études une floculation est réalisée à l'aide d'**extrait de bœuf** pour concentrer les virus à partir de différents types d'eau (Katzenelson *et al.* 1976, Hurst *et al.* 1984, Shields et Farrah 1986). Les alternatives les plus souvent utilisées sont la poudre de **lait écrémé** (Calgua *et al.* 2008, Bofill-Mas *et al.* 2011, Victoria *et al.* 2014, Assis *et al.* 2017) et le **polyéthylène glycol (PEG)**, notamment pour la concentration de VHE et de NoV à partir d'eaux usées avant ou après traitement (Masclaux *et al.* 2013, Strubbia *et al.* 2019). El-Senousy *et al.* (2013) ont montré qu'une technique d'extraction de virus était plus efficace avec l'emploi du PEG qu'avec celui de l'extrait de bœuf.

L'une des principales limites de ces méthodes de concentration est liée au fait qu'elles sont basées sur la précipitation de protéines. Leur effet n'est pas sélectif et peut donc toucher les

enzymes qui participent aux réactions d'analyse des acides nucléiques (Shieh *et al.* 1995, Schrader *et al.* 2012, Masclaux *et al.* 2013). Gonzales-Gustavson *et al.* (2017) indiquent par ailleurs, que la floculation basée sur l'utilisation de lait écrémé peut être à l'origine d'une grande variabilité des résultats, liée, entre autres, aux réactifs et au matériel utilisés.

### S.6.3. Quantification des virus dans les eaux usées

Comme indiqué dans la Figure S-10, les méthodes de détection ou de quantifications des virus des eaux usées peuvent s'adresser aux particules virales entières ou à leurs acides nucléiques. La majorité de nos analyses ont été faites par quantification des acides nucléiques viraux par des techniques de biologie moléculaire.

#### S.6.3.1. Analyse basée sur la détection des acides nucléiques viraux

##### S.6.3.1.1. Extraction des acides nucléiques

L'analyse des virus basée sur la détection ou la quantification de leurs acides nucléiques implique trois étapes successives : lyse, purification et récupération, auxquelles des spécifications particulières s'appliquent dans le cas des eaux usées.

La **lyse chimique** est la méthode la plus couramment employée pour l'analyse de virus en eaux usées. Des détergents tels que le Triton X-100, le NP-40 ou le SDS sont utilisés pour la solubilisation des lipides de la membrane des virus enveloppés. Des agents chaotropiques tels que le chloroforme, le thiocyanate de guanidine, un borate ou des mélanges de Tris/EDTA/NaCl/SDS sont utilisés pour la dénaturation des protéines de la capsid.

La **lyse enzymatique** (protéinase K) est aussi utilisée dans le même but (Le Guyader *et al.* 2013, Mallmann *et al.* 2021) mais en nécessitant de placer l'échantillon dans des conditions de pH et de température optimales à l'activité enzymatique.

L'ajout d'une désoxyribonucléase peut venir compléter la lyse en prévenant une contamination par de l'ADN qui pourrait fausser les résultats lors d'une analyse d'ARN. Un principe symétrique est appliqué à l'analyse d'ADN avec l'utilisation de ribonucléase.

La plupart des études récentes qui impliquent une analyse des virus en eaux usées, font appel à des kits d'extractions commerciaux dans lesquels la **purification et la récupération** des acides nucléiques est faite à l'aide de colonnes ou de billes de silice. La liaison de l'ADN à la silice en présence d'iodure de sodium (un sel chaotropique) a été exploitée pour la première fois par Vogelstein et Gillespie (1979) pour extraire de l'ADN d'un gel d'agarose. En

1990, Boom *et al.* ont développé une méthode dans laquelle la silice, est associée au thiocyanate de guanidine, en tant qu'agent chaotropique, pour purifier les acides nucléiques à partir de sérum humain et d'urine. Les **colonnes de silice**, tendent à être remplacées par des extracteurs automatiques ou semi-automatiques, utilisant des **billes magnétiques de silice**. Ces appareils permettent de réduire la dispersion des résultats liée aux manipulations humaines mais il ne se prêtent pas à des modifications de protocoles qui restent souvent nécessaires en réponse à la variabilité de la composition des eaux usées.

#### *S.6.3.1.2. Réactions de polymérisation en chaîne*

Le développement des techniques de biologie moléculaire dès le milieu des années 80 a constitué une avancée majeure dans le domaine de la virologie environnementale, permettant notamment d'étendre les analyses aux virus non cultivables.

La **PCR conventionnelle** est une méthode qui repose sur l'amplification spécifique d'un fragment d'ADN à l'aide d'une enzyme de type ADN polymérase. Dans le cas des virus à ARN, il est donc nécessaire d'ajouter en amont une étape de rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire grâce à l'action d'une transcriptase inverse. On parle alors de **Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)**. La spécificité de cette technique repose sur l'utilisation d'une paire d'oligonucléotides (amorces) flanquant de part et d'autre le fragment d'acide nucléique qui doit être répliqué, définissant ainsi le site de départ de la polymérase. L'amplification par PCR fait ensuite appel à une enzyme thermostable pour synthétiser de nouveaux brins d'ADN à partir des brins existants dans l'extrait. La PCR se déroule en trois étapes : dénaturation ou séparation des brins d'ADN double à une température  $\geq 90$  °C, hybridation des amorces à la matrice ADN à une température proche de leur température de fusion ( $T_m$ ), et élongation à une température adaptée à l'activité de l'enzyme utilisée. La répétition de ces trois étapes produit une amplification exponentielle de copies de la séquence d'intérêt. La PCR peut également être réalisée en deux étapes, combinant l'hybridation et l'élongation, ce qui permet de réduire le temps d'amplification (Girones *et al.* 1993, Jin *et al.* 2014). Dans le cas d'une PCR conventionnelle, les produits de PCR sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose et colorés à l'aide d'agents intercalants grâce auxquels une analyse visuelle qualitative (absence/présence), voire semi-quantitative, des résultats peut être effectuée.

La **PCR quantitative** (qPCR, ou RT-qPCR dans le cas des virus à ARN) permet l'amplification et la détection simultanées d'acides nucléiques, éliminant ainsi l'étape de migration et visualisation sur gel. La qPCR permet donc d'obtenir des données quantitatives. Elle est également plus sensible que la PCR conventionnelle. Dans cette méthode, les produits de PCR sont marqués à l'aide de colorants intercalants ou de sondes fluorogéniques, dont la fluorescence est mesurée à chaque cycle. Le principe de la quantification repose sur la corrélation entre l'intensité de l'émission de fluorescence et le nombre de cycles nécessaires

pour dépasser un seuil de détection correspondant au nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence entre dans une phase exponentielle (cycle de quantification ou cq). La mesure est exploitée à l'aide d'une courbe d'étalonnage préalablement établie.

Dans le cas de la **PCR digitale** (dPCR ou RT-dPCR dans le cas des virus à ARN), l'échantillon est mis en présence de l'ensemble des réactifs de PCR, puis fractionné en plusieurs milliers de partitions. Au terme de l'amplification, chaque partition peut donc contenir 0, 1 ou plusieurs copies de la cible. L'instrument mesure le nombre de partitions positives (dans lesquelles une amplification s'est produite) et négatives. Les résultats font l'objet d'une exploitation statistique, sous l'hypothèse que la distribution des copies de la cible dans les fractions positives est conforme à la loi de Poisson.

Ces techniques PCR présentent l'inconvénient d'être sensibles à de nombreux composés présents dans les échantillons environnementaux (Sidstedt *et al.* 2017). Il a été montré que les résultats de dPCR sont moins affectés par ces inhibitions du fait que la dPCR ne nécessite pas l'établissement de courbes de calibration et sans doute aussi, du fait que le fractionnement de l'échantillon abaisse la probabilité de la présence d'inhibiteurs dans les partitions (Sidstedt *et al.* 2020). Les qPCR et dPCR sont également coûteuses en équipement et réactifs, et requièrent une expertise technique.

#### *S.6.3.1.3. Séquençage*

Le **séquençage** ouvre la voie à une analyse plus fine des virus dans l'environnement, telles que la diversité virale, le génotypage et l'identification et le suivi de nouveaux variants (Arana *et al.* 2014, Ogorzaly *et al.* 2015, Strubbia *et al.* 2019 Wurtz *et al.* 2021).

La technique de séquençage la plus simple est basée sur la méthode **Sanger**. Elle a été appliquée dans plusieurs études de la diversité virale dans les eaux usées (Prado *et al.* 2011, Hellmér *et al.* 2014, Montazeri *et al.* 2015, Ibrahim *et al.* 2017, Di Profio *et al.* 2019).

De gros progrès ont été réalisés avec les techniques de **séquençage haut débit** qui permettent l'analyse simultanée d'un très grand nombre d'échantillons grâce à la production simultanée de millions de copies de fragments d'ADN (Reuter *et al.* 2015). La diminution de leur coût a permis une large extension de leurs applications, notamment à des études sur la prévalence et la diversité des virus dans des échantillons d'eaux usées et de boues (Bibby *et Peccia* 2013, Fumian *et al.* 2019, Hoy 2019, Martínez-Puchol *et al.* 2020).

Ces techniques nécessitent toutefois l'acquisition d'équipement et de réactifs coûteux et surtout une expertise à la fois technique et dans le domaine de la bio-informatique pour le traitement des données. Par ailleurs, diverses études métagénomiques mettent en évidence les limites des bases de données disponibles pour l'identification des génomes viraux récoltés dans les échantillons d'eaux usées (Tamaki *et al.* 2012, Ng *et al.* 2012).

L'enrichissement de ces bases de données publiques constitue un enjeu crucial pour le développement des analyses de diversité virale dans l'environnement.

### *S.6.3.2. Analyses basées sur la détection de virus entiers*

#### *S.6.3.2.1. Cytométrie en flux*

La **cytométrie en flux** est une technique permettant le comptage et l'analyse des caractéristiques (diamètre équivalent, forme, absorbance, fluorescence) de particules en suspension dans un liquide. Un marquage optionnel des objets d'intérêt peut être effectué, à l'aide de fluorophores, par exemple, avant que la suspension soit injectée dans l'appareil. Les particules sont sérialisées dans un tube capillaire et passent devant un ou plusieurs faisceaux laser pour l'enregistrement de signaux de diffusion, d'émission de fluorescence et d'absorption. La technique a été utilisée pour déterminer l'abondance des virus dans des échantillons d'eaux usées et de boues de station d'épuration ([Ma et al. 2013](#), [Brown et al. 2015](#)).

Au-delà de l'expertise technique et du coût élevé des équipements, la cytométrie en flux nécessite de travailler avec des échantillons prétraités pour isoler, autant que possible, les virus autochtones des éléments auxquels ils peuvent être associés (flocs, notamment).

#### *S.6.3.2.2. Microscopie électronique (MET, MEB)*

La **microscopie électronique à transmission** (MET) et la **microscopie électronique à balayage** (MEB) sont des techniques d'imagerie permettant la visualisation d'échantillons à l'échelle nanométrique (résolution de l'ordre de 1 nm et de 0.2 nm, respectivement, pour un MEB et un MET) et jusqu'à quelques angströms avec les TEM haute résolution (résolution de l'ordre de 0.5 Å). Elles jouent un rôle important dans l'identification et la classification des virus en fonction de leur morphologie ([Roingeard et al. 2019](#)). La MET donne des indications sur la composition interne des objets visualisés, alors que la MEB est une technique d'imagerie de surface. Les observations d'échantillons "environnementaux" au MEB peuvent être réalisées sous vide partiel, en atmosphère humide afin de préserver les échantillons de la déshydratation et ainsi l'apparition d'artefacts. La préparation des échantillons de nature biologique à une observation au MEB consiste essentiellement en une métallisation (or, argent, platine).

L'utilisation de ces techniques présente plusieurs inconvénients : la recherche et la visualisation des virus dans des échantillons environnementaux reste longue et fastidieuse car difficilement automatisable ([Barreto-Vieira et Barth 2015](#)). Elles nécessitent des

équipements coûteux et une expertise technique avancée. Dans le cas des virus, elles s'appliquent à des échantillons dont la concentration en virus est importante (tissus, liquides biologiques infectés, cultures), en tant qu'outil de diagnostic et d'identification (Roingard *et al.* 2018) ou préalablement traités pour en augmenter la concentration. La TEM a cependant été utilisée par Wu et Liu (2009) pour étudier la morphologie de virus issus d'échantillons de boues de STEP, sans qu'il y ait nécessité d'une pré concentration.

#### *S.6.3.2.3. Microscopie en épifluorescence*

En virologie, les techniques d'observation par **microscopie en épifluorescence** sont principalement utilisées pour la détection des acides nucléiques et des protéines des capsides.

Les travaux d'Otawa *et al.* (2007) et Wu et Liu (2009) sont des exemples d'application de la microscopie en épifluorescence à la visualisation d'acides nucléiques viraux. L'échantillon est tout d'abord filtré sur membrane de faible porosité (généralement 0.22 µm) pour concentrer les virus. Ils sont ensuite perméabilisés pour permettre à un fluorophore de se fixer sur les acides nucléiques. Le dénombrement est effectué à partir de la fluorescence émise par les particules virales ainsi marquées (Ortmann et Suttle, 2009). Le SYBR Green I est l'un des fluorophores utilisés pour la recherche de virus dans les eaux usées et boues de STEP (Otawa *et al.* 2007, Wu et Liu 2009). Les résultats de Forterre *et al.* (2013) montrent cependant une faible efficacité de cette technique pour la détection de virus à ADN simple brin ou de virus à ARN, cette dernière catégorie représentant la majorité des virus entériques humains.

L'**immunofluorescence** est une technique de détection des protéines de la capsidie des virus à l'aide d'anticorps fluorescents. L'échantillon à analyser est fixé sur un support (lame de microscopie) puis mis en présence d'un anticorps primaire, spécifiquement dirigé contre les protéines du ou des virus étudiés. Des anticorps secondaires, couplés à un fluorophore, viennent ensuite se fixer sur l'anticorps primaire. Les plages fluorescentes correspondantes au complexe sont observées sous microscope (Dowd *et al.* 2009, Im *et al.* 2019).

La méthode a été utilisée pour la quantification d'HAdV dans des échantillons de boues et d'eau usées de STEPs (Schlindwein *et al.* 2010, Calgua *et al.* 2011). Elle a également été mise en œuvre pour l'analyse de l'infectivité de certains virus (Calgua *et al.* 2011). Elle est dépendante de la disponibilité des anticorps et ses résultats sont tributaires de leur spécificité.

#### S.6.3.2.4. Dosage immunoenzymatique (ELISA)

ELISA (**Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay**) est le nom donné à une méthode immuno-enzymatique d'analyse de protéines, d'anticorps, d'antigènes, d'hormones dans les fluides corporels. Il existe plusieurs variantes de cette technique : ELISA direct, indirect, en sandwich et compétitif. Toutes font appel à un anticorps auquel est greffé un enzyme dont le rôle est de cliver un substrat pour libérer un pigment, ou un composé fluorescent, dont la concentration est corrélée à celle de l'antigène dans l'échantillon analysé (Gan et Patel 2013).

Les variantes diffèrent principalement par le mode d'accrochage de l'antigène à analyser à la paroi d'un tube à essai (fixation directe ou par l'intermédiaire d'un anticorps) et par la mise en œuvre, ou non, d'un anticorps dit secondaire, qui est alors celui qui porte l'enzyme.

La méthode est utilisée pour un grand nombre de tests dans le domaine de la santé. Nasser *et al.* (1995) ont validé l'applicabilité de cette technique au domaine des analyses environnementales, avec celle de poliovirus dans des échantillons d'eaux usées et d'eaux de surface. Kargar *et al.* (2013) ont également utilisé cette technique pour l'évaluation de la rétention de rotavirus par des systèmes de traitement des eaux usées urbaines et hospitalières. Tout comme pour l'immunofluorescence, les principales limites de ces techniques résident dans la disponibilité et la spécificité des anticorps spécifiques, ainsi que dans leurs coûts de production (Boonham *et al.* 2014).

#### S.6.3.2.5. La culture cellulaire

Qu'elle soit qualitative ou quantitative, l'analyse des virus par **culture sur lignée cellulaire** exploite les effets induits par l'infection (effets cytopathiques ou ECP) sur une culture de cellules hôtes (Qiu *et al.* 2018). Dans le cas de l'analyse de virus environnementaux, une décontamination préalable de l'échantillon peut être requise afin de limiter la présence d'éléments pouvant déclencher des effets cytotoxiques chez l'hôte et conduire ainsi à une fausse interprétation des résultats.

La culture des virus peut être réalisée sur gélose ou en milieu liquide. Sur gélose, l'infection des cellules s'effectue de proche en proche, les virus libérés lors de la lyse d'une cellule n'infectant que les cellules adjacentes. Ce phénomène conduit à l'apparition de plages de lyse circulaires visibles à l'œil nu. Le niveau d'infection est obtenu par le dénombrement de ces plages de lyse, rapporté au volume et à la dilution de l'échantillon. Dans les cultures en milieu liquide, l'infection des cellules est plus ou moins homogène, et peut conduire à la dégradation de toutes les cellules du milieu.

Quel que soit le mode de culture, la quantification des virus est faite selon deux méthodes :

- La recherche de la dilution limite qui se traduit par une valeur de "dose infectieuse 50%" (TCID50 ou Tissue culture infective dose 50%) (Hierholzer et Killington 1996). Des cultures cellulaires sont inoculées par des dilutions en cascade de l'échantillon. La TCID50 est la dilution pour laquelle 50 % des répliques présentent un ECP.
- La méthode du nombre le plus probable (NPP) (McCrary, 1915). La préparation est la même que pour la méthode précédente. C'est le nombre de répliques présentant un ECP, pour une dilution donnée, qui est utilisé pour une évaluation statistique de la concentration initiale des virus (Suttle 1993).

La principale, limite à la mise en œuvre généralisée de ces méthodes est que nous ne disposons pas, actuellement, de lignée cellulaire sur lesquelles certains virus entériques, tels que les NoV, peuvent être cultivés *in vitro*. Par ailleurs, certains virus comme les RoV et les VHA n'induisent pas d'ECP aisément détectables.

#### *S.6.3.2.6. Les techniques alternatives pour l'analyse des virus infectieux*

L'infectivité des virus est définie par leur capacité à entrer dans une cellule hôte et à détourner la machinerie cellulaire au profit de leur multiplication. La conservation du caractère infectieux des virus humain dans l'environnement est une question centrale de la virologie des eaux, mais comme indiqué au début de ce chapitre, les techniques de quantification par PCR et de séquençage ne permettent pas d'obtenir des informations sur l'intégrité physique des virus étudiés et leur capacité infectieuse. La culture cellulaire reste donc actuellement la technique de référence pour l'étude des virus infectieux, avec les limites exposées précédemment. Des approches complémentaires, abordées dans les paragraphes suivants, ont été proposées pour y répondre.

Il est possible de combiner la culture cellulaire et la PCR pour limiter les désavantages de chacune des méthodes lorsqu'elles sont utilisées individuellement, grâce à l'**Integrated Cell Culture-PCR** (ICC-PCR). Cette technique permet d'obtenir des informations sur l'infectivité des virus étudiés tout en étant plus rapide et sensible qu'une culture « classique » (Lee et Kim 2002, Chowdary *et al.* 2005, Prado *et al.* 2019). Au même titre que la culture cellulaire, elle présente cependant le défaut majeur de n'être applicable qu'aux virus cultivables.

Des techniques combinant un traitement préalable des échantillons par des colorants (propidium monoazide, ethidium monoazide) et la qPCR (**PMA-qPCR** et **EMA-qPCR**), ont également été proposées comme alternatives à la culture cellulaire. Leur principe repose sur la capacité de colorants intercalants à se lier aux acides nucléiques accessibles (génomés libres ou associés à des capsides endommagées) ce qui empêche leur amplification par qPCR. L'opération est faite avant le traitement d'extraction. La liaison est stabilisée par une photoactivation. Seuls les génomes des virus dont la capsid est intacte peuvent alors être

détectés, ce qui permet de discriminer les virus viables de ceux dont la capsid est détériorée (Prévost *et al.* 2016, Leifels *et al.* 2021). Une autre méthode consiste à combiner un prétraitement enzymatique (protéinase K et ARNase) de l'échantillon et une quantification par qPCR (ET-qPCR). Cette technique a été particulièrement utilisée pour étudier les effets de traitements de désinfection (UV, chaleur, chloration) (Bofill-Mas *et al.* 2006, Pecson *et al.* 2009). En effet, les capsides endommagées par ces traitements sont plus sensibles à l'action de la protéinase K que les capsides intactes, ce qui favorise la dégradation des génomes qu'elles renferment par l'ARNase (Nuanualsuwan et Cliver 2003, Pecson *et al.* 2009). Bien que ces méthodes limitent la surestimation des virus quantifiés par (RT-)qPCR, elles ne permettent pas réellement de statuer sur l'infectivité des virus, car elle ne dépend pas uniquement de l'intégrité de la capsid (Hamza *et al.* 2011).

#### S.6.4. Les virus modèles

Les virus modèles constituent une autre voie alternative pour l'étude de l'infectivité virale, notamment lorsque la manipulation du virus étudié présente un danger trop important pour les opérateurs. Les modèles viraux peuvent également être utilisés pour l'étude en microcosme de la dispersion des VEH dans l'environnement, ou plus globalement dans les études d'évaluation de la réduction des charges virales par les STEPs.

Le choix des modèles viraux se base idéalement sur leur facilité de production/de détection, leur faible coût et leur absence de pathogénicité pour l'humain. Selon le type d'étude mis en place, leur sélection doit également respecter certains critères de similarité : caractéristiques structurelles et/ou génomiques (taille, charge de surface, hydrophobicité, reconnaissance de sites d'accrochage spécifique, nature de l'acide nucléique), cinétique d'inactivation, résistance aux conditions environnementales (Duizer *et al.* 2006, Tableau S-2).

Tableau S-2. Exemples d'études utilisant des virus modèles des VEH. FCV = calicivirus félin ; MNV = norovirus murin ; PMMoV = virus de la marbrure légère du piment ; TMV = virus de la mosaïque du tabac ; VLP = Pseudo particule virale.

Type d'étude	Principaux critères de choix du virus modèle	virus modèles	Références
<b>Inactivation / Infectivité</b>	Modèle cellulaire disponible, rapidité, faible coût, persistance similaire	Autres Caliciviridae (FCV, MNV, virus Tulane)	Wobus <i>et al.</i> 2006 Bae et Schwab 2008 Davis <i>et al.</i> 2012 Araud <i>et al.</i> 2020
		Bactériophages	Bae et Schwab 2008 Havelaar <i>et al.</i> 1990 Flannery <i>et al.</i> 2013 Hata <i>et al.</i> 2016
		Virus de plante (PMMoV)	Shirasaki <i>et al.</i> 2020
<b>Réduction par les établissements de traitement des eaux</b>	Similarités structurelles (taille, charge de surface, hydrophobicité), capacité à reconnaître des sites d'accrochage spécifique	VLP	Caballero <i>et al.</i> 2004 Loisy <i>et al.</i> 2005
		Bactériophages	Cahn <i>et al.</i> 2021 Haramoto <i>et al.</i> 2015 Hata <i>et al.</i> 2013 Lee <i>et al.</i> 2017
		Virus de plante (PMMoV, TMV)	Kitajima <i>et al.</i> 2014 Kitajima <i>et al.</i> 2014 Schmitz <i>et al.</i> 2016 Shrestha <i>et al.</i> 2018 Tandukar <i>et al.</i> 2020
<b>Persistance dans l'environnement</b>	Persistance similaire dans les milieux aquatiques et vis-à-vis des traitements	Autres Caliciviridae (FCV, MNV, virus Tulane)	Bae et Schwab 2008 Tian <i>et al.</i> 2013 Drouaz <i>et al.</i> 2015
		Bactériophages	Skraber <i>et al.</i> 2009 Ogorzaly <i>et al.</i> 2010

#### S.6.4.1. *Caliciviridae*

Plusieurs virus entériques infectant d'autres espèces animales sont utilisés comme modèles des virus entériques humains. C'est le cas, notamment, du norovirus murin, du calicivirus félin, et du virus Tulane, tous appartenant à la famille des *Caliciviridae*.

Découvert en 2003 par [Karst et al.](#) chez des souris de laboratoire, le **norovirus murin (MNV-1)**, a depuis été utilisé comme contrôle dans de nombreuses études, en raison de ses similarités structurelles et génomiques avec les norovirus humain ([Wobus et al. 2006](#), [Bae et Schwab 2008](#), [Davis et al. 2012](#), [Kitajima et al. 2014](#), [Hennechart-Collette et al. 2015](#)). Ce virus présente également l'avantage d'être facilement cultivable sur les lignées cellulaires de macrophages de souris ([Hwang et al. 2014](#)). Le **calicivirus félin (FCV)** appartient au genre *Vesivirus*, et affecte les voies respiratoires des chats. A l'instar du Norovirus murin, le FCV a l'avantage d'être cultivable in vitro ([Stuart et Brown, 2006](#)). Dans une étude comparative sur la persistance de modèles viraux dans les eaux de surface et les eaux souterraines, [Bae et Schwab \(2008\)](#) ont montré que les MNV présentaient une persistance similaire à celles des HuNoV. Leurs résultats indiquent par ailleurs que le FCV serait moins stable que les MNV et MS2, soulevant la question de sa pertinence en tant que modèle des HuNoV dans ce type d'études. Dans un autre domaine, les trois virus (MNV, FCV et MS2) ont été utilisés à la recherche d'une éventuelle capacité du chitosan, un polymère d'oligosaccharides, à inactiver les virus entériques ([Su et al. 2009](#)).

Le **virus Tulane (TV)** est le seul membre du genre *Recovirus*. Ce virus, initialement isolé en 2008 à partir d'échantillons de selles de macaques Rhésus, présente des caractéristiques phylogénétiques proches de celles des NoV ([Farkas et al. 2008](#)). Il a depuis été utilisé comme modèle candidat des HuNoV dans des études d'inactivation ([Araud et al. 2020](#)) et de persistance virale ([Tian et al. 2013](#), [Drouaz et al. 2015](#)). Cependant, la mise en évidence d'une transmission zoonotique ([Farkas et al. 2010](#), [Smits et al. 2012](#), [Farkas et Wong 2014](#)) remet en cause la sécurité de leur utilisation en tant que virus modèles.

#### S.6.4.2. *Bactériophages*

Les **coliphages somatiques** représentent une large variété de phages aux caractéristiques morphologiques et génomiques très variées. Ils sont répartis dans 4 familles : les *Microviridae*, les *Myoviridae*, les *Podoviridae* et les *Siphoviridae*. Leur mécanisme d'infection repose sur un accrochage à des récepteurs de la paroi des bactéries hôtes. Les **bactériophages ARN-F spécifiques** appartiennent aux genres *Levivirus* et *Allolevivirus*, de la famille des *Leviviridae*. Les membres de cette famille sont classés sur la base de leur sérotypage dans 4 génogroupes (GI à GIV) dont les représentants respectifs sont les phages MS2, GA, Q $\beta$  et SP ([Furusuke et al. 1987](#)). Ils se distinguent des coliphages somatiques par

leur mécanisme d'infection, l'accrochage sur l'hôte se faisant lors de la phase exponentielle de croissance, sur un pilus sexuel exprimé par les bactéries porteuses d'un plasmide codant pour le facteur F. Parmi les hôtes de ces bactériophages, on retrouve notamment des *Escherichia coli* (Rappaport *et al.* 1965), *Pseudomonas aeruginosa* (Pourcel *et al.* 2017), *Caulobacter crescentus* (Schmidt *et al.* 1965) et *Acinetobacter* spp. (Klovins *et al.* 2002). Ils présentent par ailleurs des caractéristiques morphologiques et génomiques similaires à la majorité des virus entériques humains, avec une capsidie icosaédrique d'environ 20 à 30 nm de diamètre renfermant un ARN simple brin à polarité positive.

Les coliphages somatiques et les bactériophages ARN F-spécifiques sont utilisés dans de nombreuses études portant sur l'infectivité, la résistance aux traitements de désinfection ou la réduction des charges virales par les STEPs (Havelaar *et al.* 1990, Flannery *et al.* 2013, Hata *et al.* 2013, Haramoto *et al.* 2015, Lee *et al.* 2017). Ils sont également proposés comme indicateurs de pollution virale et présentent une persistance similaire, voire supérieure, à celle des virus entériques humains dans les eaux usées (Bitton 2010, Gerba *et al.* 2015, Ogorzaly *et al.* 2010, Ikner *et al.* 2011, Prévost *et al.* 2015).

En théorie, les coliphages somatiques et ARN-F spécifiques devraient être susceptibles de se répliquer dans les milieux aquatiques où leurs hôtes ont été détectés. La question fait cependant débat, car plusieurs auteurs font remarquer que les eaux environnementales, y compris les eaux usées riches en bactéries entériques, ne présentent pas les conditions nécessaires à la multiplication des bactéries hôtes et à l'expression des récepteurs spécifiques (condition de température notamment, préférentiellement > 30°C) (Novotny et Lavin 1971, Grabow *et al.* 1980, Grabow *et al.* 2001, Jofre *et al.* 2009).

#### S.6.4.1. Virus de plantes

Deux virus de plantes, appartenant au genre *Tobamovirus* (famille des *Virgaviridae*) ont plus récemment été proposés comme modèle de virus entériques humains. Il s'agit de virus à ARN simple brin (polarité positive), non enveloppés, avec une capsidie cylindrique d'environ 300 nm de long et 18 nm de diamètre (Lewandowski 2008).

Parmi les membres appartenant à ce genre, le virus de la marbrure bénigne du piment (PMMoV ou Pepper Mild Mottle Virus) a été proposé comme modèle pour l'étude de la réduction des charges en virus entériques humains par les traitements d'épuration des eaux usées (Kitajima *et al.* 2014, Schmitz *et al.* 2016, Kitajima *et al.* 2018, Tandukar *et al.* 2020) et de l'effet de traitement d'inactivation (Shirasaki *et al.* 2020). De la même manière, le virus de la mosaïque du tabac (TMV pour Tobacco Mosaic Virus) a été utilisé dans diverses études sur la réduction des charges virales au cours des traitements d'épuration (Shrestha *et al.* 2018, Tandukar *et al.* 2020).

#### S.6.4.2. Pseudo Particules Virales

Les pseudo particules virales ou virus-like particles (VLPs) sont issues de l'expression et l'autoassemblage de protéines de capsid obtenues *in vitro*. Des "rotavirus-like particles" ont été utilisées pour l'étude de la persistance et de la résistance des rotavirus à l'inactivation par Caballero *et al.* (2004) dans des eaux de surface et marines, et par Loisy *et al.* (2005) dans des mollusques. D'autres auteurs ont fait usage de VLPs, pour l'étude de la rétention des norovirus par des procédés de potabilisation d'eau (Shirasaki *et al.* 2010, Matsushita *et al.* 2013).

L'utilisation des VLPs est limitée du fait qu'elles ne contiennent pas d'acide nucléique, ce qui implique une quantification restreinte à des techniques de cytométrie, de microscopie ou d'immunologie. De plus, des différences de comportement peuvent être attendues entre les virus complets et les VLPs correspondantes, du fait de l'absence du génome viral sur les charges de surface de leur capsid (Dika *et al.* 2011).

#### S.6.5. Contrôle des techniques d'analyse des virus entériques humains dans les eaux usées

Une revue exhaustive des techniques de détection des virus dans les eaux usées et dans les boues a été publiée par Corpus *et al.* (2020). Elle confirme les difficultés techniques associées à ces mesures et la nécessité de leur apporter des améliorations (Tableau S-2).

Plusieurs auteurs soulignent la variabilité des performances des techniques les plus couramment mises en œuvre pour la collecte des charges virales dans ces milieux complexes (Prado *et al.* 2014, Ahmed *et al.* 2020). Monpoeho *et al.* 2001 en font la démonstration avec la comparaison de différentes techniques d'analyse d'échantillons de boue. Leur constat rejoint celui de beaucoup d'autres, relatif notamment au problème posé par des composés inhibiteurs pour les réactions d'amplification des acides nucléiques.

Chacune des méthodes décrites précédemment présentent donc des limites (tableau S-3) qu'il convient d'évaluer par différents types de contrôles.

Tableau S-3. Principales techniques d'analyses des VEH dans les eaux usées et boues de STEPs, et leurs limites.

<i>Etape ciblée</i>	<i>Technique</i>	<i>Limites</i>
<b>Extraction et concentration des virus</b>	Adsorption-élution	Volume d'échantillon important Adapté aux échantillons peu chargés Co-concentration d'inhibiteurs des analyses moléculaires
	Elution directe	Co-concentration d'inhibiteurs des analyses moléculaires
	Ultrafiltration	Adapté aux échantillons peu chargés Débit lent
	Ultracentrifugation	Equipement coûteux Co-concentration d'inhibiteurs des analyses moléculaires
	Floculation organique	Inhibiteurs des analyses moléculaires
<b>Détection des acides nucléiques (analyses moléculaires)</b>	(RT-)qPCR	Equipement coûteux Compétence techniques avancées Sensibilité accrue aux inhibiteurs
	(RT-)dPCR	Equipement coûteux Compétence techniques avancées Sensibilité accrue aux inhibiteurs
	Séquençage	Equipement coûteux Compétence techniques avancées Sensibilité accrue aux inhibiteurs
<b>Détection des virus infectieux</b>	Culture cellulaire	Long Nécessite une décontamination ou un modèle cellulaire Uniquement pour les virus cultivables et ayant un ECP
	ICC-PCR	Equipement coûteux Uniquement pour les virus cultivables et ayant un ECP

#### 5.6.5.1. Les contrôles de process

Dans le domaine de la virologie le contrôle de l'efficacité et du bon déroulement d'une technique d'analyse est effectué par l'ajout (ou « **spiking** ») dans l'échantillon d'une suspension virale calibrée. L'efficacité globale d'un protocole est évaluée par spiking de l'échantillon brut, non traité. Il peut aussi être fait en amont de chacune des étapes d'un protocole (extraction des virus, concentration et purification des particules ou des acides nucléiques, détection) pour en tester l'efficacité spécifique. En parallèle, un contrôle négatif correspondant à l'échantillon brut, non « spiké », doit être mis en place afin de vérifier l'absence de contamination au cours du processus analytique.

Au même titre que les virus modèles, les virus contrôles utilisés dans ces opérations doivent répondre à certains critères :

- Présenter des caractéristiques morphologiques, génomiques et physico-chimiques similaires à celles des virus auxquels ils se substituent, afin de mimer au mieux leur comportement vis-à-vis des traitements appliqués ;
- Être facilement quantifiables par la méthode d'analyse choisie ;
- Dans l'idéal, ne pas être naturellement présents dans les échantillons analysés. S'ils le sont, leur concentration doit être suffisamment faible par rapport à celle résultant de l'ajout qui est fait à l'échantillon.

Le norovirus murin est choisi comme virus contrôle dans de nombreux travaux relatifs aux norovirus et adénovirus humains (Hata *et al.* 2013, Kitajima *et al.* 2014, Hennechart-Colette *et al.* 2015, Hjelmso *et al.* 2017), pour ses similarités avec les HuNoV, sa simplicité de manipulation et son absence de pathogénicité pour les humains. Nous avons également fait ce choix, en toute logique avec les orientations de notre travail. Le MNV-1 a aussi été utilisé en tant que virus modèle, dans quelques-unes de nos expériences.

La bibliographie montre qu'il est aussi fait appel à d'autres virus pour le contrôle des analyses, à l'exemple des bactériophages PP7 (Rajal *et al.* 2007, Fumian *et al.* 2010, Prado *et al.* 2019) et des Mengovirus (Sima *et al.* 2011, Da Silva *et al.* 2007, Coudray-Meunier *et al.* 2015, Farkas *et al.* 2018, Teixeira *et al.* 2020, Truchado *et al.* 2021, Giron-Guzman *et al.* 2023). Des virus entériques humains peuvent, eux aussi, être utilisés afin de fournir une estimation plus fidèle de l'efficacité de récupération d'une technique, à l'exemple de l'HADV et du NoV (Albinana-Gimenez *et al.* 2009, Victoria *et al.* 2010, Fumian *et al.* 2019), avec l'inconvénient de présenter un risque pour les opérateurs.

#### 5.6.5.2. Les contrôles d'inhibition PCR

Comme indiqué précédemment, les techniques d'amplification moléculaire des génomes viraux présentent une sensibilité particulière à certains composés dits "inhibiteurs de PCR". Ces substances peuvent être initialement présentes dans l'échantillon – acides humiques, acides fulviques, polyphénols, enzymes, débris cellulaires, ions métalliques – ou avoir été introduits dans un échantillon lors des précédentes étapes d'analyse – sels, détergents, matière organique – (Abbaszadegan *et al.* 1993, Ijzerman *et al.* 1997, Monteiro *et al.* 1997, Wilson 1997, Queiroz *et al.* 2001, Huggett *et al.* 2008). Le potentiel inhibiteur de ces composés peut intervenir à différents niveaux (Schrader *et al.* 2012) :

- Interférence avec les acides nucléiques
- Inhibition des enzymes (transcriptase inverse, ADN polymérase)
- Interférence avec les amorces et/ou les sondes
- Altération de l'émission de fluorescence

La recherche d'optimisation des protocoles et des réactifs d'extraction et de (RT-)PCR est donc nécessaire lors de la mise en place d'une analyse. Mais ces stratégies peuvent s'avérer insuffisantes dans le cas d'échantillons à la fois complexes et dont la composition est très variable, tels que les eaux usées et les boues de STEPs. La dilution des extraits d'acides nucléiques est une méthode largement répandue pour limiter ces phénomènes d'inhibition (da Silva *et al.* 2008, Gibson *et al.* 2012, Hamza *et al.* 2024) mais elle peut augmenter le risque de surestimation ou de faux négatifs en cas de dilution inadaptée (Wang *et al.* 2017, Bott *et al.* 2023). Des kits commerciaux dit « supprimeurs d'inhibiteurs » sont également disponibles. D'après une étude de Hamza *et al.* (2024), leur efficacité reste cependant fortement dépendante du type d'échantillon étudié, du type de traitement appliqué à l'échantillon et varie selon les inhibiteurs. Les mêmes auteurs ont montré que le DAX-8, un polymère insoluble, a une efficacité supérieure à celles de certains kits commerciaux pour l'élimination des acides humiques. La possibilité de neutraliser plusieurs types d'inhibiteurs par l'ajout, dans la réaction de (RT-)PCR, de substances telles que la protéine du gène 32 du bactériophage T4 ou l'albumine sérique bovine (BSA) a également été décrite (Kreider *et al.* 1996, Villalva *et al.* 2001, Opel *et al.* 2010). Plusieurs études, relatives à des échantillons environnementaux, montrent que l'effet des composés inhibiteurs est en partie réduit, dans l'analyse des extraits par dPCR, du fait de la partition des échantillons en plusieurs milliers de fractions analysées individuellement (Racki *et al.* 2014, Ahmed *et al.* 2022).

Quelle que soit la méthode utilisée, la présence potentielle d'inhibiteurs de (RT-)PCR dans l'extrait traité ne peut être écartée et doit être évaluée par la mise en place de contrôles. On en distingue deux types : les contrôles internes et externes. Les contrôles internes correspondent à l'ajout d'une solution calibrée d'acides nucléiques dont la séquence diffère (au moins partiellement) de la séquence cible. L'utilisation de contrôles externes implique l'ajout d'une solution calibrée d'acides nucléiques comprenant la séquence cible (Hoorfar *et al.* 2004, Schrader *et al.* 2012). Cette technique permet d'estimer l'inhibition spécifique à la cible, mais elle double le nombre d'analyse.

Des contrôles supplémentaires permettent de vérifier le bon déroulement de la réaction de (RT-)qPCR : un contrôle positif pour s'assurer de l'efficacité de l'amplification de la cible (généralement un plasmide dans lequel est inséré la séquence d'intérêt ou un extrait génomique de la cible) et un contrôle négatif pour vérifier l'absence de contamination (généralement, de l'eau ultrapure stérile).

## Objectifs

Ce travail a été initié au motif du réel enjeu de santé publique que représente la mesure de la charge en VEH dans les eaux usées, aussi bien à l'entrée des STEPs (1<sup>er</sup> niveau d'alerte d'épisodes épidémiques) qu'à la sortie (contamination des milieux environnementaux et, indirectement, des populations humaines situées en aval). Les objectifs ont également été définis à partir du constat évoqué précédemment, de la rareté des informations sur le détail des mécanismes sous-jacents aux deux principaux procédés de traitement, la décantation et les filtres biologiques. Cette démarche présente, en effet, plusieurs intérêts :

- Pour la définition des variantes qui peuvent en dériver, en vue de l'amélioration du procédé ;
- Pour la définition de nouveaux procédés à partir des mécanismes dont les études révèlent l'efficacité particulière ;
- Pour l'identification des problèmes et des points d'intérêt auxquels la mise au point de nouveaux protocoles d'analyse (échantillonnage et analyse proprement dite) pour le suivi des concentrations virales dans les STEPs, peuvent être confrontée.

C'est à partir de l'ensemble de ces considérations, que nos travaux ont été orientés vers les deux points suivants :

- Celui des problèmes d'échantillonnage et d'analyse qui affectent la recherche des virus dans les boues et les eaux usées dont dépend, en aval, les interprétations qui en sont faites. Notre objectif, ici a été de développer un protocole d'échantillonnage et d'analyse des VEH en milieux hydriques complexes à partir de l'optimisation de techniques existantes mais surtout, de la recherche d'innovations dans le domaine des capteurs passifs.
- Celui des mécanismes de la rétention/transformation des charges en VEH (en termes de concentration, d'intégrité des particules virales et de diversité) au niveau des deux principaux procédés de traitement : la décantation primaire et les biofiltres.

Le niveau de détail auquel nous nous sommes adressés dans l'étude de ces mécanismes, a été le résultat de nos réflexions initiales et de leur évolution avec l'avancé du travail, mais aussi de contraintes de toute nature. Il s'est établi comme suit :

Pour le traitement primaire :

- Effets propres de différents polymères ;
- Relation entre les effets du procédé et le degré d'intégration physique des virus dans leur environnement (virus libres / virus attachés ou englobés sur/dans un support) ;
- Contribution à la rétention des virus, de chacune des fractions générées par le procédé (eau surnageante et boues) ;
- Effets spécifiques sur certains groupes viraux (rétention sélective, effet filtre) ;
- Globalité des effets sur l'ensemble des paramètres descripteurs des charges virales (concentration, diversité, infectivité) ou, plus particulièrement, sur certains d'entre eux.

Pour le traitement secondaire :

- Contributions des éléments physiques et chimiques, minéraux et organiques, à la rétention des virus, relativement les uns aux autres ;
- Discrimination des contributeurs à la rétention, sur la base de leur vitesse à l'échelle horaire (contributeurs immédiats / tardifs) ;
- Rôle de l'âge et du degré de maturité des biofilms (évolution des taux de rétention à l'échelle de plusieurs semaines) ;
- Apport d'informations sur la contribution de quelques processus inhérents aux biofiltres, à la rétention des VEH (activités exo enzymatiques, ingestion passive, accrochage spécifiques).

Les problématiques abordées dans cette étude sont développées dans quatre chapitres :

I - Développement de dispositifs d'échantillonnage passifs et d'un protocole analytique des VEH en milieux hydriques complexes (adaptés aux exigences des analyses de routine et aux moyens d'un laboratoire d'analyses environnementales).

II – Evolution à l'échelle annuelle, des charges véhiculées par les eaux usées dans l'usine de dépollution (UDEP) Grand Chambéry, sur la base des analyses réglementaires de la station sur une période de 11 mois, complétées par 17 dates d'analyse des VEH.

III - Incidences des traitements physiques et chimiques sur l'évolution des charges virales : étude comparative de l'effet de différentes combinaisons de polymères sur la distribution des charges en VEH entre la phase surnageante et les boues issues de la décantation primaire.

IV - Incidences du traitement biologique sur l'évolution des charges en VEH, par le suivi de leur évolution à différents stades de la progression de l'eau de percolation dans les biofiltres et en fonction du temps.

# Matériel et Méthodes

## Matériels et Méthodes

### MM.1. Virus modèles de cette étude : souches, culture et détermination du titre infectieux

Au cours de ce travail, deux virus ont été utilisés comme virus modèles des VEH et contrôles internes dans différentes analyses :

- Le norovirus murin (MNV), partageant des similarités structurales et génomiques avec les norovirus humains, et couramment utilisé comme modèle dans les études en eaux usées.
- Le bactériophage MS2, dont la taille et la structure sont similaires à celles des norovirus. Ces virus permettent de faire des tests d'infectivité en eaux usées et sont couramment utilisés comme modèles des virus entériques humains.

Deux raisons expliquent ces choix. La première est la sécurité des collaborateurs de l'entreprise, le laboratoire de R&D dans lequel a été réalisé ce travail étant partagé avec les techniciens réalisant les analyses de routines de l'entreprise. La deuxième raison, est celle de la difficulté, voire de l'impossibilité, à l'heure actuelle, à cultiver les norovirus humains.

#### MM.1.1. MNV

##### *MM.1.1.1. Souche virale et cellule hôte*

Le **MNV-1** (ATCC VR-1937) est un norovirus murin initialement décrit par [Karst et al. \(2003\)](#). Cette souche virale a été fournie par le laboratoire Abiolab. La lignée cellulaire utilisée pour la culture et la détermination du titre infectieux des MNV-1, est le macrophage murin **RAW 264.7** (ATCC TIB-71). Ces cellules immunitaires ont été originellement isolées d'une tumeur de souris BALB/c. Bien que ces cellules soient issues de lignées immortalisées, il est préconisé de ne pas dépasser un certain nombre de passages. Un passage est effectué en transférant une partie des cellules de la culture dans un nouveau contenant en présence de milieu neuf, afin de garder les cellules en phase active de développement. L'ATCC recommande de ne pas utiliser les cellules après 18 passages, mais une étude de [Taciak et al. \(2018\)](#) suggère que les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des RAW264.7 resteraient stables entre les passages 10 et 30. Dans ce travail, la limite maximum d'utilisation des lignées de RAW264.7 a été fixée à 20 passages.

L'infection des RAW264.7 par les MNV-1 induit l'apparition d'effets cytopathiques (ECP) et la lyse des cellules *in fine*.

### *MM.1.1.2. Culture des cellules hôtes*

La culture de macrophages RAW264.7 est réalisée en flacon de culture avec bouchon à filtre. La relance d'une culture congelée à -80°C s'effectue par ajout de 1 mL de culture préalablement décongelée dans 5 mL de milieu nutritif Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal et 1 % d'antibiotiques (Ampicilline/Streptomycine) dans un flacon T25. Le flacon est ensuite incubé à 37°C dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 5h, le temps de permettre aux cellules viables d'adhérer au fond de la flasque. Après cette première incubation, l'adhérence des macrophages est vérifiée par microscopie inversée, et le milieu est retiré afin d'éliminer les débris, les cellules non viables, ainsi que le cryoconservateur (DMSO). 5 mL de milieu frais sont ajoutés et la culture est mise en incubation à 37°C. Elle correspond au passage 0. De nouveaux passages sont réalisés lorsque la culture atteint environ 90% de confluence. Pour ce faire, le milieu appauvri est remplacé par du milieu frais, puis les cellules sont détachées du support à l'aide d'un grattoir. Un nouveau flacon contenant du DMEM + 5% de sérum de veau fœtal + 1 % d'antibiotiques, est alorsensemencé avec 1 mL de la précédente culture et incubé à 37°C.

Le comptage des macrophages est réalisé en mélangeant les cellules détachées avec du bleu de trypan dans le rapport 1 : 1. 10 µL sont ensuite montés entre lame (lame quadrillée) et lamelle. Après 1 minute, pour permettre la sédimentation, les cellules « blanches » (correspondant aux cellules viables) sont dénombrées sur un minimum de 10 carreaux. La concentration cellulaire est alors calculée selon la formule suivante :

$$\text{Concentration (cellules / mL)} = (\text{Quantité de cellules / nombre de carreaux comptés}) \times 100 \times 1\,000 \times 2$$

Des suspensions stock, sous forme d'aliquots de 1 mL, sont préparées par ajout de 10% de DMSO et stockées à -80°C.

### *MM.1.1.3. Culture des virus*

La propagation des MNV se fait par ensemencement d'une culture de macrophages RAW 264.7 à 90 % de confluence. Dans la pratique, le milieu de culture des RAW 264.7 est éliminé, et un petit volume d'une suspension de MNV dans du DMEM, à une MOI (multiplicité d'infection) de 0.01 minimum, est mis en contact avec le tapis cellulaire. Après une incubation de 2h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu de culture est changé. La culture est alors incubée à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à la lyse d'environ 90% des cellules. Pour cela, elle est vérifiée régulièrement, après les premières 24 h de culture, par observation au microscope inversé. Le milieu est ensuite transféré dans des tubes pour être centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 5 000 g, deux fois, afin d'éliminer les cellules entières et les plus gros débris. Une filtration sur

membrane de porosité 0.22 µm et à faible liaison protéique, permet d'éliminer les débris plus fins.

Des suspensions stock, sous forme d'aliqots de 1 mL, sont préparées à partir des filtrats obtenus, et stockées à -80°C.

#### *MM.1.1.4. Détermination du titre infectieux*

Le titre infectieux des MNV a été déterminé selon le principe de la dilution limite. Elle correspond ici à la mesure de la TCID<sub>50</sub>, traduisant la dose infectieuse à laquelle 50% des cultures cellulaires subissent des effets cytopathiques (leur lyse dans notre cas).

Une plaque 96 puits estensemencée par une culture de RAW264.7 en milieu DMEM, afin d'obtenir un tapis cellulaire de 90% de confluence. Des dilutions en cascade de la culture stock, allant de 1<sup>E</sup>01 à 1<sup>E</sup>-10, sont déposées dans les puits, à raison de 8 puits/dilution. Les 16 puits restants sont dédiés aux contrôles négatifs (culture + PBS 1X) et positifs (culture + suspension virale en concentration connue) de l'infection. Les plaques sont alors placées dans un incubateur à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> à 37°C pendant 24-48h. Le milieu est ensuite retiré des puits et remplacé par une solution de cristal violet à 0.1%. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, la solution de cristal violet est éliminée, et les puits sont rincés à deux reprises au PBS 1X. Les puits positifs (transparents), c'est-à-dire ceux dans lequel les cellules ont été lysées, sont dénombrés, et le titre viral est estimé par la méthode de Spearman-Kärber (Hierholzer et Killington, 1996).

### MM.1.2. MS2

#### *MM.1.2.1. Souche virale et cellule hôte*

Le **MS2** (ATCC 15597-B1) est un coliphage male-spécifique (F+) de la famille des *Leviviridae*. Il est utilisé dans cette étude comme modèle des virus entériques humains, notamment dans les expériences portant sur l'effet des différents traitements d'une STEP sur l'infectivité des charges virales. Les souches de MS2 proviennent des collections de cultures microbiologiques de l'Institut Leibniz DSMZ (Allemagne). La bactérie utilisée pour la propagation des MS2 et les essais d'infectivité est *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers (ATCC 700891). Cette souche bactérienne HS(pFamp)R contient un plasmide codant pour les pili sexuels ou F-pili (site de reconnaissance spécifique) et possède une résistance à l'ampicilline et la streptomycine (Debartolomeis et Cabelli, 1991). Elle a été fournie par le laboratoire Abiolab.

### MM.1.2.2. Culture des cellules hôtes

Les cultures stock de cellules hôtes des MS2, servant à la production de nouveaux stock viraux ainsi qu'aux essais d'infectivité, sont réalisées dans 30 mL milieu nutritif liquide (tryptone 1%, NaCl 1%, extrait de levure 0.5%, pH7) supplémenté avec 1% d'antibiotiques et ensemencés par 100 µL de suspension stock d'*E. coli*. Les bactéries sont cultivées à 37°C sous agitation (60 rpm) jusqu'à atteindre leur phase exponentielle de croissance, se traduisant par une DO<sub>600nm</sub> comprise entre 0.3 et 0.5. Des suspensions stocks, sous forme d'aliquots de 1 mL, sont préparées en ajoutant du glycérol à une concentration de 30 % (v/v), pour être stockés à -80°C

### MM.1.2.3. Culture des virus

La culture sur gélose des MS2 sur *E. coli* a été réalisée selon la technique de la double couche d'agar, d'après une version adaptée de la méthode EPA-1601 ([US EPA-1601](#)).

Une première couche de gélose nutritive contenant de l'agar à 1.5% (tryptone 1%, NaCl 1%, extrait de levure 0.5%, agar 1.5%, pH7) est coulée dans une boîte de Petri en conditions stériles. La deuxième couche est constituée d'une solution de gélose nutritive à 0.5% d'agar maintenue sous forme liquide à 45°C dans laquelle sont ensemencée des *E. coli* en phase exponentielle de croissance, à raison de 10 µL de suspension/mL de gélose, ainsi que des phages MS2. Après homogénéisation, le mélange est coulé par-dessus la première couche de gélose et laissé à sécher pendant 20 minutes en conditions stériles. Les boîtes de Petri sont ensuite retournées afin d'éviter tout problème de condensation, et mises à incuber à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> 0.5% pendant 24 à 36h. La couche superficielle de gélose à 0.5% d'agar est ensuite récupérée et transférée dans un tube de centrifugation pour être centrifugée pendant 20 minutes à 10 000 g et 4°C. Le surnageant est filtré à l'aide d'une unité de filtration de porosité 0.22 µm, et le filtrat obtenu constitue la culture stock de MS2. 1 mL est utilisé pour la détermination du titre infectieux, tandis que le reste est stocké à -80°C.

### MM.1.2.4. Détermination du titre infectieux

La détermination du titre infectieux des bactériophages MS2 reprend le même principe que celui de la culture des stocks viraux sur double-couche d'agar, à quelques différences près :

- Des dilutions en cascade de la suspension virale dans du PBS 1X sont réalisées (pouvant aller de 1<sup>E</sup>01 à 1<sup>E</sup>-10 selon le type d'échantillon).
- La durée d'incubation doit être inférieure à 13h afin de pouvoir procéder au comptage des plages de lyse sans risquer la sous-estimation de leur nombre par superposition.

Le titre viral est alors calculé grâce à la formule suivante :

Titre viral (pfu/mL) = (nombre de plages de lyse x facteur de dilution) / volume de suspension

## MM.2. Protocole d'analyse des virus dans les eaux usées

### MM.2.1. Prétraitement des échantillons

Le prétraitement des échantillons suit le protocole développé dans le chapitre I de la partie Résultats.

Après une agitation manuelle de 10 L d'échantillon par retournement du flacon (3 fois), 400 mL sont transférés dans le bol d'un mixeur plongeant (CleverMixx MSM24500, BOSCH). Une solution de Tween20 à 0.002% (v/v) est ajoutée à l'échantillon afin de limiter les phénomènes d'adsorption des particules virales sur les parois des tubes utilisés dans l'analyse. Une suspension de MNV et/ou de MS2 à environ  $1^{e07}$  copies de génome/L est également ajoutée pour le contrôle interne de l'efficacité du protocole d'extraction et, par extension, pour l'évaluation du niveau d'inhibition. Un mixage de 2 x 30 secondes à 13 000 g est réalisé à l'aide du mixeur plongeant, afin de réduire la taille des agrégats et faciliter le pipetage. 25 mL d'échantillon prétraité sont alors prélevés et transférés dans un tube de centrifugation afin de procéder à l'étape d'extraction des particules virales

### MM.2.2. Extraction des virus

L'extraction des virus à partir de l'échantillon prétraité suit le protocole développé dans le chapitre I. Cette partie du protocole a été adaptée de la publication de [Prado et al. \(2014\)](#), lui-même inspiré d'un protocole initialement décrit par [Pina et al. \(1998\)](#).

Dans le détail, 15 mL de tampon d'élution (glycine 0.05 M, extrait de bœuf 3%, pH 9.6) sont ajoutés à l'échantillon. L'ensemble est vortexé 30 secondes avant d'être mis en incubation à 4°C pendant 20 minutes, sans agitation. 10 mL de PBS 2X sont ensuite ajoutés et la mixture est vortexée pendant 30 secondes, afin de neutraliser le pH. Après une centrifugation de 15 minutes à 4°C et 12 000 g, le surnageant est transféré dans un nouveau tube afin de poursuivre le protocole avec l'extraction des acides nucléiques.

### MM.2.3. Extraction, concentration et purification des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques viraux est réalisée selon le protocole eGENE Up (Biomérieux) à l'aide d'une pipette semi-automatisée Viaflo (Integra) et des réactifs d'extraction du kit NucliSENS (Biomérieux).

L'étape de lyse consiste à ajouter le tampon de lyse NucliSENS au surnageant récupéré à l'étape précédente dans un rapport 1:1, et de mettre l'ensemble à incuber pendant 30 minutes, à température ambiante et sous agitation rotative (30 rpm). Selon le volume de l'échantillon, 25 à 50 µL de billes de silice magnétiques sont alors ajoutés au mélange et mise en incubation 15 minutes de plus, toujours à température ambiante et sous agitation rotative (30 rpm). C'est à ce stade que les acides nucléiques qui ont été libérés de leur capsid, se fixent sur les billes. Les tubes sont ensuite centrifugés 3 minutes à 4°C et 12 000 g et le surnageant est éliminé. Les billes de silices sont remises en suspension dans 2 mL de tampon de lyse puis transférées dans une plaque deepwell. Les billes vont alors subir 5 lavages dans trois tampons d'extraction NucliSENS® (Biomérieux, France) avant d'être éluées dans 100 µL de tampon d'extraction n°3. Le décrochage des acides nucléiques à partir des billes de silice se produit durant une incubation de 5 minutes, à 65°C et 1 600 rpm dans un Thermomixer (Eppendorf, Allemagne). Un aimant est placé derrière la paroi du tube afin de retenir les billes pendant que l'éluat, dans lequel se trouvent maintenant les acides nucléiques, est transféré dans un nouveau. L'extrait ainsi constitué, est stocké à -80°C dans l'attente d'une analyse ultérieure.

### MM.2.4. Quantification des virus

#### *MM.2.4.1. Quantification moléculaire par RT-qPCR*

Dans cette étude, la quantification des virus repose sur :

- une région codant pour la protéine de la capsid pour le MNV ;
- une région codant pour la protéine de maturation pour le MS2 ;
- une région correspondant à la jonction entre l'ORF1 et l'ORF2 pour les NoV GI et NoV GII ;
- une région codant pour l'hexon pour les AdV.

La réaction de RT-qPCR est réalisée à l'aide du kit TaqMan Fast Virus One-Step Master Mix (Applied Biosystems™, Waltham, MA, USA) dans un volume réactionnel final de 20 µL. Le mélange réactionnel est constitué de 5 µL de matrice (extrait d'acides nucléiques), 5 µL de Master Mix et les volumes de sonde et d'amorces nécessaires à l'obtention des concentrations indiquées dans le Tableau MM-1.

La RT-qPCR est réalisée dans un LightCycler 480 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland), selon le phasage des températures suivant : 5 min à 50 °C (rétrotranscription), 5 min à 95 °C

(inactivation de la rétrotranscriptase et dénaturation initiale), suivi de 45 cycles de 20 sec à 95 °C (dénaturation) et 40 sec à 60 °C (élongation). La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle. Les résultats sont lus à partir du logiciel LightCycler® 480 V5.1 (Roche, Basel, Switzerland) La valeur de Cq est déterminée manuellement ou directement par l'appareil. Pour chaque cible, les valeurs sont comparées à une gamme étalon (pouvant aller de 1E01 à 1E10 copies de génome/L) afin de déterminer la concentration de l'échantillon. Les résultats de la quantification des acides nucléiques viraux sont généralement donnés par la médiane des répliques exprimée en copies de génome par litre. Les incertitudes sont calculées selon la formule de l'écart absolu médian (MAD). Des contrôles positifs (plasmide contenant la séquence cible, à une concentration donnée) et négatifs (eau ultrapure stérile) sont menés en parallèle pour la vérification du bon déroulement des réactions et la validation des résultats. Les caractéristiques qPCR pour les différentes cibles sont données dans le Tableau MM-2.

*Tableau MM-1. Séquences et concentrations des sondes et amorces utilisées dans notre étude, pour la quantification des virus. Y = T ou C, S = C ou G, R = A ou G, M = A ou C, {X} = base LNA ou acide nucléique verrouillé. Les amorces et sondes ciblant le MS2 sont tirées des publications de Pecson et al. 2009 et Carratalà et al. 2013, celles ciblant les AdV sont tirées de Prévost et al. 2015 et modifié par Tesson et al. (2019), les autres ont été désignées au sein du laboratoire Abiolab (séquence de référence GenBank : MNV = KF113527.1 ; NoV GI = KF039737.1 ; NoV GII = KF712510.1).*

Sondes et amorces	Séquences	Concentration finale (nM)
MNV-1_F5006	5' – TGGAACAATGGATGCTGA – 3'	400
MNV-1_R5078	5' – GAGTGATGGCGCAGC – 3'	800
MNV-1_P5028	5' – (Texas red) CCGCAGGAACGCTCAGCAGT (BHQ-2) – 3'	100
MS2_F0344	5' – AAGGTGCCTACAAGCGAAGT – 3'	1000
MS2_R0659	5' – GCTACCTTGCCCTAAACGAA – 3'	1000
MS2_P0369	5' – (FAM) ATCGTGGGGTGCCTCGTACG (BHQ1) – 3'	250
NoVGI_F5290	5' – CGYTGGATGCGSTTCAT – 3'	600
NoVGI_R5374	5' – AGATGGCGTCGAATGAC – 3'	600
NoVGI_P5334	5' – (FAM) CGA{T}CYCC{T}GTC{C}ACA (BHQ1) – 3'	300
NoVGII_F4986	5' – TTAYGTGCCMAGRCARGA – 3'	600
NoVGII_R5101	5' – GTCATTCGACGCCATCT – 3'	600
NoVGII_P5041	5' – (HEX) ACRTGGGAGGGCGATCGCA (BHQ3) – 3'	300
AdV_ABDEFG_F17676	5' – TACATGCAYATCGCCG – 3'	300
AdV_ABDEFG_R17727	5' – GGTGCARTTYGCCCG – 3'	900
AdV_ABDEFG_P17694	5' – (FAM) CAGGAYGCYTCGGARTAYCT (BHQ-1) – 3'	400

Tableau MM-2. Caractéristiques qPCR pour chaque cible.

Cible	Pente	Interception axe Y	Efficacité	R <sup>2</sup>
MNV	-3.3928	43.261	97%	0.9981
MS2	-3.3759	41.008	98%	0.9973
NoV GI	-3.3661	41.650	98%	0.9973
NoV GII	-3.4174	41.919	96%	0.9958
AdV	-3.1427	42.161	108%	0.990

#### MM.2.4.2. Quantification par lecture des plages de lyse

Dans les expériences portant sur l'infektivité du MS2, la concentration des échantillons d'eaux usées spikée est ajustée à environ +6 log par rapport à la concentration en virus autochtones. Les échantillons sont récupérés à la fin de l'étape d'extraction des virus, et leur quantification est effectuée selon le même principe que celui de la détermination du titre viral, par la méthode de la double couche d'agar décrite dans le paragraphe MM.1.2.4.

#### MM.2.5. Protocole retenu pour l'analyse des VEH dans les eaux usées

A la suite des différents essais réalisés, le protocole retenu pour l'échantillonnage et l'analyse des virus entériques dans les eaux usées et boues de station d'épuration est schématisé dans la Figure MM-1.

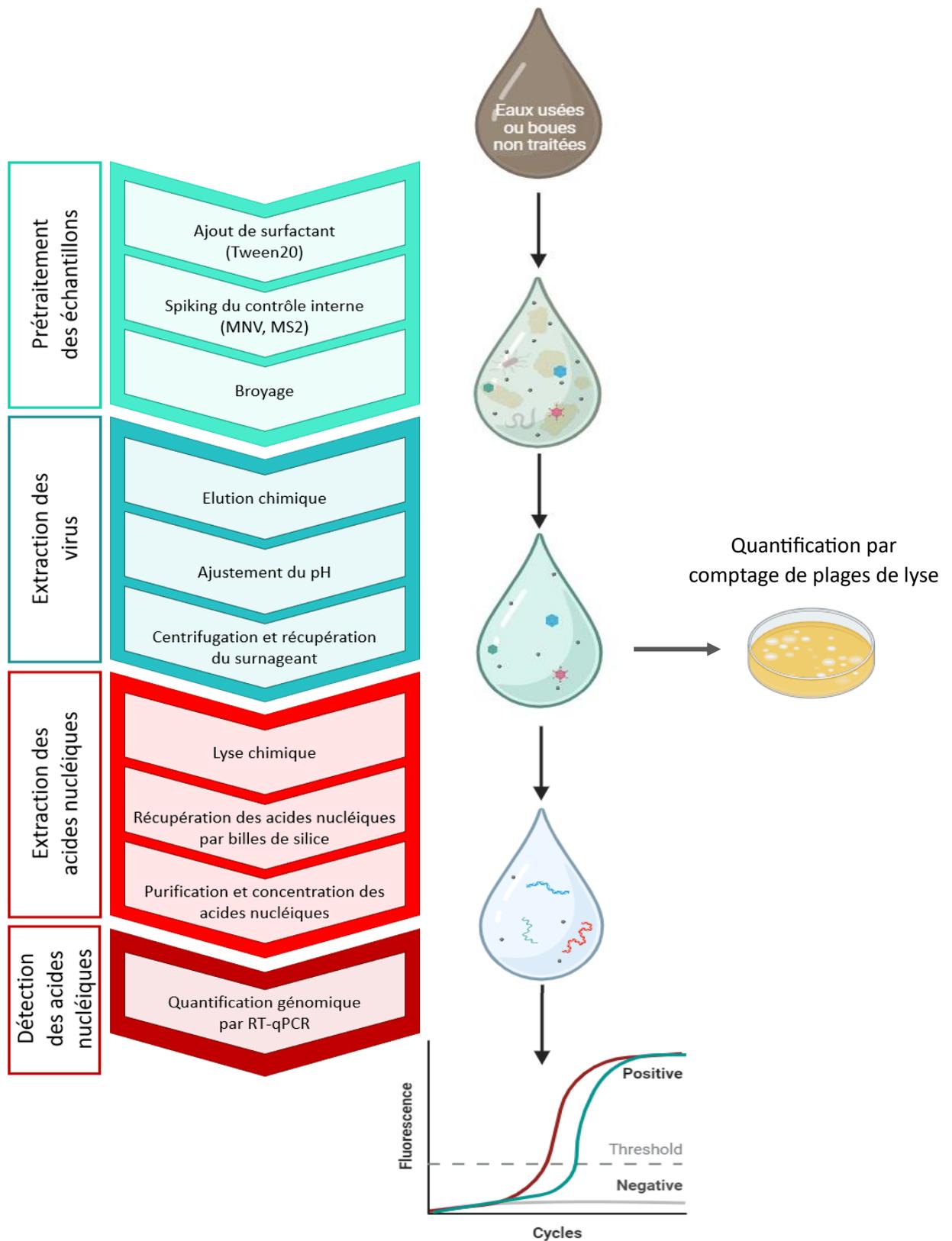


Figure MM-1. Protocole retenu pour l'analyse des virus dans les eaux usées de station d'épuration.

## MM.3. Etude de l'évolution des charges véhiculées par les eaux usées dans une station d'épuration, à l'exemple de l'UDEP Grand Chambéry

### MM.3.1. Campagne d'échantillonnage

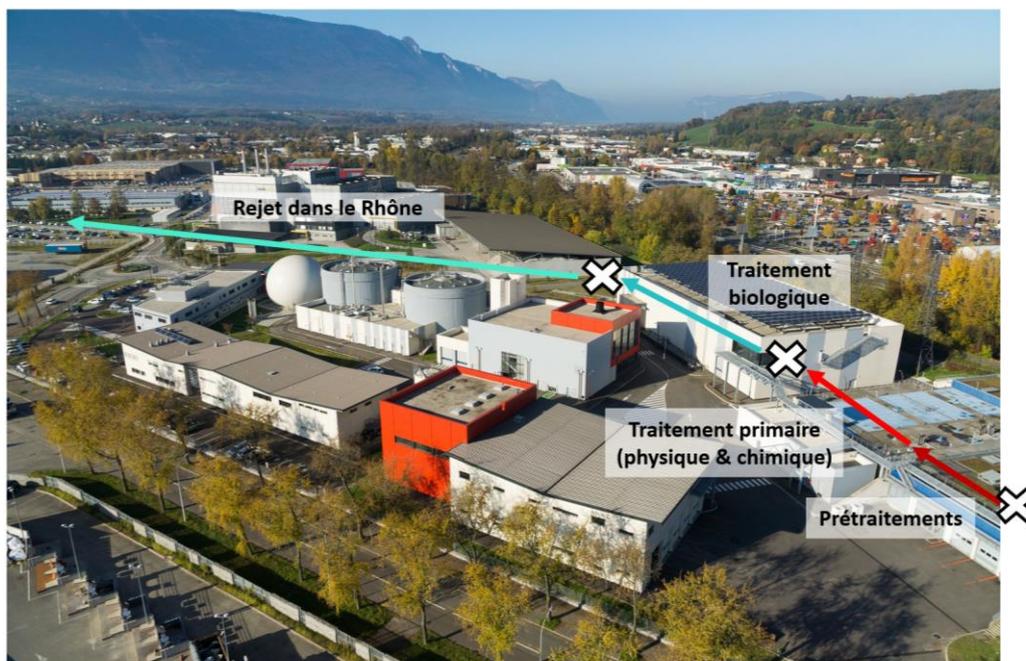


Figure MM-2. Vue aérienne de l'UDEP Grand Chambéry. Les croix représentent les sites d'échantillonnages au niveau desquels les charges en NoV GI, NoV GII et AdV ont été mesurées : entrée de station, entrée de réacteurs biologiques, sortie de station.

Une campagne d'échantillonnage a été réalisée durant 9 mois, de septembre 2022 à mai 2023, à trois niveaux du trajet des eaux usées dans l'UDEP Grand Chambéry : entrée de station, entrée des réacteurs biologiques, sortie de station (Figure MM-2). Au total, 51 analyses ont été effectuées durant cette période, réparties sur 17 dates et 3 prélèvements (1L d'eau/site d'échantillonnage).

### MM.3.2. Descripteurs analysés

Les résultats des analyses des MES, de la DCO et de la DBO, ainsi que les mesures de débit (à l'entrée de la station) et de température (à la sortie de la station) nous ont gracieusement été fournis par le laboratoire d'autosurveillance de l'UDEP Grand Chambéry.

### *MM.3.2.1. Charges virales*

Les mesure de la concentration des NoV GI, NoV GII et AdV ont été effectuées selon le protocole décrit précédemment (§ MM.2).

### *MM.3.2.2. DBO*

La DBO<sub>5</sub>, ou « Demande Biologique en Oxygène » est une mesure de la quantité d'oxygène dissous nécessaire aux microorganismes pour dégrader la matière organique d'un échantillon d'eau en 5 jours. Il s'agit de l'une des méthodes par lesquelles est évaluée la quantité de matière organique biodégradable d'un échantillon.

L'échantillon d'eau usées est mélangé à un tampon sulfate et de sulfate d'argent, puis une première mesure de la concentration en oxygène est réalisée à l'aide d'une sonde électrochimique. L'échantillon est ensuite incubé à 20°C et à l'obscurité pendant 5 jours, avant d'être de nouveau analysé. La valeur de la DBO<sub>5</sub>, exprimée en mg/L O<sub>2</sub>, est données par la différence entre les deux mesures.

### *MM.3.2.3. Demande Chimique en Oxygène*

La DCO, ou « Demande Chimique en oxygène » est une méthode d'analyse des matières organiques susceptibles d'être oxydées en présence d'un oxydant fort, à chaud et en milieu sulfurique. Elle conduit à une estimation de la quasi-totalité des matières organiques (certains hydrocarbures résistent à l'oxydation). C'est pourquoi ses valeurs (exprimées en mg/L d'O<sub>2</sub>) sont supérieures à celle de la DBO. Elle peut cependant être biaisée si l'eau analysée est chargée en composés inorganiques réduits (donneurs d'électrons), comme les sulfures mais aussi avec des concentrations en chlorures > 2g/L (interférences avec le catalyseur d'oxydation), deux situations qui peuvent être rencontrées dans les eaux usées.

L'analyse est réalisée à partir d'un mélange réactionnel composé de 10 mL d'échantillon et de 20 mL d'une solution contenant de l'acide sulfurique, du dichromate de potassium, du sulfate de mercure (complexation des chlorures) et du sulfate d'agent. L'échantillon est ensuite chauffé pendant 2h à 150°C.

La mesure finale est celle de la quantité de dichromate qui n'a pas été réduite par les matières organiques. Elle est faite par titrimétrie ou par colorimétrie.

#### *MM.3.2.4. Matières en suspension*

Les MES, (matières en suspension) font référence à la concentration des particules minérales et organiques, en suspension dans l'eau analysée et dont la taille est généralement supérieure à 1 µm. La mesure est réalisée par filtration de l'échantillon sur un filtre en fibre de verre de porosité 1.2 µm, préalablement lavé à l'eau ultrapure et séché. La concentration des matières en suspension, exprimée en mg/L, est calculée selon l'équation suivante :

$$C = 1000 \times (\text{masse du filtre avant filtration} - \text{masse du filtre après filtration}) / \text{volume de l'échantillon}$$

#### *MM.3.2.5. Débit et température*

Les mesures de débit à l'entrée de la station (exprimé en m<sup>3</sup>/h) sont effectuées par la mesure de la hauteur d'eau dans un canal venturi.

Celles de la température de l'eau à la sortie de station sont enregistrées en continu à l'aide de capteurs (thermistances).

### *MM.3.3. Analyses statistiques*

Les analyses statistiques réalisées au cours de cette étude ont été faites à l'aide de plusieurs logiciels : Microsoft Excel 2019, Minitab 21.1, Statistica (V 8.0, StatSoft).

Les données ont été traitées dans le cadre non paramétrique.

La plupart des interprétations sont basées sur une analyse graphique des résultats et sur la recherche de corrélation en considérant les descripteurs par pair.

Le caractère hautement multifactoriel des processus étudiés et la taille souvent restreinte des matrices dans lesquelles les résultats ont été résumés, nous ont incités à éviter les démarches simplificatrices qui auraient consisté par exemple, à la recherche de corrélations multiples.

## MM.4. Evaluation *in vitro*, des effets des traitements de station d'épuration sur les charges virales et l'infectivité

L'expression "charge virale de l'eau" utilisée tout au long du manuscrit fait référence aux seuls groupes viraux dont nous avons fait l'analyse (NoV GI, NoV GII le cas échéant, et AdV). Elle ne doit pas être comprise dans un sens plus général qui ferait allusion à l'ensemble des populations virales qui peuvent être trouvées dans les eaux usées. Nous considérons par ailleurs, que les résultats que nous avons obtenus à leur sujet ne doivent pas faire l'objet d'extrapolations à l'ensemble d'auquel chacun est attaché ou aux autres genres/espèces de VEH. Cette remarque pose la question de la mesure dans laquelle un virus est représentatif de son groupe vis-à-vis de l'impact des conditions environnementales auxquelles il est soumis, question qui ne faisait pas partie, elle non plus, des objectifs de ce travail.

Compte tenu de la nature des traitements appliqués aux eaux usées à l'UDEP Grand Chambéry, il en était attendu des effets globaux sur les populations virales, essentiellement déterminés par leur dimension, la géométrie de leur capsid, la composition chimique et la charge de leurs structures de surface. C'est la raison pour laquelle le critère du niveau de pathogénicité des virus n'a pas été retenu dans le choix des virus à analyser. Seul le caractère infectieux a été testé, en prenant pour exemple un bactériophage. Par ailleurs, les essais devaient être réalisés dans le cadre des contraintes liées au niveau de sécurité du laboratoire dans lequel le travail a été effectué (NSB2).

## MM.4.1. Traitements physiques et chimiques

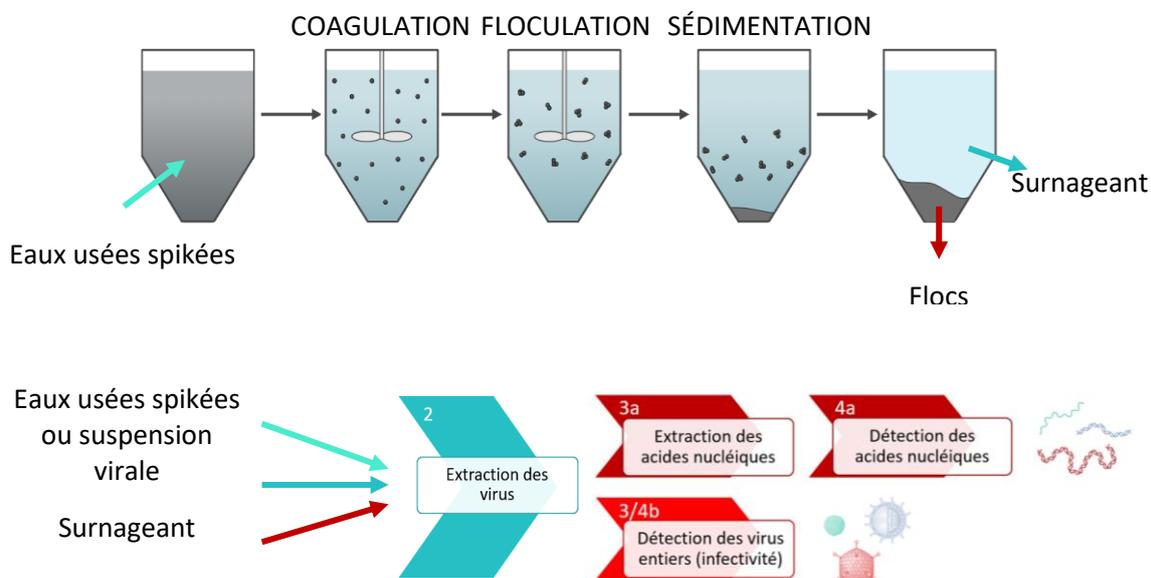


Figure MM-3. Design expérimental des expériences sur l'effet des polymères sur les charges virales en eaux usées

Les expériences portant sur l'évaluation de l'effet des traitements physique et chimique sur les charges virales en eaux usées (chapitre III) ont suivi le protocole schématisé dans la Figure MM-3. Après un prétraitement adapté au volume de l'échantillon (§ MM.2.1), 500 mL d'eaux usées sont transférés dans la cuve à fond pyramidal du jar-tester. Un coagulant (organique ou minéral) est dispersé dans l'échantillon par une agitation à 300 rpm pendant 1 minute, entraînant la formation de micro-agrégats. Le floculant est ensuite ajouté et une agitation plus douce, de 20 secondes à 100 rpm, est maintenue pendant laquelle des floccs plus denses, se forment. L'agitation est arrêtée pour permettre aux floccs de sédimenter (pendant 2 minutes). Ils sont récupérés et additionnés de 25 mL d'eau usée spikées non traitée et de 25 mL de surnageant avant d'être analysés selon le protocole décrit précédemment (§ MM.2.2). Les concentrations de polymères utilisées dans ces essais sont indiquées dans le Tableau MM-3. Dans le cas des flocculant cationiques, le protocole commence directement par l'étape de flocculation.

Tableau MM-3. Concentrations des différents polymères utilisés dans les expériences portant sur l'effet des polymères sur les charges virales en eaux usées

Polymère	Concentration (mg/L)
<b>Coagulants FL2949 ou FL4440</b>	30
<b>Coagulant FeCl<sub>3</sub></b>	12.5 à 300
<b>Floculant FO4490, FO 4190, AN934</b>	0.4
<b>Floculant PSD640</b>	4

## MM.4.2. Traitements biologiques

Les protocoles expérimentaux, décrits ci-après, ont été utilisés pour la réalisation des expériences sur l'effet des traitements biologiques sur les charges virales des eaux usées (chapitre IV). Afin de faciliter la lecture de ce chapitre, la représentation schématique de chacun des protocoles sera rappelée, au début de chaque d'expérience.

Des pilotes de laboratoire ont été utilisés dans les protocoles décrits dans les parties MM.4.2.1 et MM.4.2.2. Ces pilotes étaient composés de tubes de plexiglass (5 cm de diamètre, 50 cm de haut), remplis de pouzzolane colonisée par des biofilms provenant des biofiltres de l'UDEP Grand Chambéry et d'eau usée (environ 350 mL). La circulation de l'eau était assurée par une pompe péristaltique multi-têtes (modèle AU UV EZ, VWR).

### MM.4.2.1. Effet de l'âge des biofilms sur la rétention des charges virales

Dans cette première série d'expériences, le mode opératoire a été défini pour respecter au mieux, la vitesse de passage de l'eau dans les biofiltres de l'UDEP Grand Chambéry (Figure MM-4).

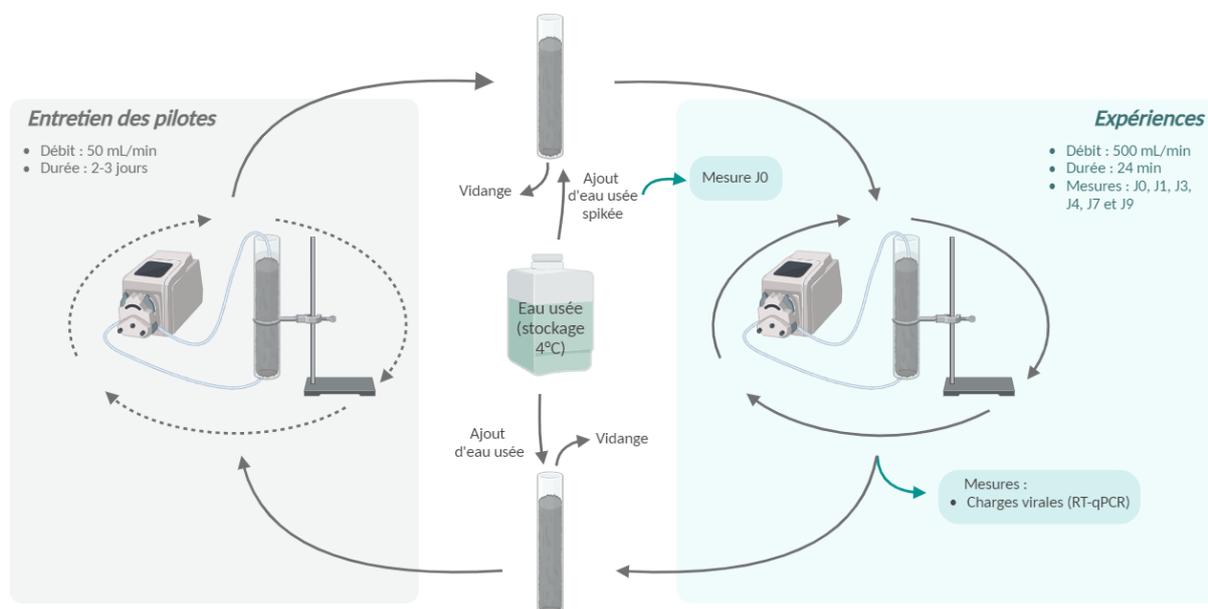


Figure MM-4. Protocole expérimental des expériences sur l'effet du temps de contact de l'eau avec les biofilms sur la rétention des charges virales

Les pilotes de laboratoire ont été remplis par un volume d'environ 350 mL d'eau usée spikée au MNV, à une concentration d'environ  $3^{E07}$  copies de génome/L. Le débit de l'eau circulante a été fixé à 500 mL/min à l'aide d'une pompe péristaltique. La durée de l'expérience était limitée aux 24 minutes qui correspondent, approximativement, au temps de contact de l'eau

avec les biofilms dans les biofiltres de l'UDEP. L'expérience a été répétée 6 fois sur une durée totale de 9 jours. Un renouvellement de l'eau était réalisé entre chaque expérience afin de maintenir les biofilms dans des conditions favorables à leur développement. La mesure des charges virales sur l'eau spikée non traitée, ainsi que sur l'eau récupérée après passage dans les pilotes, a été réalisée selon le protocole décrit précédemment (§ MM.2).

#### MM.4.2.2. Effet de la croissance du biofilm sur la rétention des virus

Cette partie concerne l'étude de l'effet de la croissance des biofilms sur la rétention des virus (Figure MM-5).

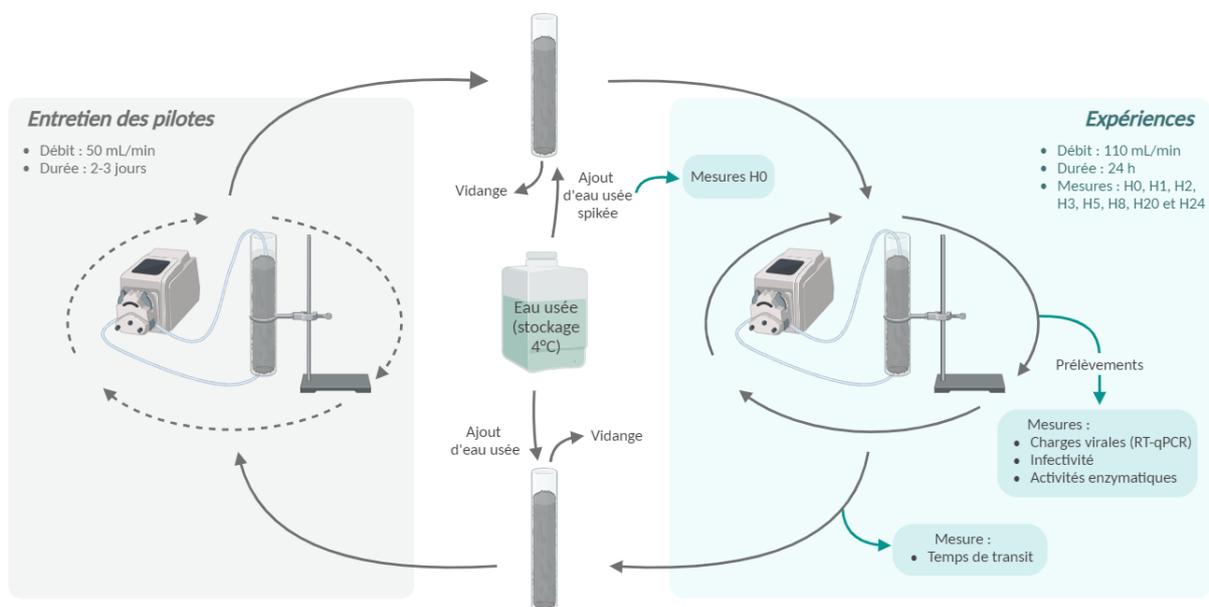


Figure MM-5. Protocole expérimental des expériences relatives à l'effet de la croissance du biofilm sur la rétention des virus

Une série de 6 expériences, chacune d'une durée de 24 h, a été conduite pendant 22 jours avec les pilotes de laboratoire, L'eau du circuit fermé des pilotes était renouvelée au début et à la fin de chaque expérience. Le volume d'eau dans chaque pilote est d'environ 350 mL. Le débit était réglé à 110 mL/min. Le spiking était réalisé, à partir d'une suspension de MNV dont la concentration (H0) était d'environ  $3^{E}07$  copies de génome/L. Les analyses suivantes étaient faites sur des prélèvements de 30 mL de l'eau du circuit, aux heures H1, H2, H3, H5, H8, H20, H24. Les prélèvements étaient utilisés pour la quantification de MNV par RT-qPCR, des tests d'infectivité et des mesures d'activités enzymatiques.

#### *MM.4.2.2.1. RT-qPCR et infectivité*

Les mesures des charges virales par RT-qPCR et les mesures d'infectivité ont été réalisées selon les protocoles décrits dans le paragraphe MM.2.4, à partir d'échantillons de 25 mL et de 1 mL, respectivement.

#### *MM.4.2.2.2. Activités enzymatiques*

La mesure de l'activité hydrolasique a été adaptée du protocole décrit par [Fontvieille et al. \(1992\)](#). Globalement, 0.1 mL d'une solution de diacétate de fluorescéine (4.8 mM) est ajouté à 1 mL d'échantillon, et le mélange est incubé pendant 30 minutes à 20°C. L'échantillon est ensuite centrifugé à 3 000 g pendant 5 min, et le surnageant est transféré dans une cuve de spectrophotométrie. L'absorbance de la solution est mesurée à 490 nm.

La mesure de l'activité phosphatasique a été adaptée d'un protocole décrit par [Anupama et al. \(2008\)](#). 1 mL d'échantillon, 4 mL de tampon Tris-HCl (pH 8.6) et 1 mL de para-nitrophenylphosphate (p-NPP) à 5 mM sont mélangés et mis en incubation pendant 1h à 37°C. A la fin de l'incubation, 1 mL de NaOH 1M est ajouté afin d'arrêter la réaction. L'échantillon est ensuite centrifugé à 3 000 g pendant 5 min, et le surnageant est transféré dans une cuve de spectrophotométrie. L'absorbance de la solution est mesurée à 405 nm.

Dans les deux cas, des blancs de lecture sont réalisés avec de l'eau ultrapure stérile en remplacement des échantillons d'eau usée.

#### *MM.4.2.2.3. Temps de transit*

La mesure du temps de transit a été réalisée par injection, à l'entrée des réacteurs, de 10 mL d'une solution de NaCl 0.1M. L'évolution au cours du temps, de la conductivité de l'eau à la sortie des réacteurs était suivie à l'aide d'un conductimètre.

La mesure était réalisée à la fin de chaque expérience afin de limiter l'impact de la solution saline sur les biofilms, juste avant le renouvellement de l'eau du circuit.

### MM.4.2.3. Mise en évidence, hors du contexte des biofiltres, de la contribution du vecteur biologique à la rétention des VEH

L'expérience a pour but de mettre en évidence le rôle du vecteur biologique dans la rétention des virus (Figure MM-6) :

- en l'isolant du contexte du remplissage des pilotes, où elle est en concurrence avec les processus physiques, tels que la filtration,
- par la comparaison d'une période pendant laquelle les activités biologiques des biofilms sont défavorisée (basse température et faible disponibilité de ressources trophiques) avec une période durant laquelle la température est plus grande et où un apport de nutriments a été fait.

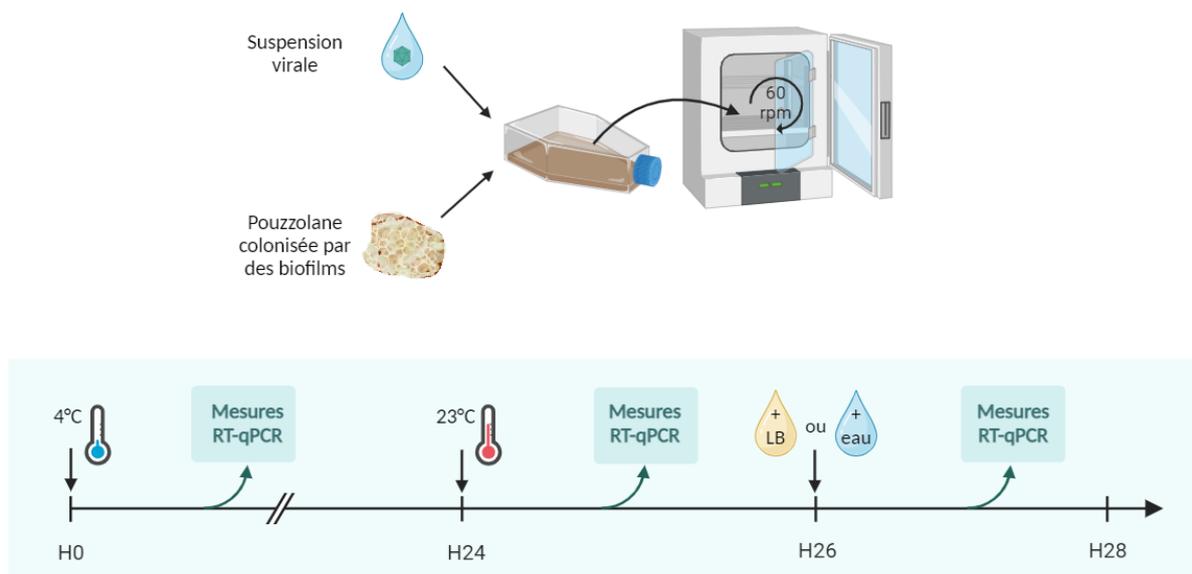


Figure MM-6. Protocole expérimental visant à mettre en évidence le rôle du vecteur biologique sur la rétention des VEH à l'exemple de grains de pouzzolane isolés du contexte des biofiltres.

30 mL de suspension de MNV et de MS2, à environ  $10^7$  de génome/L sont mis en contact avec 30 g de pouzzolane colonisée, étalée sur le fond d'un flacon T75 pour culture cellulaire. L'objectif de cette disposition est d'éliminer le colmatage en tant que facteur de rétention des virus. Le flacon est mis en incubation durant 24 h, à 4°C, sous agitation (60 rpm) et à l'abri de la lumière. Ces conditions ont pour but d'induire un ralentissement de l'activité biologique.

Après 24h d'incubation, la température de l'enceinte est montée à 23°C (température atteinte en 4 minutes). Dans un 3<sup>ème</sup> temps (H26), une partie des échantillons reçoit un apport trophique avec l'ajout de 10 mL de milieu nutritif (LB), l'autre étant maintenue dans un état de

déficit trophique avec l'ajout de 10 mL d'eau stérile. Le suivi des concentrations virales au cours du temps s'effectue par l'analyse par RT-qPCR, de prélèvements de 0.5 mL du milieu d'imbibition des grains de pouzzolane à H0.5, H1, H1.5, H2, H3, H5, H20, H24, H25, H26, H27 et H28. Les prélèvements sont traités selon le protocole décrit dans la section MM.2.3.

#### MM.4.2.4. Effet de l'enrobage de la pouzzolane par des biofilms sur la rétention des charges virales

L'objectif de l'essai est d'évaluer la participation respective des composantes minérales et organiques à la rétention des MNV et des MS2, à partir du modèle pouzzolane – biofilms (Figure MM-7).

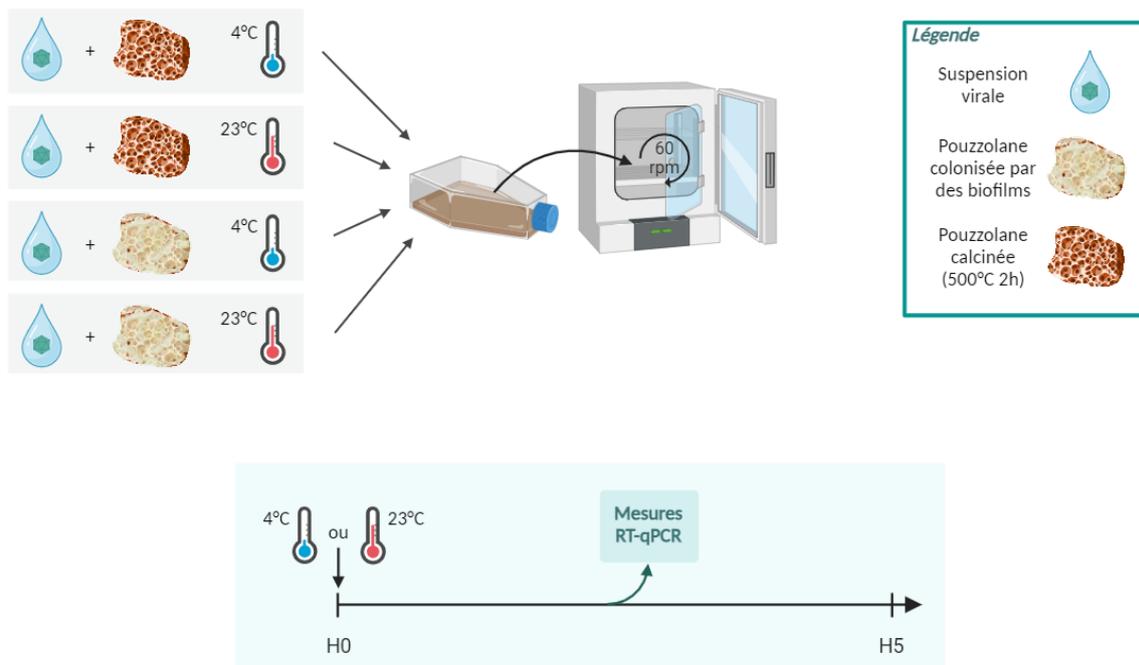


Figure MM-7. Protocole expérimental de l'essai sur la comparaison de la rétention des virus sur la pouzzolane calcinée et sur la pouzzolane colonisée par des biofilms.

Dans cette expérience, 4 conditions ont été testées :

- 1) Pouzzolane colonisée par des biofilms ;
- 2) Pouzzolane calcinée 2h à 550°C ;
- 3) Incubation à 4°C ;
- 4) Incubation à 23°C.

Globalement, 30 g de pouzzolane (colonisée ou calcinée) sont mis en contact avec 30 mL de suspension de MNV/MS2 à une concentration d'environ  $10^7$  copies de génome/L dans un

flacon de culture T75. Le flacon est ensuite mis en incubation à 4°C ou 23°C dans une enceinte thermostatée, sous agitation (60 rpm). Des prélèvements de 0.5 mL sont réalisés toutes les 30 minutes afin de suivre l'évolution de la cinétique de rétention des virus par la mesure de leur disparition dans le surnageant, au cours du temps (mesures RT-qPCR).

*MM.4.2.5. Effet de l'enrobage de la pouzzolane par de la matière organique (fraction < 1.2µm) sur la cinétique de rétention des virus*

Ces expériences, ont pour objectif d'évaluer la contribution de la charge organique associée à la pouzzolane à la rétention des virus.

Le protocole est subdivisé en deux étapes, celle du conditionnement de la pouzzolane et celle de sa mise en contact avec les suspensions virales (Figure MM-8).

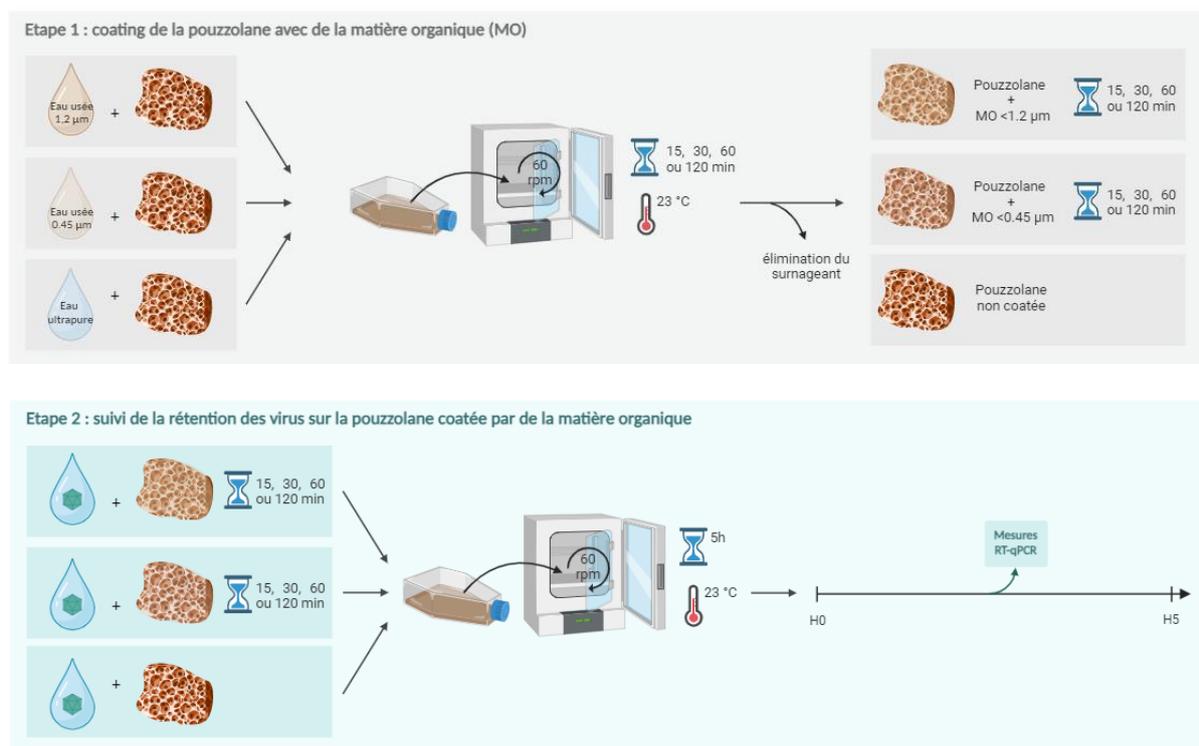
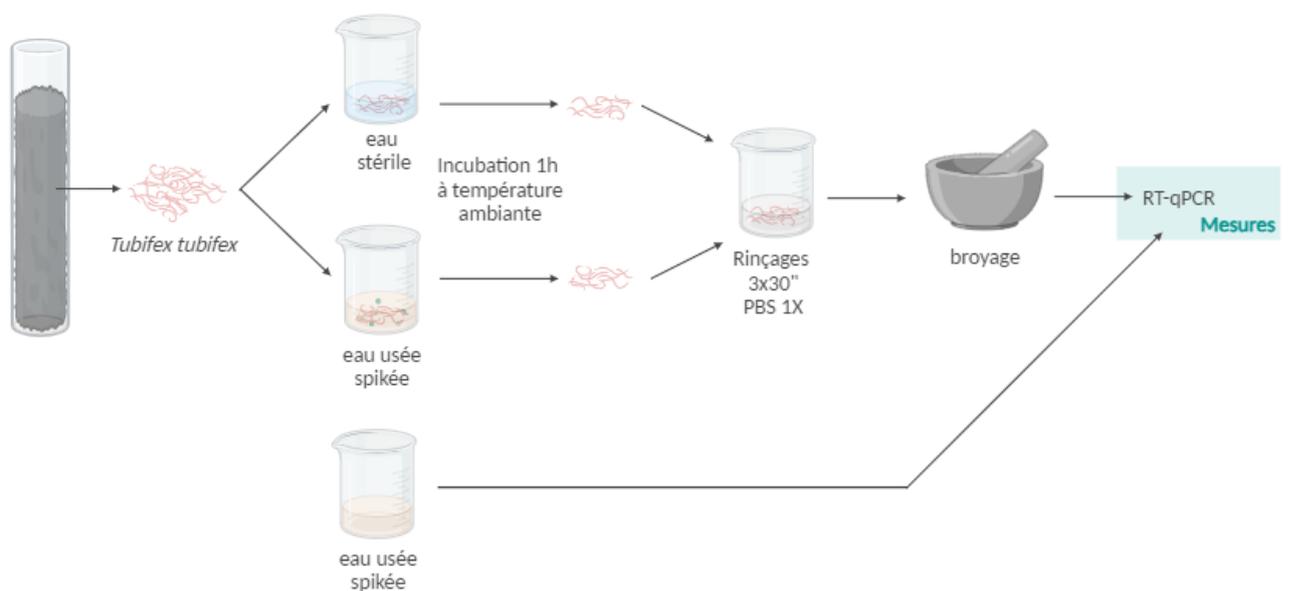


Figure MM-8. Design expérimental pour l'évaluation de l'effet de la matière organique dissoute sur la rétention des virus.

- 1) Dans la première étape, 30 g pouzzolane calcinée sont mis en incubation dans 30 mL d'eau usée filtrée sur membrane de porosité 0.45 µm ou 1.2 µm, pendant 15, 30, 60 ou 120 minutes, dans un flacon de culture T75, à 23°C, sous agitation (60 rpm) et à l'abri de la lumière. Un témoin négatif a également été réalisé par incubation de pouzzolane calcinée dans de l'eau ultrapure stérile. A la fin de cette étape, l'eau est éliminée.

- 2) Dans une seconde étape, la pouzzolane traitée est mise en incubation avec 30 mL de suspension virale de MNV et MS2 à environ  $10^7$  copies de génome/L pendant 5h dans les mêmes conditions que précédemment. Des prélèvements de 0.5 mL de milieu sont réalisés toutes les 30 minutes afin de suivre l'évolution de la cinétique de rétention des virus par mesure de leur disparition dans le surnageant, au cours du temps (mesures RT-qPCR).

*MM.4.2.6. Approche du rôle joué par les métazoaires : Evaluation de la rétention des virus par les vers *Tubifex tubifex* dans les biofilms d'eaux usées*



*Figure MM-9. Protocole expérimental pour la recherche des VEH dans le tube digestif des vers oligochètes *Tubifex tubifex*.*

Dans ces expériences, 35 individus d'une taille comprise entre 3 et 5 mm, ont été récupérés à partir de biofilms des biofiltres, et mis en contact avec 30 mL d'eaux usées spikées au MNV/MS2 à environ  $10^7$  copies de génome/L. Après une 1h d'incubation à température ambiante, les vers sont rincés dans 3 bacs de 30 mL de PBS 1X, pendant 30 secondes, avant d'être broyés (Figure MM-9). Le broyat est ensuite traité selon le protocole décrit précédemment (§ MM.2.3), avant d'être analysé par RT-qPCR. Deux contrôles sont conduits en parallèle, un contrôle négatif, avec 35 vers qui ont été incubés dans de l'eau stérile, et un contrôle négatif, constitué d'eau usée spikée sans vers.

En raison du faible nombre de vers récupérés dans les biofilms l'expérience n'a été réalisée qu'une seule fois en triplicat.

#### MM.4.2.7. Mise en évidence de site d'accrochage spécifique des norovirus (HBGA) dans les biofilms d'eaux usées par immunofluorescence

C'est à la recherche d'HBGA dans les biofilms d'eaux usées, qu'une série d'observations a été conduite à l'aide de l'équipement de microscopie confocale laser de la plateforme M4D de l'Institut de Biologie Structurale (IBS). Un immunomarquage fluorescent basé sur un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre un HBGA-A (Miura *et al.* 2013) a été appliqué à des échantillons de biofilm provenant des réacteurs biologiques ou du canal de sortie de l'UDEP Grand Chambéry.

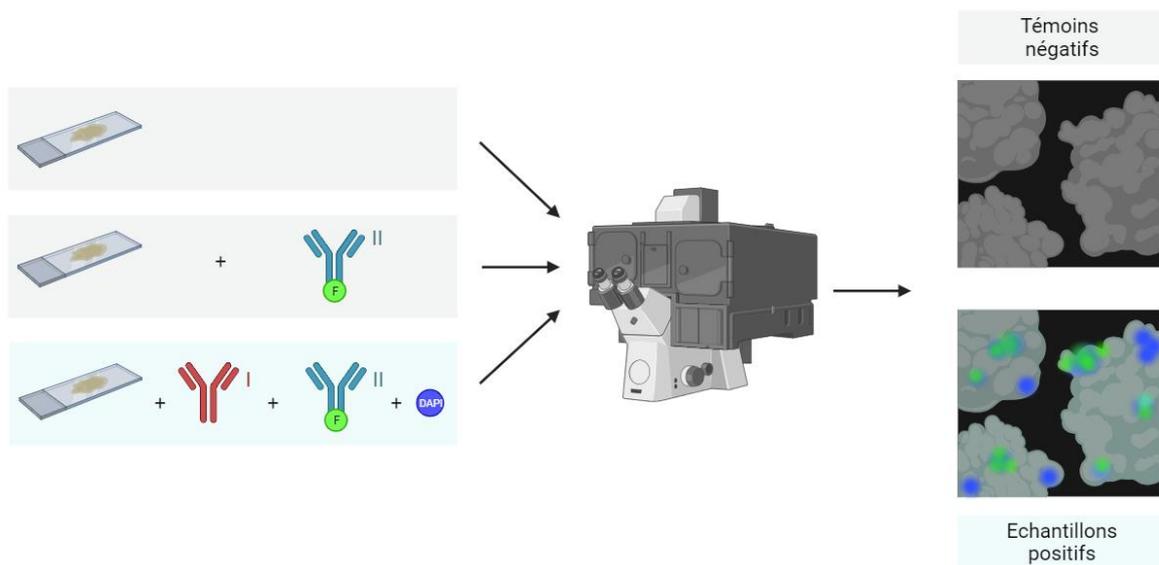


Figure MM-10. Protocole expérimental pour la visualisation par immunofluorescence d'HBGA-like dans les biofilms de station d'épuration.

Le marquage des biofilms est réalisé à température ambiante en conditions stériles (Figure MM-10). Après un prétraitement des échantillons (adapté du protocole décrit par Nosyk *et al.*, 2008), c'est un double marquage qui leur est appliqué, aux anticorps fluorescents (selon le protocole du fournisseur Santa Cruz Biotechnology, USA), d'une part et au DAPI (adapté de Kepner *et al.* 2016), d'autre part.

Le prétraitement consiste en une centrifugation d'un volume de 10 mL d'échantillon, à 6 000 g, pendant 8 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans un volume d'eau stérile équivalent au volume initial de l'échantillon. Ces étapes sont répétées 3 fois, puis 30  $\mu$ L de biofilms sont déposés sur une lame de microscopie et séchés pendant 60 minutes.

L'ajout sur l'échantillon de 100  $\mu$ L de réactif de blocage (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) permet de limiter les accrochages non spécifiques des anticorps. Après 30 minutes d'incubation, le réactif est éliminé et l'échantillon est rincé 3 x 5 minutes au PBS 1X. 50  $\mu$ L

d'anticorps monoclonaux de souris, spécifiquement dirigés contre les HBGA-A (sc-69951, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), à une concentration de 5 µg/mL, sont déposés sur l'échantillon. Il est mis à incuber pendant 60 minutes avant d'être à nouveau rincé 3 fois 5 minutes au PBS 1X. Dans un deuxième temps, 50 µL d'anticorps secondaires (ab150121, Abcam, UK), associés au fluorophore Alexa488, sont déposés sur l'échantillon à une concentration de 5 µg/mL. Après une incubation de 60 minutes à l'obscurité, l'échantillon est à nouveau rincé 3 fois 5 minutes au PBS 1X.

Le marquage au DAPI (Dominique Dutscher, France) débute par un traitement visant à perméabiliser les enveloppes des bactéries. Il est réalisé par l'ajout à l'échantillon de 100 µL de formaldéhyde 3.7%. Au bout d'1h, il est rincé pendant 5 minutes au PBS 1X, à 3 reprises. Il est enfin plongé dans 100 µL de solution à 0.4 µg/mL, pendant 7 minutes, puis rincé une dernière fois au PBS 1X (3 x 5 min) avant d'être monté entre lame et lamelle dans un milieu de montage (Anti-fade, Abcam, UK).

Les échantillons sont stockés à 4°C à l'obscurité jusqu'à leur observation. Les contrôles suivants ont été réalisés en parallèle afin de valider les résultats :

- Biofilms non marqués pour l'évaluation de l'auto-fluorescence
- Biofilms + anticorps secondaires pour l'évaluation des accrochages non spécifiques

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal spinning disk S-M4D de la plateforme M4D, et du logiciel Metamorph. Le traitement des images a été réalisé à l'aide du logiciel Imaris Viewer V9.6.0.

Une mesure du poids sec des biofilms a été réalisée en parallèle, pour pouvoir exprimer la concentration des virus en copies de génome/g de biofilms. 200 mL de chaque type d'échantillons ont été répartis dans des coupelles en aluminium et pesés à l'aide d'une balance de précision, avant d'être placés dans une étuve (Memmert, Allemagne) pour être séchés à 105°C, pendant 16h. Les échantillons sont placés dans un dessiccateur à température ambiante, pour leur refroidissement, avant d'être à nouveau pesés.

### MM.4.3. Séquençage par la technologie Next Generation Sequencing

L'objectif de cette partie du travail était de mettre en évidence d'éventuels changements de la diversité des populations de NoV GI, NoV GII et AdV à différents points du trajet des eaux usées dans la station d'épuration de Grand Chambéry. L'étude fait l'objet d'un paragraphe dans le chapitre III du manuscrit.

L'approche a été celle du séquençage d'amplicons ciblant des régions ultra variables codant pour des protéines de la capsidie des différents virus recherchés (Figure MM-11). Afin de limiter les coûts, les échantillons ont été indexés, c'est-à-dire qu'un « code-barre » a été ajouté aux

amplicons avant leur séquençage, pour permettre de rassembler les bibliothèques d'échantillons en une seule analyse (pool).

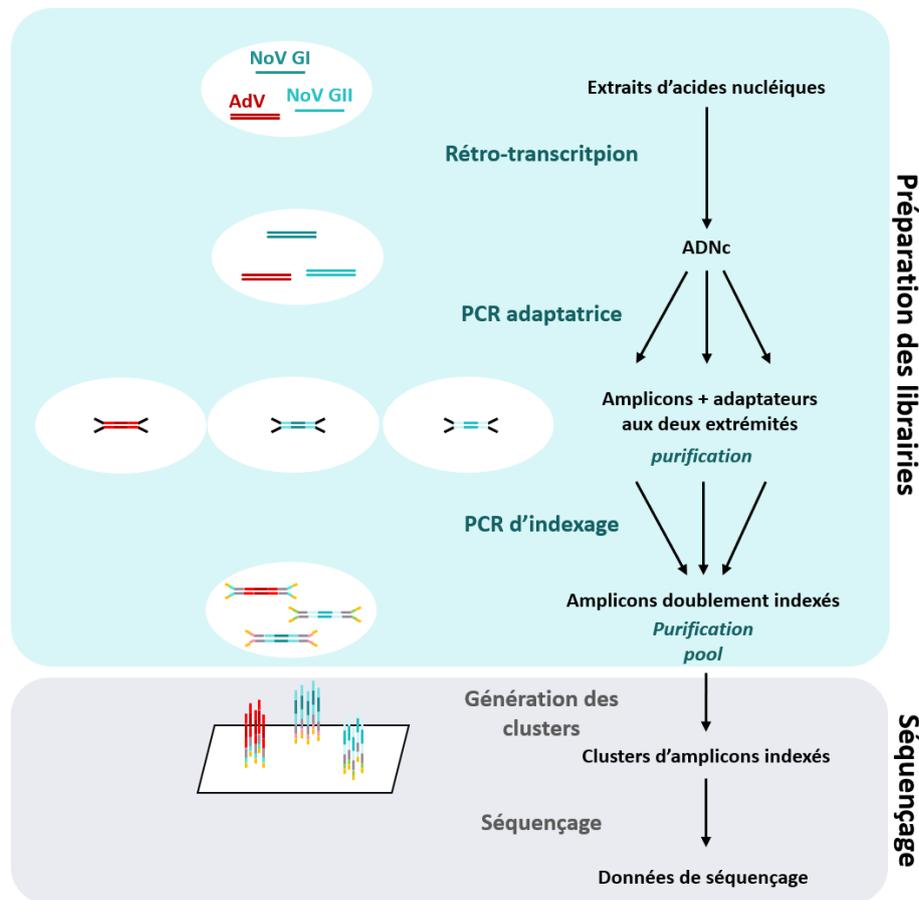


Figure MM-11. Principales étapes de la préparation des bibliothèques et du séquençage NGS par une approche de séquençage d'amplicons, sur séquenceur MiSeq Illumina.

#### MM.4.3.1. Préparation des bibliothèques et séquençage

La préparation des bibliothèques et leur séquençage suivent globalement 5 grandes étapes :

- 1) Rétro-transcription des ARNs en ADNc ;
- 2) PCR adaptatrice : amplification de la cible d'intérêt pour l'ajout de séquences adaptatrices des index en 5' et 3' ;
- 3) PCR d'indexage : amplification de la cible d'intérêt avec un couple d'index uniques en 5' et 3', permettant l'analyse de plusieurs bibliothèques en un seul séquençage ;
- 4) Normalisation, rassemblement en pool et dénaturation des bibliothèques ;
- 5) Séquençage.

Les extraits d'acides nucléiques obtenus à la suite du traitement décrit dans le paragraphe MM.2.3 sont tout d'abord passés sur colonne suppresseurs d'inhibiteurs (Zymo Research, CA,

USA). Une étape de **rétro-transcription** des ARNs en ADNc est ensuite réalisée en mélangeant 5 µL d'extrait et 4 µL de mix enzymatique Quantitect (Qiagen, Hilden, Allemagne) dans un volume final de 20 µL. La réaction de rétro-transcription se déroule dans un thermocycleur QIAmplifier 96 (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon le profil thermique suivant : 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 50°C, 5 min à 85°C.

Une première PCR (**PCR adaptatrice**) permet d'obtenir des amplicons de la séquence d'intérêt, flanqués en 5' et 3' d'adaptateurs dont les séquences sont indiquées dans le Tableau MM-5. Dans la pratique, 10 µL de produit de rétrotranscription ou d'extrait d'acides nucléiques sont ajoutés à un mélange réactionnel PCR composé de 25 µL de PCR Phusion High Fidelity (ThermoFisher Sci. MA, USA) et 800 nM d'amorces sens et anti-sens (Tableau MM-4), dans un volume final de 50 µL. La réaction de PCR s'effectue selon les paramètres suivants : 30 sec à 98°C, suivis de 30 cycles de 10 sec à 98°C, 30 sec à 55°C et 30 sec à 72°C, et se termine par une élongation finale de 2 min à 72°C. Les produits de PCR sont ensuite purifiés à l'aide de billes AmpureXP (Beckman Coulter, CA, USA) à une concentration de 0.8x afin d'éliminer une partie des amorces libres, dimères d'amorces et les séquences dont la taille ne correspond pas à celle attendue.

Une deuxième PCR (**PCR d'indexage**) est ensuite réalisée sur les amplicons obtenus à partir de l'étape précédente, afin leur ajouter les index uniques qui doivent permettre au logiciel de séquençage de réattribuer les séquences aux échantillons dont elles proviennent.

Les librairies sont finalement quantifiées à l'aide du kit NEBNextLibrary Quant Kit for Illumina (New England Biolabs, MA, USA), puis **normalisées** à 4 nM selon les recommandations d'Illumina avant d'être **réunies** dans un seul tube. Les librairies sont ensuite **dénaturées** par un ajout de NaOH 0.2M et diluées à une concentration de 20pM. Le **séquençage** est réalisé à l'aide d'un séquenceur MiSeq, et d'un kit de réactifs MiSeq Reagent v2, 500 cycles, dédié au séquençage d'amplicons de moins de 501 pb. Par ailleurs, des fragments de génome de bactériophage PhiX, à la concentration de 8 pM, sont ajoutés à la librairie en tant que contrôles, afin d'apporter de la diversité et favoriser le bon déroulement de l'analyse.

Tableau MM-4. Séquences et concentration des amorces utilisées pour l'évaluation de la diversité de trois VEH, dans les eaux usées, par séquençage NGS. Les amorces ciblant le NoV GII sont tirées de la publication de Abria et al. (2018), celles ciblant les AdV sont tirées de Allard et al. 2001, les autres ont été designées au sein du laboratoire Abiolab (Séquence consensus à partir des séquences de référence GenBank : AB028247.2, AB042808.1, KF039737.1, KT732279.1, KU253442.1, LC101825.1, LC122688.1).

Amorces	Séquences	Concentration finale (nM)	Taille amplicon	Région cible
NoVGI_F1	5' – GGYCGGTGTACYTTGATGG – 3'	400	484 pb	VP1
NoVGI_F2	5' – GGTRGGTGTACWATTGAYGG – 3'	400		
NoVGI_R	5' – CAGGACCTGGYATYTTTGACA – 3'	800		
NoVGII_F	5' – GTCAACATCTGCACCTTCAGA – 3'	800	450 pb	VP1
NoVGII_R	5' – TACCCRCTGCATCCGGGCAT – 3'	800		
AdV_hex1deg	5' – TACATGCAYATCGCCG – 3'	800	301 pb	hexon
AdV_hex2deg	5' – CGGGCRAAYTGCACC – 3'	800		

Tableau MM-5. Séquences adaptatrices pour l'ajout ultérieur d'index de séquençage.

Nom	Séquences
Adapteur read 1	5' – GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG – 3'
Adapteur read 2	5' – TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG – 3'

### MM.4.3.2. Difficultés rencontrées

#### MM.4.3.2.1. Dans la préparation des librairies

Le premier problème rencontré lors de la préparation des librairies était lié au choix que nous avons fait des réactifs. Plusieurs essais infructueux d'amplification par PCR, nous ont amené au constat que ces réactifs devaient être trop sensibles aux inhibiteurs de PCR issus des échantillons d'eaux usées. Les kits de rétro transcription et d'amplification PCR ont donc été respectivement remplacés par les kits RT SuperscriptIII VILO (Invitrogen, MA, USA) et HiFi Q5 (New England Biolabs).

La seconde difficulté a été celle du choix des amorces pour la cible AdV, choix initialement basé sur des publications utilisant le couple d'amorces proposé par Allard et al. (2001) pour étudier la diversité des adénovirus dans des échantillons environnementaux (Tong et Lu 2011, Ogorzaly et al. 2015, Hartmann et al. 2013). L'amplification faite avec ces amorces ne donnait

aucun résultat y compris pour le contrôle positif. L'alignement de leurs séquences avec une séquence consensus (fournie par le Dr. S. Wurtzer, Eau de Paris) a fait apparaître plusieurs discordances au niveau de l'amorce sens Hex1deg (présence d'une base « dégénérée »), et surtout au niveau de l'amorce anti-sens Hex2deg (Figure MM-12).

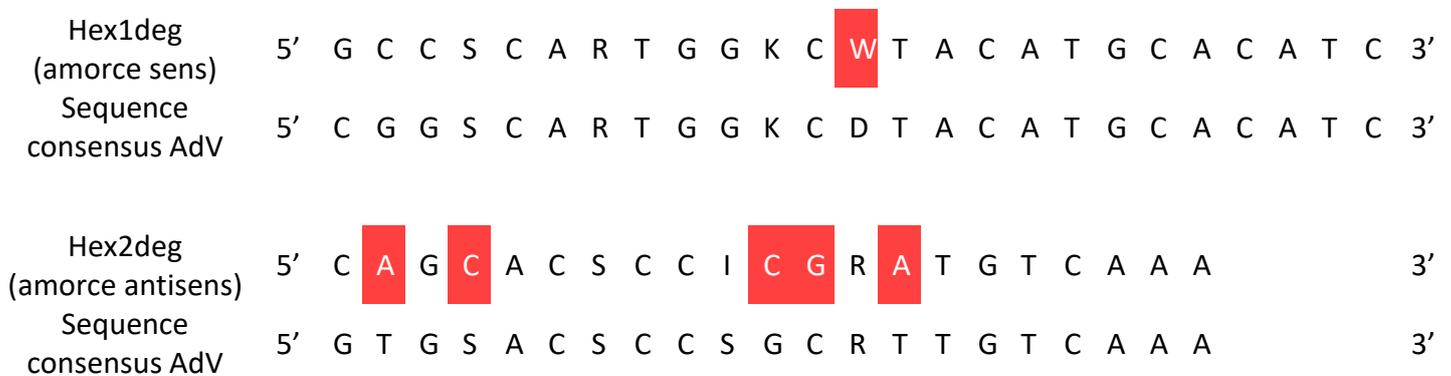


Figure MM-12. Alignement des amorces proposées par Allard et al. (2001) avec une séquence consensus des Adénovirus. Les bases inadaptées sont surlignées en rouge. A = adénine ; T = thymine ; G = guanine ; C = cytosine ; S = C ou G ; R = A ou G ; K = G ou T ; W = A ou T ; D = A, G ou T, I = inosine

Les amorces pour la cible AdV ont donc finalement été remplacées, avec succès (amplification vérifiée par migration sur gel agarose), par les suivantes :

- Amorce sens 5' – CARTGGKCDTACATGCACATC – 3'
- Amorce antisens 5' – TGSACSCCSGCRTTGTCAAAG – 3'

#### MM.4.3.2.2. Au niveau du séquençage

Le séquençage s'est achevé avec l'indication d'une sur-clusterisation des librairies et un score qualité (Phred Q30) d'analyse de 37.9% (seules 37.9% des bases assignées ont été affectées d'un score de qualité supérieur ou égale à 30). Une grande partie des reads a par ailleurs été classée comme « undefined », l'instrument n'ayant pas réussi à réassigner ces reads à l'échantillon correspondant.

Ces résultats semblent indiquer un problème lors de la quantification et/ou de la normalisation des échantillons indexés. La conséquence majeure d'une sur-clustérisation est la diminution de la qualité des reads obtenus, et donc la réduction de la quantité de données exploitables.

La qualité trop faible des reads obtenus n'a pas permis de poursuivre plus avant l'analyse pour les NoV GI et NoV GII. Seuls les résultats obtenus pour les AdV ont été interprétés, sous réserve des conséquences aux problèmes évoqués ci-dessus.

### MM.4.3.3. Analyse des résultats du séquençage

Deux stratégies ont été envisagées pour l'analyse des résultats :

- 1) Alignement des séquences par rapport à une séquence de référence puis recherche de motifs qui seraient mieux ou moins bien conservés entre les différents points d'échantillonnage de la STEP.
- 2) Assignment taxonomique (limité à l'espèce) puis évaluation des variations de la proportion des différents taxons de part et d'autre du traitement primaire, et du traitement biologique.

La première stratégie a été écartée au profit de la deuxième. Les données de séquençage pour la cible AdV ont été analysés à l'aide des plateformes GalaxyEU et GalaxyPasteur, dont l'accès en ligne est gratuit (<https://usegalaxy.eu/> et <https://galaxy.pasteur.fr/>). Les outils utilisés pour cette analyse sont présentés dans le Tableau MM-6.

Tableau MM-6. Outils informatiques utilisés pour l'analyse des données de séquençage

Outils	Fonction	Source
<b>fastp</b>	Nettoyage et élimination des séquences (« trimming »)	GalaxyEU
<b>FastQC</b>	Contrôle qualité	GalaxyPasteur (ou GalaxyEU)
<b>Pear</b>	Assemblage des reads	GalaxyPasteur(ou GalaxyEU)
<b>FASTQ to FASTA</b>	Conversion	GalaxyPasteur (ou GalaxyEU)
<b>Pasteur blastall for NGS data</b>	Alignement contre des bases de données	GalaxyPasteur
<b>Taxoptimizer</b>	Traduction des ID en entrées taxonomiques	GalaxyPasteur
<b>Count</b>	Comptage des occurrences	GalaxyPasteur (ou GalaxyEU)

Les valeurs de nombre de reads obtenus par échantillon ont été exploitées avec le calcul d'un indice de diversité (Shannon) qui tient compte à la fois des espèces identifiées (AdV-A à AdV-G) et de leurs abondances relatives.

L'indice ( $H'$ ) correspond à la formule suivante :

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$$



# Résultats



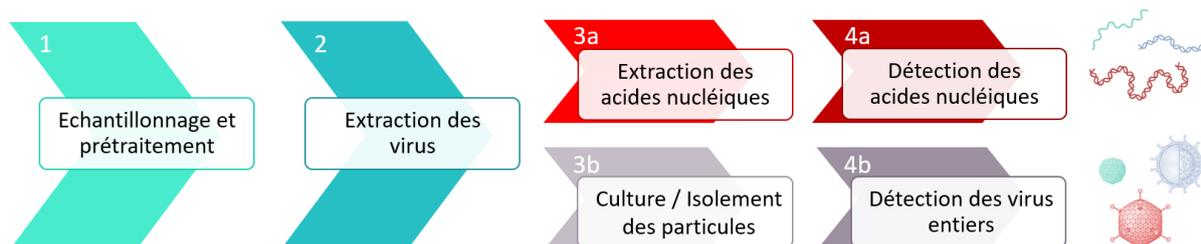
# Chapitre I

Le défi de l'analyse virale dans les eaux des stations d'épuration : pratiques courantes, pistes d'amélioration et approches innovantes

## Chapitre I – Le défi de l’analyse virale dans les eaux des stations d’épuration : pratiques courantes, pistes d’amélioration et approches innovantes

Le suivi régulier des VEH dans les STEP s revêt une importance capitale dans l’évaluation des processus de traitement des eaux usées et des risques sanitaires associés à la circulation de ces virus dans l’environnement hydrique urbain. A ce jour, il n’existe pas de méthode standardisée du fait de l’absence de consensus autour des méthodes actuelles conséquent à l’irrégularité de leurs performances (Corpuz *et al.* 2020, Kumblathan *et al.* 2021, Pulicharla *et al.* 2021). L’extraction et la détection des VEH dans les matrices de station d’épuration posent en effet de nombreuses difficultés. Leur diversité et les faibles titres viraux représentent un véritable défi analytique pour les chercheurs. De plus, la complexité et la variabilité des échantillons d’eaux usées et de boues, qui contiennent une large diversité de composants organiques et inorganiques, peuvent entraver la récupération efficace des virus.

Lorsque l’on regroupe les études traitant de ce sujet dans la littérature scientifique, le processus analytique peut globalement être résumé en 4 grandes étapes :



Plusieurs critères sont à prendre en compte dans le cahier des charges de la mise en place d’une méthode d’analyse :

- Sa sensibilité vis-à-vis de l’objet analysé (capacité à détecter de faibles quantités, qui, dans le cas des analyses moléculaires, est liée notamment à l’efficacité d’extraction (rendement) ;
- Sa sensibilité vis-à-vis des interférences qu’elle peut subir, en liaison avec la composition du milieu analysé (qui pourra nécessiter un prétraitement, par exemple) ;
- Sa spécificité (aptitude à identifier les virus cibles de manière spécifique, sans faux positifs) en liaison avec les caractéristiques des virus étudiés (type de génome, structure, taille, etc.) ;
- Le ratio coût-bénéfice en matériel et en temps d’analyse en liaison avec les moyens humains et matériels du type de laboratoires auxquels elle s’adresse.

La première partie de ce chapitre rapporte la mise en place, l'évaluation et les essais d'amélioration d'un protocole d'analyse des VEH dans les eaux usées et les boues de STEP, en accord avec les moyens disponibles au sein du laboratoire. Dans une deuxième partie, l'utilisation de matériaux adsorbants (charbon actif et chitosan) en tant que techniques innovantes pour la récupération des VEH dans les matrices hydriques est abordée.

## I.1. Adaptation et essais d'amélioration de méthodes d'extraction existantes

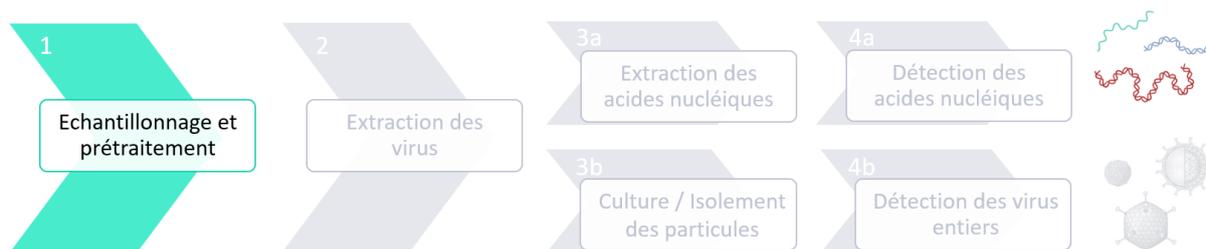
Dans cette étude, nous avons fait le choix de la détection des génomes viraux selon les protocoles de techniques de biologie moléculaire qui avaient été préalablement mis en place, dans le laboratoire (RT-qPCR).

Concernant les échantillons, deux stratégies s'offraient à nous : rechercher les acides nucléiques des virus dans les eaux usées au niveau des différents étapes des traitements, ou se concentrer sur les résidus produits par les traitements physico-chimiques (boues primaires) et par les traitements biologiques (boues biologiques).

Le principal intérêt de l'étude des boues réside dans la concentration des polluants (dont les virus), médiée par l'ajout de polymères ou le détassage des biofiltres. Mais cela implique également la concentration d'inhibiteurs de l'analyse moléculaire.

Travailler sur les eaux usées permet la comparaison des mesures de réduction des charges virales entre entrée – sortie des décanteurs lamellaires (traitements physiques et chimiques) – sortie des réacteurs biologiques (traitements biologiques). Les échantillons sont alors moins chargés en inhibiteurs que les boues, mais nécessitent l'utilisation de techniques plus sensibles ou l'ajout d'étapes de concentration des particules virales.

### 1.1.1. Prétraitement des échantillons



#### 1.1.1.1. Échantillonnage et stockage

La première étape, universelle à tout protocole analytique, est de définir une stratégie d'échantillonnage (technique d'échantillonnage, fréquence, point de prélèvement dans la géométrie du site, volume de prise d'essai...) adaptée au but recherché. Dans cette partie, nous ne traitons que de l'échantillon transporté au laboratoire pour son analyse. Après plusieurs essais préliminaires et en adaptant des protocoles décrits dans la littérature à nos objectifs ([Prado et al. 2014](#)), nous avons fait le choix de traiter des échantillons de 25 mL d'eaux usées ou de boue. Ce volume permettrait tout à la fois de quantifier nos différents virus, tout en minimisant les coûts en temps, réactifs et consommables. Une fois récolté, les échantillons sont stockés à 4°C et traités dans les 4 jours (sauf exceptions précisées dans les protocoles), afin de limiter l'impact des évolutions biologiques et chimiques, inhérentes à ce type d'échantillon, sur les analyses.

#### 1.1.1.2. Homogénéisation des échantillons

La présence d'agrégats dans les échantillons, et plus particulièrement dans les boues, rend difficile le prélèvement des échantillons par pipetage. En outre, nous avons raisonnablement émis l'hypothèse que les virus piégés dans ces amas demeureraient inaccessibles aux réactifs d'extraction, accentuant la sous-estimation des charges virales présentes dans ces échantillons. L'homogénéisation des échantillons doit donc inclure une diminution en taille et en nombre de ces amas, ce que ne permet pas la simple agitation (manuelle ou magnétique) des échantillons.

L'essai d'un broyeur à couteaux pour l'analyse d'échantillons environnementaux solides (Pulverisette 11, FRITSCH), n'a pas donné de résultats satisfaisants semble-t-il du fait, notamment, de la faible vitesse de rotation des lames (2 000 rpm). C'est finalement avec un

mixeur plongeant du commerce (CleverMixx MSM24500, BOSCH) que la meilleure homogénéisation a été obtenue.

Une fois les plus gros agrégats dispersés, des essais de micronisation des particules en suspension dans les eaux et les boues ont été conduits, par sonication (bain d'ultrasons, jusqu'à 90 minutes) ou cycles de congélation/décongélation (5 cycles, de -80°C/20°C). Cela n'ayant pas abouti à des modifications notables de la structure des agrégats encore présents, la micronisation n'a pas été retenue dans le protocole final.

### *1.1.1.3. Concentration des boues par dessiccation*

La siccité s'élève à 4% dans les boues primaires et 1% dans les boues biologiques. La dessiccation de ces matrices a été envisagée afin de réduire les volumes d'échantillon à traiter, permettant tout à la fois de concentrer les virus présents dans les boues, et de diminuer les volumes de réactifs d'extraction à utiliser. Dans ce but, les boues ont été placées dans une étuve à 105°C pendant 16h heures.

La suite des manipulations nécessitait que la matière solide obtenue à la suite de la dessiccation (Figure I-1) soit homogénéisée par broyage. Dans le cas des boues primaires, cette matière sèche et fibreuse à l'aspect « cartonné », (très certainement dû à l'ajout de polymère pendant l'étape de coagulation-floculation), a rendu le broyage impossible, que ce soit au mortier, au broyeur à billes ou au broyeur à couteaux. Des tests de dissolution de copeaux de ces boues ont été réalisés à l'aide de deux tampons de lyse de compositions différentes (§ 1.2) sans résultats probants après 24h et sous agitation. Concernant les boues biologiques, la dessiccation a permis d'obtenir une matière sèche facilement broyable au mortier. Ces boues ont alors pu être transformées en une poudre fine.



*Figure I-1. Boues primaires (gauche) et boues biologiques (droite) obtenues après dessiccation*

L'effet de cette technique de concentration sur la quantification des VEH par RT-qPCR reste à évaluer. L'extraction des acides nucléiques de virus a donc été poursuivie sur les copeaux de boues physico-chimique et la poudre fine de boues biologiques, sans qu'aucun des VEH recherchés (NoV GI et AdV dans ce cas) n'ait pu être détecté. Cette absence de résultats pourrait vraisemblablement être attribuée à l'insolubilité des échantillons qui serait à l'origine d'un problème d'accessibilité du tampon de lyse aux virus. On peut également supposer un effet délétère de la dessiccation sur l'intégrité du virus et de son génome.

La concentration des échantillons par dessiccation n'a donc finalement pas été retenue comme méthode de prétraitement dans le protocole final.

#### *1.1.1.4. Traitement des parois des tubes d'analyse contre l'adsorption des virus*

Au cours de plusieurs expériences, un problème de « disparition » au cours du temps d'une partie des virus dans les suspensions virales s'est présenté. Cette disparition était évaluée par RT-qPCR. Les paramètres suivants pouvaient être mis en cause pour expliquer le phénomène :

**La qualité des stocks viraux**, dont les acides nucléiques se dégraderaient suffisamment pour ne plus être amplifié, hypothèse peu probable du fait de la robustesse reconnue des virus non enveloppés (Seitz *et al.* 2011). D'autres expériences sur des stocks nouvellement produits de MNV ont été réalisées, conduisant aux mêmes résultats.

**La qualité des solutions et réactifs**. Le changement de lots de réactifs et la préparation de nouvelles solutions n'ayant pas permis de régler le problème, cette hypothèse a également été mise de côté.

**La qualité des consommables**. Richter *et al.* (2021), ont mis en évidence des phénomènes d'adsorption de phage T4 sur des surfaces de matériels de laboratoire, liés au caractère plus ou moins hydrophobe de ces derniers. Ces phénomènes dépendraient à la fois du type de matériaux (verre, polyéthylène, polypropylène, polystyrène) mais également des traitements additionnels que leur apportent les fabricants.

Ce problème, ancien, a donné lieu à la commercialisation de tubes traités pour limiter l'adsorption des protéines (dont sont constitués les capsides de VEH), à l'exemple de la gamme Protein LoBind® d'Eppendorf. Le coût de ces consommables (+50% en moyenne par rapport à des tubes non traités), et le nombre important d'échantillons à analyser, nous ont incité à nous tourner vers une alternative plus économique qui, en outre, ne dépend pas des aléas d'approvisionnements d'une seule marque. Dans la publication citée précédemment, Richter et ses collègues proposent deux méthodes pour limiter la rétention des phages, dont l'ajout de surfactant (Tween20) directement dans la suspension virale afin de diminuer la tension de

surface et créer une barrière chimique entre les phages et l'adsorbant. Nous avons testé cette méthode sur des suspensions de MNV, avec les résultats présentés dans la Figure I-2.

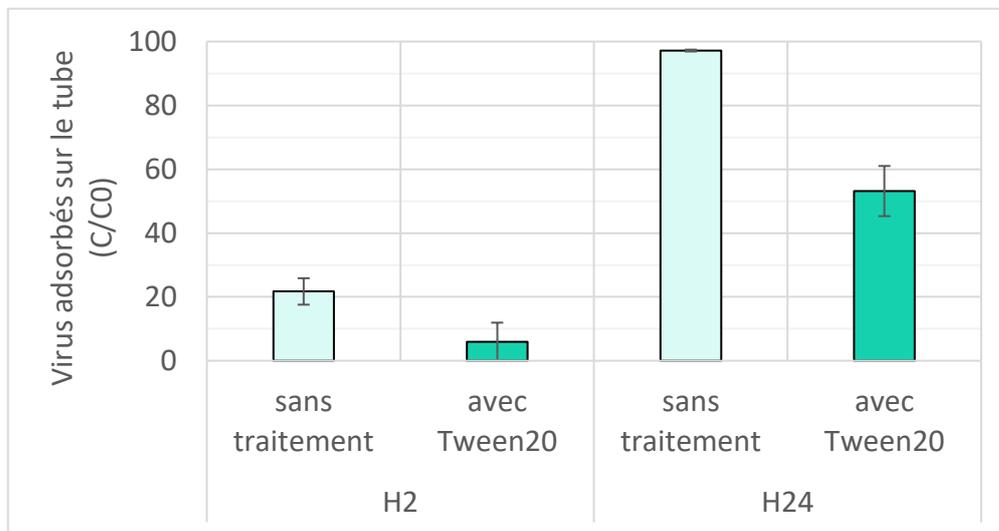


Figure I-2. Influence de l'ajout de tensioactif sur l'adsorption des virus sur les parois de tubes en polypropylène. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

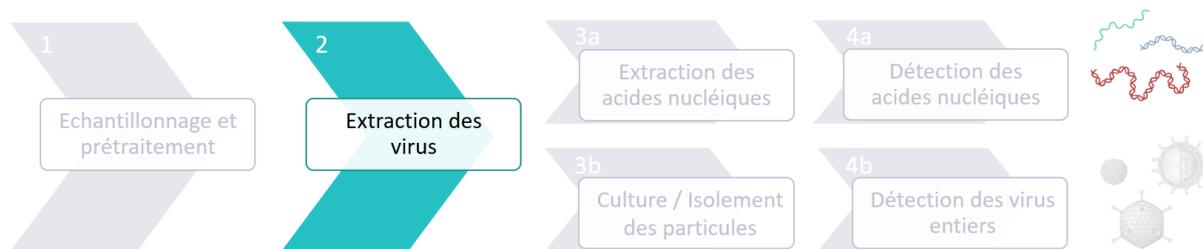
Après 2h d'incubation, on constate une diminution de  $22 \pm 6\%$  des virus dans la suspension non traitée, contre  $6 \pm 6\%$  dans celle traitée au Tween20. Cette diminution atteint même les  $97 \pm 0.3\%$  après 24h d'incubation, contre  $53 \pm 8\%$  dans les suspensions traitées au Tween20.

L'addition de Tween20 dans l'échantillon, avant spiking, a donc été retenue comme étape de prétraitement.

A ce stade de sa mise au point, le protocole d'analyse était donc le suivant :

- Agitation manuelle de 2-10 L d'eaux ou boues par retournement du flacon (3 fois)
- Dépôt de 400 mL dans le bol du mixeur
- Ajout de Tween20 à 0.5% (v/v)
- Ajout de MNV (spiking)
- Mixage de 2 x 30 secondes à 13 000 g à l'aide du mixeur plongeant
- Prélèvement de 25 mL et transfert dans des tubes stériles

## I.1.2. Extraction des virus



L'ajout direct de tampon de lyse dans l'échantillon homogénéisé par mixage, n'est pas envisageable car les billes de silices du kit d'extraction sont rapidement enrobées de matières organiques. De ce fait elles ne peuvent plus, toutes, être récupérées au contact d'un aimant placé contre la paroi du tube de l'étape intermédiaire.

L'essai d'une étape de centrifugation en amont de l'étape de lyse a montré une nette amélioration de la récupération des billes par aimantation, mais probablement au prix d'une perte importante des virus attachés aux particules qui constituaient le culot.

De nouveaux essais ont donc été réalisés dans lesquels une étape d'élution était intégrée, en amont de la centrifugation.

Parmi les protocoles disponibles dans la littérature, ceux décrits dans la publication de [Prado \*et al.\* \(2014\)](#) présentaient l'avantage de pouvoir être adaptés à nos moyens, et répondre à nos critères pour la mise en place d'un protocole analytique des VEH dans les boues et eaux usées. Deux nouvelles méthodes, dérivées de celles initialement développées par [Guzman \*et al.\* \(2007\)](#) et [Pina \*et al.\* \(1998\)](#) ont alors été confrontées afin de choisir celle qui devait intégrer notre protocole analytique (Figure I-3).

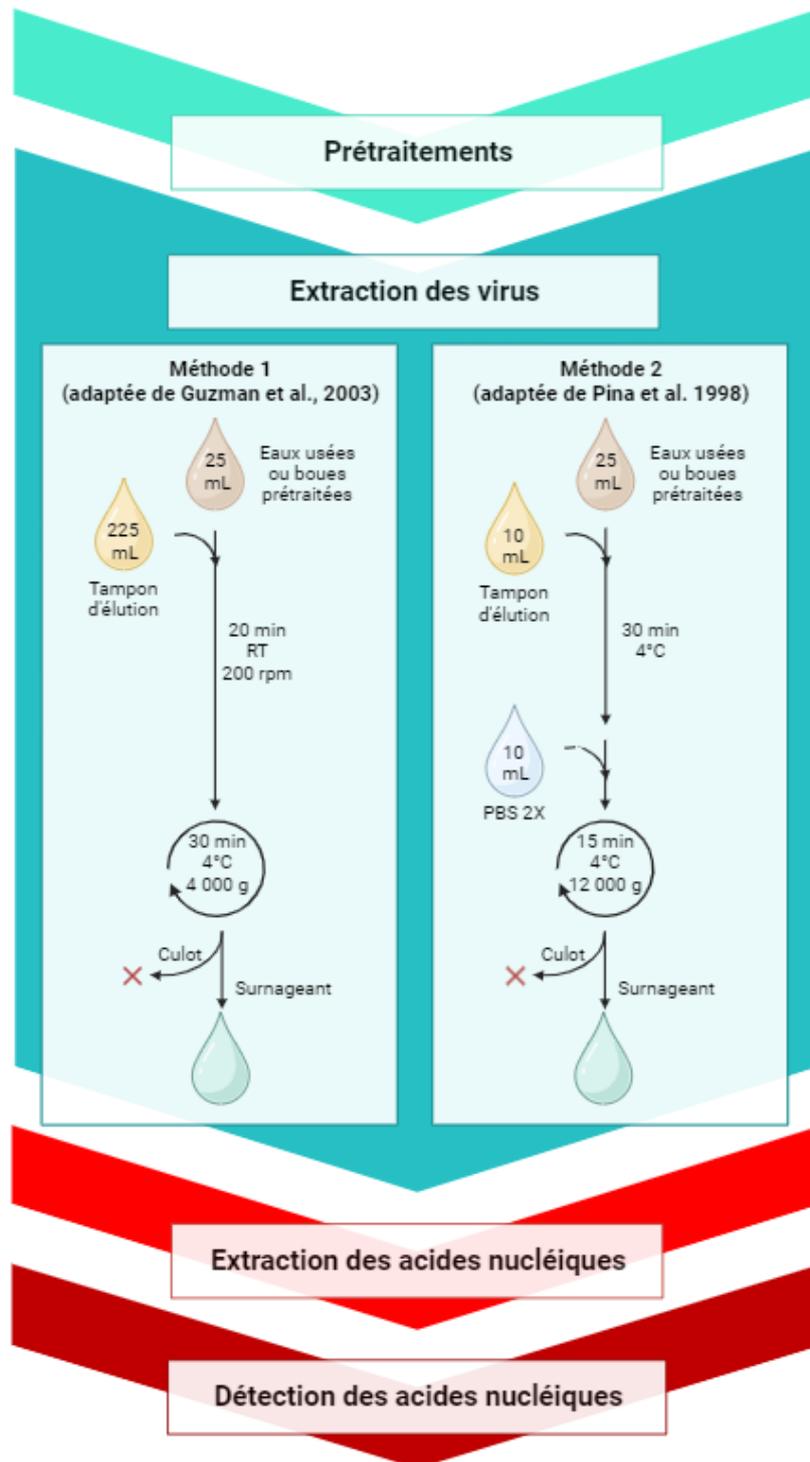


Figure I-3. Représentation schématique des méthodes testées pour l'extraction des VEH à partir de boues ou d'eaux usées. Tampon d'éluion = Glycine 50 mM + extrait de bœuf 3% pH9,6 ; Tampon de lyse = tampon commercial NucliSENS® ; PBS 2X pH7 ; RT = Room Temperature (20°C ± 2°C).

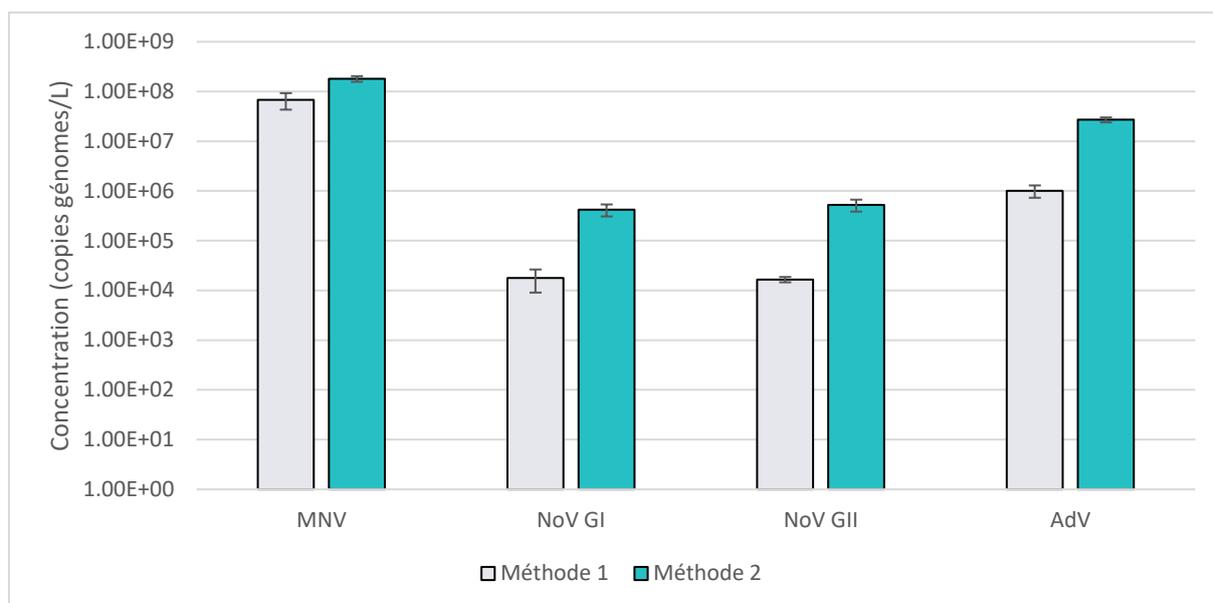
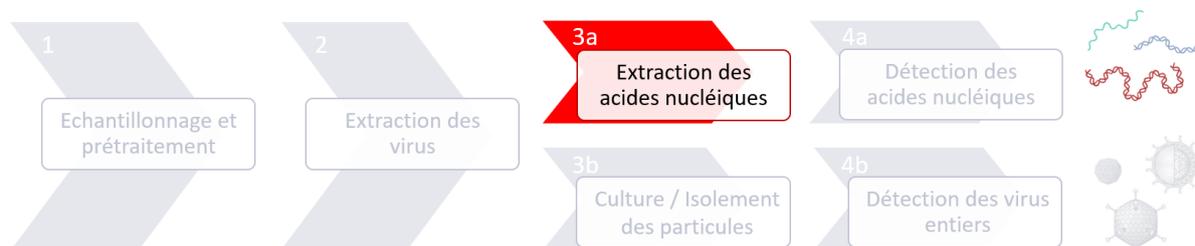


Figure I-4. Comparaison de deux méthodes d'extraction des virus à partir d'eaux usées et de boues. La méthode 1 est adaptée d'un protocole initialement décrit par Guzman et al. (2003), la méthode 2 est, elle, adaptée d'un protocole initialement décrit par Pina et al. (1998). Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Les résultats illustrés dans la Figure I-4 montrent que les valeurs de concentrations obtenues par la méthode 2 ont été plus élevées que celles obtenues par la méthode 1, quel que soit le virus. Par ailleurs, la différence a été plus accentuée dans le cas des virus autochtones, avec une augmentation de 1.4 à 1.5-logs avec la méthode 2 pour les NoV GI, NoV GII et AdV, contre 0.4-log pour les MNV. Le grand volume de tampon d'élution utilisé dans la méthode 1 pourrait être la principale explication de ces résultats. Au-delà de la dilution de l'échantillon, qui semble contre-intuitive dans un protocole d'extraction et de concentration des virus, l'extrait de bœuf présent dans le tampon d'élution est connu pour être un inhibiteur de PCR à travers certains des composés organiques qui entrent dans sa composition (Prata et al. 2012). L'augmentation du volume d'élution a pour conséquence l'augmentation du rapport entre la quantité de composés potentiellement inhibiteurs et la quantité de virus (et donc d'acides nucléiques). La vitesse de centrifugation utilisée dans la méthode 1 peut également avoir participé à l'explication des différences d'efficacité, en étant trop faible pour entraîner la sédimentation de certains inhibiteurs de qPCR.

La méthode 2 a donc été retenue dans l'étape d'extraction des virus de notre protocole analytique.

### I.1.3. Extraction des acides nucléiques



L'étape d'extraction des acides nucléiques est réalisée en suivant le protocole semi automatisé eGENE Up de Biomérieux, impliquant l'utilisation d'une pipette Viaflo (Integra), du programme d'extraction eGENE Up (Biomérieux) et des réactifs d'extraction NucliSENS (Biomérieux) associés.

Le protocole préconisé par le fabricant est décrit dans la section 2.3 du chapitre Matériels et Méthodes, mais peut être résumé comme suit :

- Lyse de l'échantillon
- Récupération des acides nucléiques par des billes de silices
- Purification des acides nucléiques dans trois tampons successifs
- Elution des acides nucléiques par décrochage des billes de silice

A la fin de ces étapes, un extrait concentré d'acides nucléiques est obtenu.

Ce protocole, est utilisé en routine à Abiolab dans de nombreux types d'analyses, et s'avère effectivement à la fois robuste et rapide. Du fait que les échantillons d'eaux usées n'apparaissent pas dans la liste des applications pour lesquelles ses concepteurs l'ont optimisé, il nous est apparu utile de tester l'effet d'une modification apportée au niveau de l'étape offrant la possibilité de le faire : l'étape de lyse.

Le tampon de lyse NucliSENS® (Biomérieux) a donc été comparé à un tampon dit "TENS", reconnu pour son efficacité dans de nombreuses publications. Les caractéristiques de ces tampons sont présentées dans le Tableau I-1.

La comparaison a été faite sur la base de résultats de quantification des virus autochtones (NoV GI, NoV GII et AdV) et du virus spiké (MNV) dans les échantillons d'eaux usées et de boues (Figure I-5).

Tableau I-1. Composition des tampons de lyse comparés dans cette étude.

Nom	Tampon « NucliSENS® » (Biomérieux)	Tampon «TENS » (fait maison)
<b>Composition</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Thiocyanate de guanidine (50%)</li> <li>- Triton X-100 (&lt; 2%)</li> <li>- EDTA (&lt;1%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris-HCl (0.05 M)</li> <li>- EDTA (0.002 M)</li> <li>- NaCl (0.05 M)</li> <li>- SDS (0.1%)</li> </ul>
<b>pH</b>	7.1	8.0

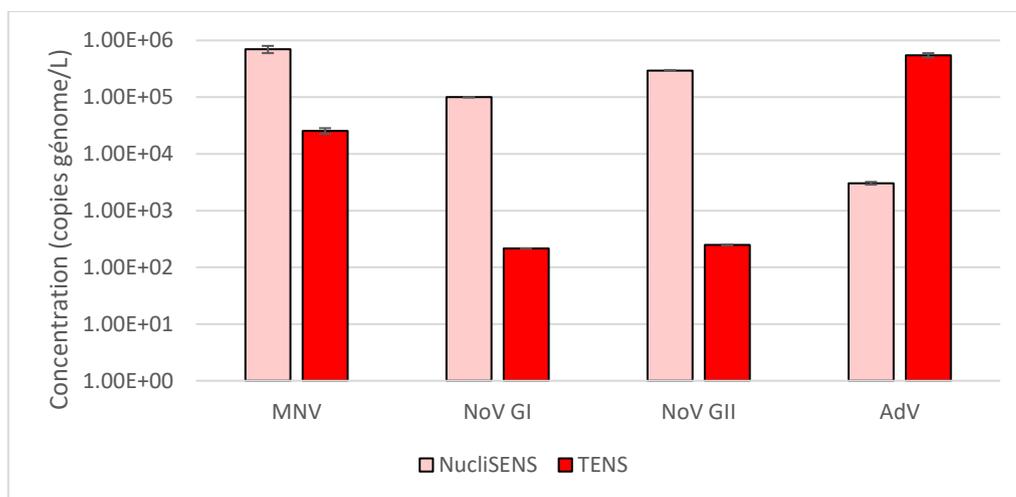


Figure I-5. Comparaison de l'efficacité de deux tampons de lyse sur la mesure de VEH par RT-qPCR. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 répliquats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

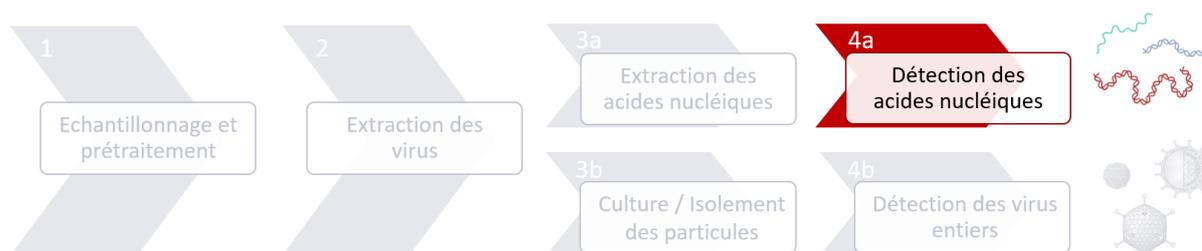
L'expérience a montré que le tampon commercial restait plus efficace sur les norovirus, en particulier sur les virus autochtones avec des quantités supérieures (+1,4 à 3,1 log<sub>10</sub>), à celles mesurées avec le tampon TENS. Ce dernier est apparu, plus efficace sur les adénovirus que le tampon commercial (+2.3 log<sub>10</sub>).

Ces résultats pourraient être liés à la nature des acides nucléiques de ces deux familles de virus, ARN pour les norovirus et ADN pour les adénovirus. Le thiocyanate de guanidine qui apparaît dans la composition du tampon NucliSENS® est couramment utilisé dans les procédés d'extraction d'ARN et d'ADN, notamment pour sa contribution à la dénaturation des RNAses et DNAses dans les opérations de lyse de cellules (Chirwing *et al.* 1979). La supériorité du tampon commercial pourrait donc être expliquée par la plus grande sensibilité des ARNs à l'ambiance chimique de l'échantillon, par comparaison aux ADNs, et par l'effet protecteur du thiocyanate de guanidine.

Outre ces résultats, le choix a été fait de garder le tampon commercial NucliSENS® comme tampon de lyse dans le protocole d'extraction final, pour les trois raisons suivantes :

- 1) Notre protocole doit présenter une bonne efficacité d'extraction à la fois des ARNs et des ADNs. Or, les ARNs se dégradent plus rapidement que les ADNs dans l'environnement ([Wood et al. 2019](#), [Marshall et al. 2021](#)), leurs rendements de récupération sont globalement plus faibles, en particulier dans des matrices aussi complexes que les boues et les eaux usées.
- 2) Les virus entériques sont majoritairement des virus à ARN.
- 3) Le contrôle du taux de récupération des virus entériques dans la technique de RT-qPCR se fait par dopage des échantillons au MNV, un virus à ARN.

#### I.1.4. Quantification génomique



Comme indiqué précédemment, la quantification des virus entériques humains dans les échantillons environnementaux au sein du laboratoire Abiolab se fait par (RT-)qPCR.

Des difficultés de quantification des NoV GI (absence de détection, variabilité importante entre les répliques) ont toutefois été rencontrée dans divers échantillons d'eau et de boues de station d'épuration. Ces difficultés nous ont incité à comparer le système d'amorces et de sondes qPCR que nous avons utilisé dans un 1<sup>er</sup> temps (désigné « ancien système » dans ce qui suit) à celui décrit par [Prévost et al. 2015](#) (« nouveau système »). Ce nouveau système cible également une région conservée codant pour la protéine VP1 de la capside des norovirus GI, avec toutefois un décalage de 11 nucléotides vers l'extrémité 3'.

Tableau I-2. Comparaison de deux systèmes de sonde-amorces pour leur efficacité dans la détection par RT-qPCR de NoV GI dans des échantillons d'eaux usées (n=105). Ancien = système designé à Abiolab ; Nouveau = système tiré de Prévost et al. (2015) et modifié par Tesson et al. (2019). Les analyses ont été réalisées simplex (seuls les NoV GI étaient recherchés) en duplicats de RT-qPCR et sur des échantillons en triplicats.

Systèmes qPCR NoV GI	Echantillons positifs	Meilleure quantification	Meilleure reproductibilité
<p><b>Ancien</b></p> <p>F5279 5'-CCATGTTCCGYTGGATG-3'</p> <p>R5372 5'-ATGATGATGGCGTCTAAGG-3'</p> <p>P5326 5'-GATCGCRATCTYCTGCCCGAATT-3'</p>	76/105	6/76	9/76
<p><b>Nouveau</b></p> <p>F5290 5'-CGYTGGATGCGSTTCCAT-3'</p> <p>R5374 5'-CTTAGACGCCATCATCATTTAC-3'</p> <p>P5334 5'-CGA{T}CYCC{T}GTC{C}ACA-3'</p>	102/105	70/76	67/76

Le test des deux systèmes de sonde - amorces NoV GI, a été réalisé sur 105 échantillons d'eaux usées, chacun évalué en triplicats. Le système pour lequel les valeurs de quantification obtenues étaient plus élevées a été considéré comme présentant une meilleure quantification. Le système pour lequel la déviation absolue de la médiane des répliques (MAD) était la plus faible a été considéré comme présentant une meilleure reproductibilité.

Le Tableau I-2 montre que les séquences virales ont été détectées dans près de 97% des échantillons avec le nouveau système, contre seulement dans 72% d'entre eux, avec l'ancien système. Considérant les échantillons détectés avec les deux systèmes (n=76), il est apparu que dans 92% des cas, le nouveau jeu de sonde et amorces donnait des valeurs supérieures à celles obtenues avec l'ancien jeu et dans 88% des cas, une meilleure reproductibilité entre les répliques. Au vu des améliorations significatives apportées par le « nouveau » système dans la détection des NoV GI à partir de nos échantillons, celui-ci a été adopté pour la suite des expérimentations relatives à la quantification des NoV GI., Il est à noter cependant que ce nouveau système ne permet pas le multiplexage avec le système ciblant les MNV du fait d'une forte interférence dans le canal de fluorescence « MNV », et que le problème n'a pu être réglé par une compensation colorimétrique (données non présentées).

### I.1.5. Protocole retenu pour l'extraction des VEH à partir d'eaux usées et de boues de station d'épuration

Le protocole résultant de ces essais est présenté dans la Figure I-6. Il a été utilisé par la suite dans toutes les expériences décrites dans les chapitres suivants. Il a, par ailleurs, été ajouté au catalogue de l'offre d'analyse de l'entreprise pour la recherche des VEH dans les eaux environnementales et, dans une version modifiée, pour la recherche des contaminations fécales associées aux humains, ovins, bovins, équin, porcins, canins et à certains oiseaux.

L'efficacité de récupération des MNV a été évaluée dans différents types d'échantillons (Tableau I-3).

Tableau I-3. Efficacité de récupération du protocole retenu appliqué à différents types d'échantillons (analysés en triplicats avec duplicats de RT-qPCR).

Type d'échantillon	N	Min (%)	Médiane (%)	Max (%)
Boues primaires	10	2	14	16
Boues biologiques	10	10	14	41
Eaux usées - entrée de STEP	17	13	39	66
Eaux usées - point intermédiaire (entrée traitement secondaire)	17	28	45	92
Eaux usées - sortie de STEP	17	31	50	82

Les résultats montrent une grande dispersion des valeurs d'efficacité de récupération quel que soit le type d'échantillon. Cette variabilité peut être observée, pour un même protocole analytique, entre différentes STEP ou au sein d'une même STEP (Ahmed *et al.* 2020, Chik *et al.* 2021, Pecson *et al.* 2021, Ahmed *et al.* 2023), très certainement en lien avec la variabilité de composition des eaux usées brutes, des charges virales entrantes, etc. Ahmed *et al.* 2020 ont, par exemple, comparé 7 protocoles de concentration et obtenu des taux de récupération moyens compris entre 27% et 66% dans des échantillons d'eaux usées spikés au virus de l'hépatite murine. La récupération des virus spikés est aussi, sans surprise, inférieure dans les boues par rapport aux eaux usées, très probablement du fait d'une concentration en inhibiteurs de PCR plus élevée dans les boues.

Dans les chapitres suivants, ce protocole a été appliqué aux deux matrices :

- la matrice « eau », comprenant les échantillons d'eaux usées (entrée STEP, entrée biofiltre et sortie de STEP) et de surnageants d'eaux usées ;
- la matrice « boue » comprenant les floccs et biofilms.

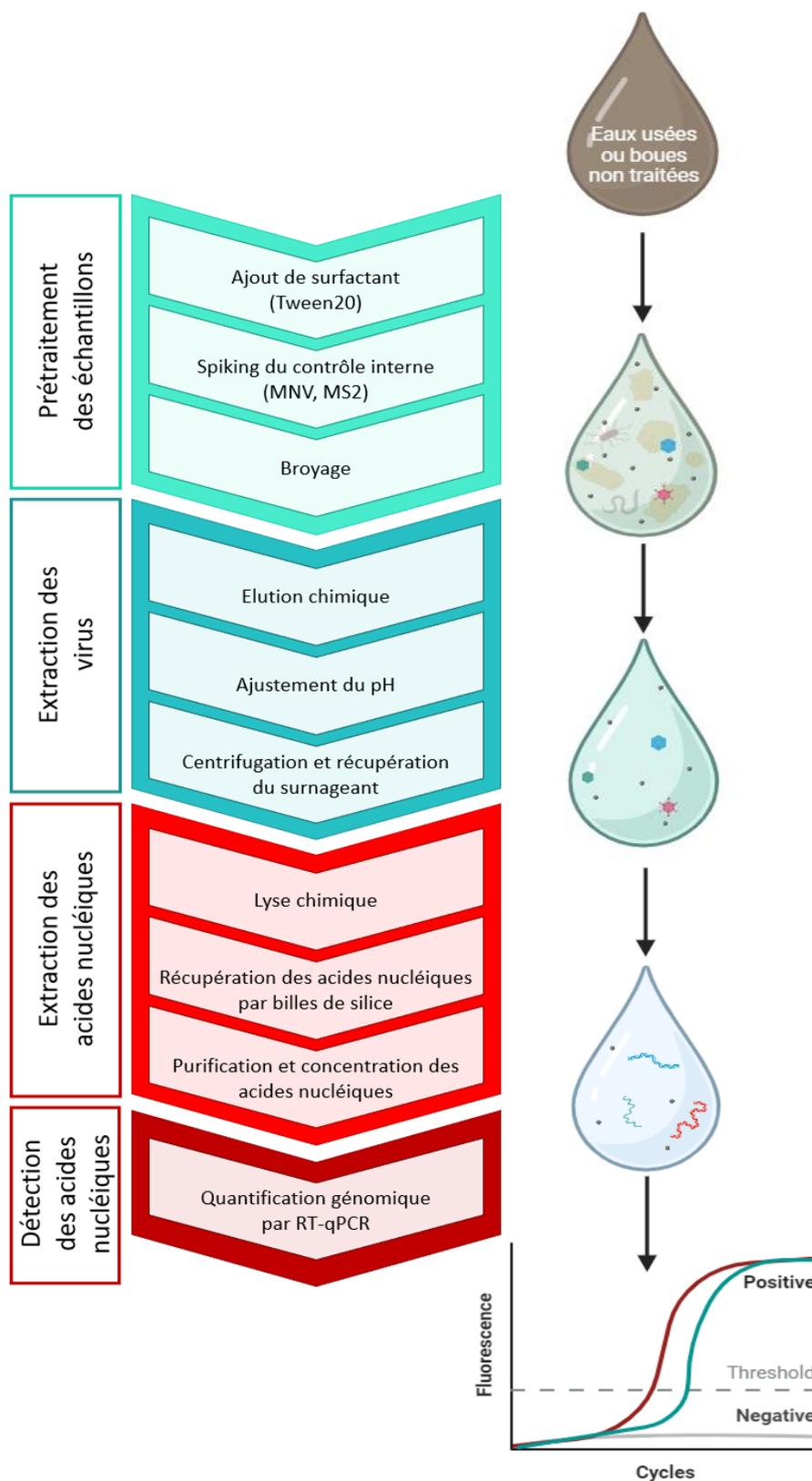


Figure I-6. Protocole retenu pour l'analyse des virus dans les eaux usées de station d'épuration.

## I.2. Approche d'une technique d'échantillonnage innovante : les matériaux adsorbants

L'utilisation de matériaux adsorbants pour l'analyse des virus dans les matrices environnementales peut offrir une stratégie alternative aux méthodes traditionnelles d'échantillonnage. Diverses études ont montré l'efficacité de certains d'entre eux pour l'élimination des virus des eaux (Michen *et al.* 2013, Canh *et al.* 2021), mais cette méthode restait, jusqu'à récemment, encore peu utilisée dans un but analytique. Un projet d'étude a donc été initié courant 2019, en collaboration avec le laboratoire EDYTEM (Université Savoie Mont Blanc), dans lequel plusieurs matériaux ont été testés pour leurs performances à adsorber les virus entiers à partir de suspensions calibrées de MNV : le **charbon actif** et le **chitosan** (Figure I-7). Avec la pandémie de COVID-19 et la détection du SARS-CoV 2 dans les eaux usées, une émergence d'études sur l'utilisation d'échantillonneurs passifs à base de matériaux filtrants (coton, nylon, cellulose, notamment) a depuis été observée (Kevill *et al.* 2022, Vincent-Hubert *et al.* 2022, Jones *et al.* 2022, Li *et al.* 2022, Hayes *et al.* 2022).

Les mécanismes d'adsorption de ces matériaux étant non spécifiques, c'est en aval, par l'analyse moléculaire, qu'une spécificité est donnée à l'ensemble du processus analytique. Nous avons également testé ces matériaux sur des eaux usées dopées en MNV, dans le but d'évaluer les modifications éventuelles de leurs capacités à adsorber des virus du fait d'interférences avec les composantes des eaux usées.

Une grande partie des expériences réalisées et leurs résultats, a fait l'objet d'une publication dans la revue "Journal of Virological Methods" pour le charbon actif, ou font partie d'un projet de publication pour le chitosan. Leurs textes sont donnés *in extenso* dans les pages suivantes.



Figure I-7. Charbon actif en poudre (gauche) et billes d'hydrogel de chitosan (droite) utilisés dans nos travaux sur la recherche de stratégies alternatives de récupération des virus dans les matrices hydriques

## **Title: Potentialities of a mesoporous activated carbon as virus detection probe in aquatic systems**

**Authors:** Doriane Delafosse<sup>a,b,\*</sup>, Laurence Reinert<sup>c</sup>, Philippe Azais<sup>d</sup>, Dominique Fontvieille<sup>a</sup>, Yasushi Soneda<sup>e</sup>, Patrice Morand<sup>b</sup>, Laurent Duclaux<sup>c</sup>

### **Affiliations**

<sup>a</sup> Laboratoire Abiolab-Asposan, Montbonnot-Saint-Martin, France

<sup>b</sup> Université Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Institut de biologie structurale (IBS), Grenoble, France

<sup>c</sup> Université Savoie Mont Blanc, EDYTEM, F-73000 Chambéry, France

<sup>d</sup> CEA-LITEN, DEHT, Grenoble, France

<sup>e</sup> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Energy Process Research Institute, Tsukuba, Ibaraki 305-8569, Japon

\* Corresponding author. E-mail address: doriane.delafosse@abiolab.fr (D. Delafosse)

DOI:

### **Abstract**

Enteric viruses are widely spread in water environments, some being harmful for human communities. Regular epidemics highlight the usefulness of analysing such viruses in wastewaters as a tool for epidemiologists to monitor the extent of their dissemination among populations. In this context, CNovel™ Powdered Activated Carbon (PAC) was chosen for its high porosity and high adsorption capacity to investigate sorbent ability to be used as part of virus detection probes. Self-supported PAC Foils (PAC-F), PAC coated Brushes (PAC-B) and PAC Sampler (PAC-S) were used to prospect PAC efficacy in virus adsorption and above all, the feasibility of virus retrieval from them, allowing to further analysis such as molecular analysis quantification. Aiming at the development of a field-operational tool, PAC saturation and reusability were also investigated, as well as PAC-polarisation effect on its adsorption capacity.

Our results pointed out that sorbent-based probes exhibited a high adsorption efficacy of spiked Murine Norovirus (MNV-1) in bare 0.1 M NaCl solution (>90% for PAC-B and >86% for PAC-F at  $\approx 10^7$  genome unit virus concentration), with no saturation within our experimental framework. On the other hand, polarisation assays using PAC-F as electrode, did not demonstrate any adsorption improvement. Experiments on PAC probes reusability suggested

that they should be used three times at the most for a maximum efficiency. Values of virus retrieval were low (up to 11% with PAC-B and up to 14% with PAC-F in 0.1M NaCl virus suspensions), illustrating the need for the techniques to be improved. A preliminary field assay using PAC-S, demonstrated that our catch-and-retrieve protocol yielded to the detection of autochthonous human Norovirus Genogroup I (NoV GI) and Adenovirus (AdV), in wastewaters suggesting its promising application as virus detection tool in such high loaded and complex waters.

## Keywords

Enteric viruses – Powdered activated carbon – Sorbent-based probe – Virus analysis – Wastewater analysis

### 1. Introduction

Human Enteric Viruses (HEV) are the main cause of waterborne diseases contracted all over the world, such as gastroenteritis and hepatitis (Enserink *et al.*, 2015; Bouseettine *et al.*, 2020). Their replication occurs within the gastrointestinal tract of their hosts, leading to large numbers of viruses excreted together with the faeces, up to  $10^{12}$  particles.g<sup>-1</sup> of faeces, then entering wastewaters (Gerba, 2000; Blacklow and Greenberg, 1991).

Sewers drive wastewaters to WasteWaters Treatment Plants (WWTPs) where they are processed to eliminate most of their organic and mineral loads, targeting downstream aquatic systems protection. However, HEV persistence in water environment, as well as a relative resistance to WWTPs depollution processes, have been demonstrated (Bae and Schwab *et al.*, 2008; Seitz *et al.* 2011; Qiu *et al.*, 2015; Kauppinen *et al.*, 2018). Residual virus loads in WWTP effluents reaching downstream recreational or shellfish farming waters, are yet high enough to represent a public health issue (Aslan *et al.*, 2011; Sinclair *et al.*, 2009).

Despite an increasing number of studies dedicated to this topic, a lack of efficient and standardised techniques remains, especially in collecting viruses from complex media such as wastewaters.

In most previous researches, wastewater virus analysis follows an extraction / detection two-steps protocol (Hmaied *et al.*, 2016; Cioffi *et al.*, 2020; Janahi *et al.*, 2020), where molecular analyses remain the gold standard in virus appraisal. Today, they allow very low viral genome copies detection (Sharkey *et al.*, 2021) while enduring some lingering impediments, as from inhibitors effects, despite recurrent investigations seeking at their reduction (Albinana-Gimenez *et al.*, 2009; Canh *et al.*, 2019). Particles' extraction remains the main problematic step in virus analysis, especially in addressing highly diversified and heavy loaded sewage waters.

A large panel of methods are described in the literature about enteric virus recovery from wastewater. Filtration with negatively or positively charged filters is among the most popular techniques (Ahmed *et al.*, 2015; Soto-Beltran *et al.*, 2013), together with protein precipitation (using polyethylene glycol, for example) or flocculation with skimmed milk (Masclaux *et al.*, 2013; Hjelmso *et al.*, 2017; Strubbia *et al.*, 2019). Ultracentrifugation and ultrafiltration are also used as concentrating techniques (Sidhu *et al.*, 2018; Prado *et al.*, 2019; Prata *et al.*, 2012; Martín-Díaz *et al.*, 2018).

As successful contributors to pollutants removal in wastewater treatment processes, adsorbents may appear as good candidates for virus sampling (Crini *et al.*, 2018). Among them, activated carbon, under its many different formats, has been thoroughly studied for its ability to adsorb a wide range of organic and inorganic components, including viruses (Cookson and North, 1967; Gerba *et al.*, 1975; Powell *et al.*, 2000; Matsushita *et al.*, 2013; Cormier *et al.*, 2014). Activated carbon is a complex, structurally disordered and highly porous material, available under several physical shapes (powder, granules, beads, fabric, etc.). Its adsorption efficiency especially relates to its porosity, yet not being specifically claimed to be mainly determinant in any of the above-mentioned studies. It can also be polarised after addition of conducting additives (Goldin *et al.*, 2005; Robles *et al.*, 2020), a design which may help collecting electric charges-bearing particles like virus within some pH ranges.

Our goal, in this work, was to setup devices and protocols committed to virus detection while addressing the challenging task (as quoted by Cormier *et al.*, 2014) of operating PAC.

Virus adsorption on PAC rely upon several parameters:

1. PAC specifications, especially specific surface area, porous volume and pore size distribution
2. Geometry and composition of holding structures used to operate PAC (*i.e.* supports)
3. Chemical mixtures entering the build of the above mentionned structures (glues)
4. Coating evenness, especially in its thickness
5. Experimental conditions (exposition time, stirring, temperature, etc.)
6. Overall water composition: dissolved and particulate matters (mineral and organic) including virus concentration.
7. Virus size, envelope, isoelectric point (IP).

Investigations on parameters 2 and 5, only are reported in this paper using the CNovel™ mesoporous (50nm) PAC arranged in three forms:

- PAC foils (PAC-F), used as-is or, polarised as self-supported electrodes,
- PAC-coated brushes (PAC-B), an in-house design set to maximise PAC active surface,

- PAC sampler probes (PAC-S) designed to enter an automatic sampler committed to field experiments.

All our experiments aimed at the assessment of both, PAC virus adsorption capacities and virus recovery efficiency after desorption. PAC abilities to enter field operational virus sampling tools were also investigated. Indeed, PAC probes, should not only be efficient in collecting viruses from aqueous media, but also in allowing their release, or at least, part of it, for further genome identification and quantification by Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). We also investigated a possible saturation of our PAC material after few adsorption steps, its ability to be reused through successive virus adsorption/recovery cycles and the effect of polarisation on its adsorption capacity.

## **2. Materials and Methods**

All experiments were conducted on 0.1M NaCl Murine Norovirus suspensions and on wastewaters from the WWTP of the Grand-Chambery urban community (Savoie, France).

### **2.1. Virus stock production**

The murine norovirus (MNV-1) strain, a surrogate of human norovirus was used to perform all *in vitro* experiments. They were grown on murine macrophage cell line RAW 264.7 (ATCC TIB-71). High-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and Foetal Bovine Serum (FBS) were purchased respectively from Corning (Corning, NY, USA) and Dominic Dutscher (Bernolsheim, France).

MNV-1 was propagated by infection of confluent RAW 264.7 cell line cultured in DMEM supplemented with 5% FBS and 1% Ampicillin/Streptomycin. After 48h at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, lysate was clarified by centrifugation at 3,000 g for 20 min at 4°C. MNV-1 containing supernatant was aliquoted and stored at -80°C. Stocks were quantified by Tissue Culture Infective Dose 50% (TCID<sub>50</sub>) and RT-qPCR.

### **2.2. Preparation of the powdered activated carbon probes**

All experiments were performed with CNovel™ (Toyo Tanso Co, Osaka, Japan) mesoporous activated carbon (Figure 1). Microporous and mesoporous volume are 0.209 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup> (pores diameter < 2 nm) and 0.855 cm<sup>3</sup>.g<sup>-1</sup> (pores diameter 2-50 nm) respectively. The BET specific surface area is 660 ± 3 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> (P/P° range = 0.01-0.05). As Noroviruses are around 30 nm in diameter, carbon porosity centred to 50 nm in diameter (estimation from BJH method applied on adsorption branch), was chosen to maximise the virus-adsorbent interaction.

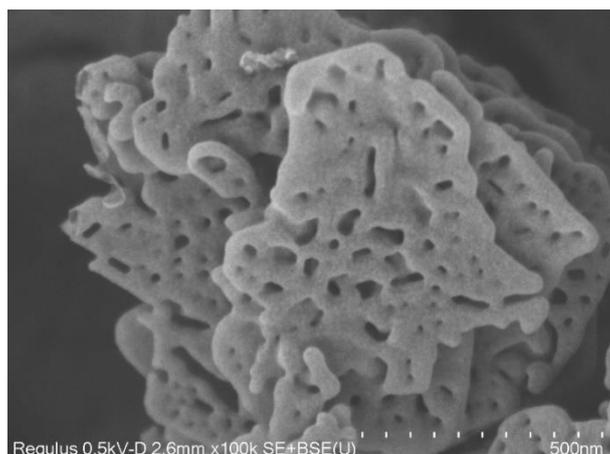


Figure 1. Scanning electron microscopy image of CNovel™ 50 nm.

Within the investigated water solutions pH range (6.5-7.5), the CNovel™ zeta potential (+0.55 mV at pH 7) should favour the adsorption of negatively charged Norovirus.

The three designed CNovel™-based probes are represented in Figure 2:

- self-supported PAC-F used as-prepared or as electrodes to investigate the role of polarity in adsorption processes;
- PAC-B; a field operational tool candidate
- PAC-S, part of an automatic sampler, used in wastewater field experiments.

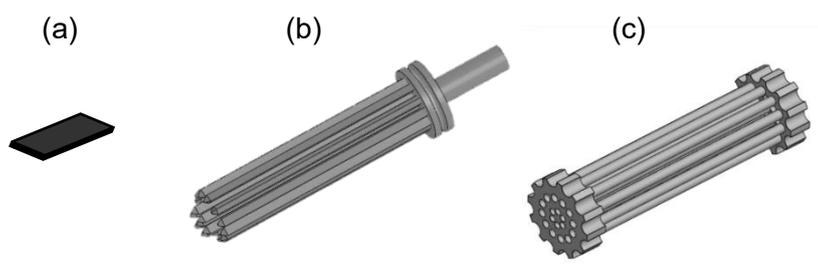


Figure 2. PAC Foil (a), Brush (b) and Probe (c) designs.

Brushes (PAC-B) and sampler probes (PAC-S) were 3D-printed using Polyamide 12 (nylon) or Rigid 10K (resin), then coated with a mixture of 87% CNovel™ carbon, 8% PVDF Solvay 5130 and 7% conductive carbon black C65 (Imerys Graphite and Carbons). Total coated surface was about 131 cm<sup>2</sup>. Coating mass was = 1.2 ± 0.3 g. The coating slurry solvent was N-Methyl-2-Pyrrolidone.

PAC-F were prepared from 80% of porous carbon mixed with 14% of PTFE and 6% of conductive carbon black (solvent: same as above). Their total mass was = 0.038 ± 0.012 g. Foils were totally

immersed (4 cm<sup>2</sup>) into the virus suspension for reusability experiments, and partly immersed (2 cm<sup>2</sup>) for polarisation assays.

### Adsorption assays

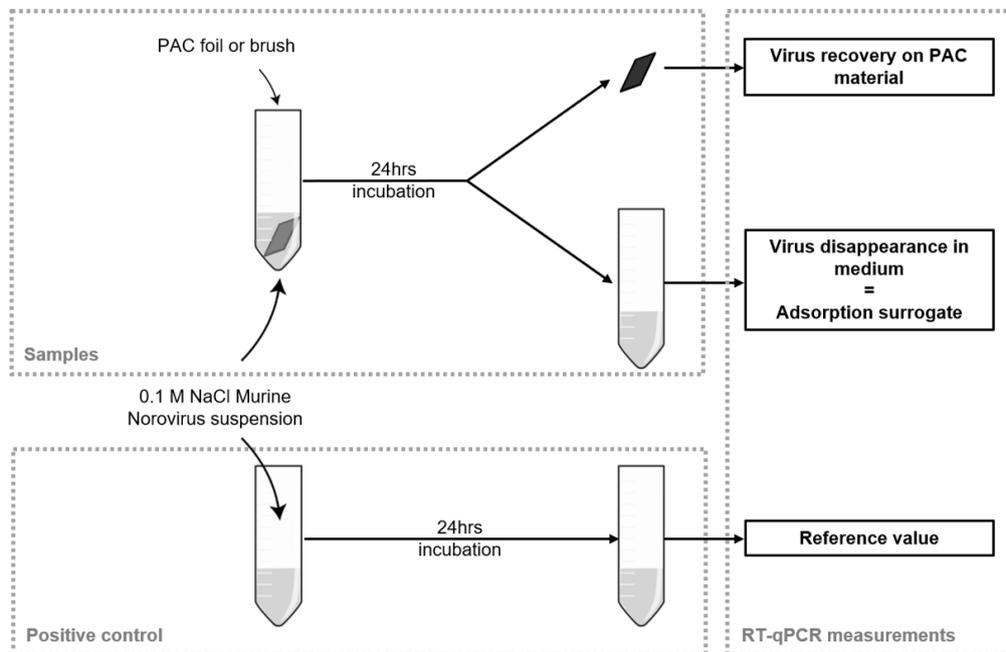


Figure 3. Adsorption assays experimental design using PAC-F (foils) or PAC-B (brushes).

Both, PAC-F and PAC-B were used for these assays. All experiments were performed in triplicates at room temperature (20°C) in 0.1 M NaCl MNV-1 suspension ( $1.76 \cdot 10^7 \pm 0.36 \cdot 10^7$  genome units.mL<sup>-1</sup> for PAC-F experiments,  $2.57 \cdot 10^7 \pm 0.25 \cdot 10^7$  genome units.mL<sup>-1</sup> for PAC-B ones). They were set up to emphasize virus - adsorbent contact (stirring, narrow between-foil distance).

PAC-F were, each, plunged into 2 mL MNV-1 suspension and incubated under a 120 rpm stirring. After a 24 h contact time, the foil was transferred into another tube where virus recovery later would take place (Figure 3). The NaCl solution, now freed from the foil, was submitted to RNA extraction for measuring the non-adsorbed viruses' amount.

PAC coated brushes were, each, plunged into 30 mL MNV-1 suspension in a 50 mL test tube. Tubes were incubated on a reciprocal shaker set at 120 rpm. After a 24 h contact time, PAC-B and 0.1 M NaCl solution were separated and submitted to nucleic acids extraction processes.

In all cases, virus "disappearances" were calculated from virus concentration differences, between positive controls and virus suspensions, at the end of the contact time period. Hence, these values were indirect assessments of the PACs adsorption capacities.

Positive controls were viral suspensions at the same initial virus concentrations which had no contact with an adsorbent. As such, they were used as references for recovery rate calculations. Negative controls were plain 0.1 M NaCl solutions receiving a PAC device (PAC-F or PAC-B). Both controls were incubated 24 h under stirring.

Investigation on a possible saturation of PAC-F adsorption capacity, by immersion of a foil into 2 mL virus suspension, was repeated three times (same protocol as above), using the same foil but with a new virus suspension at the same initial concentration. Each time, the remaining virus concentration was measured and PAC adsorption capacity calculated (Figure 3).

### **2.3. Adsorption kinetics assays**

Assays were conducted following the previously described PAC-B adsorption protocol for, except that 1 mL was sampled 1 h, 2 h, 5 h, 15 h and 24 h after the experiment starting. Concentrations of the remaining virus were measured and plotted over contact time.

### **2.4. Experiments on PAC probes reusability**

Virus desorption from the probes (foils or brushes) and remaining virus in the 0.1 M NaCl suspension were both investigated.

Experiments were performed according to the above-mentioned PAC-F and PAC-B adsorption protocol, and repeated three times.

### **2.5. PAC-F polarisation assays**

Three experiments were performed with PAC-F used as electrodes: anode first, then as cathode and lastly with no polarity. In each case, the counter electrode was a platinum foil, as neutral, non-adsorbent material.

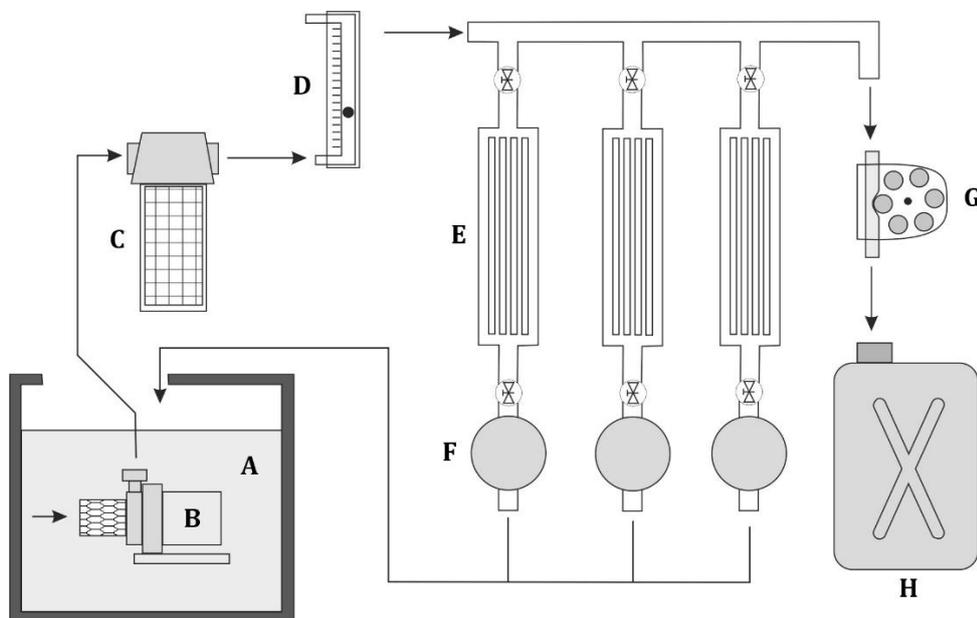
Electrodes were plunged in a 0.1 M NaCl MNV-1 suspension for 24 h at room temperature and 120 rpm stirring. They were connected to a DC generator set to 0.9 V. Electrodes and suspension were then separated and submitted to nucleic acids extraction processes.

### **2.6. Wastewater virus sampling using adsorbent based probes**

Field scale studies, operating an in-house built automat, were performed at the Grand-Chambéry WWTP (Chambéry, France), aiming to sample autochthonous NoV GI and AdV. The plant is processing both, industrial and domestic wastewaters from approximately 260,000 people over a usual two steps, physicochemical, primary and biofiltration, secondary, treatment.

As the Grand-Chambéry sewer network does not fully separate storm waters from sewages, the study was performed during a dry period to avoid any occasional high variations in mineral and organic wastewater loads.

The specifically built automatic sampler (Figure 4) took water from the outlet of a trickling filters unit during an adjustable pre-set time period (here 2.5 h and 5 h). Water temperature was about 15°C. After flowing through a coarse meshed filter, the water was distributed across four channels, three of them leading to probe chambers, each containing a PAC coated sampler-probe (PAC-S). PAC-S were PAC-B similar 3D-printed structures, redesigned to fit the sampler chambers. The last channel led to a peristaltic pump, set to take subsamples (volume adjusted to the experiment duration) every 5 min during the 2.5 h or 5 h contact times. Collected subsamples were all poured into a 10 L container, finally resulting in one single water sample integrated over the experiment period.



*Figure 4. Hydraulic circuit of the automatic sampler: A) trickling filters outlet collector tank, B) pump, C) coarse filtration unit, D) rotameter, E) probe chambers, F) flow sensors, G) peristaltic pump, and H) time-integrated water-collector.*

Channel flow rates were measured by flow sensors, and recorded, then used to standardise each channel results for water discharge. At the end of the experiment, PAC-S and the time-integrated water sample were recovered and conveyed at 4°C to the laboratory for virus analysis.

## 2.7. Virus extraction from wastewater

Virus were extracted from wastewater following a protocol derived from Pina *et al.* (1998). After the wastewater sample was twice homogenized for 30 s at 13,000 rpm using a hand blender, 25 mL were collected and spiked with MNV-1, to a  $3.21 \cdot 10^7$  genome units.mL<sup>-1</sup> final concentration. The sample was then mixed with 10 mL of 50 mM glycine and 3% beef extract buffer (pH 9.5) and incubated for 30 min at 4°C to promote the virus desorption from suspended matter. 10 mL of 2X phosphate buffer saline (pH 7.2) were then added to the mixture for pH neutralisation, prior to be centrifuged (12,000 g for 15 min at 4°C). The pellet was discarded and the supernatant subjected to the nucleic acids' extraction process.

## 2.8. Nucleic acids extraction

Nucleic acids extractions and purifications were carried out using NucliSENS® reagents (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France) and the semi-automatised eGENE-UP® platform (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France) according to slightly modified manufacturer instructions. Briefly, samples (either saline virus suspensions from assays or wastewater from the automatic sampler experiments or the solid coated devices: PAC-S, PAC-B and PAC-S) were mixed with 30 mL of lysis buffer for 30 min at room temperature. In experiments on fPAC-F, lysis buffer volume was 2 mL. 50 µL of magnetic silica beads were then added to the lysate and allowed to bind nucleic acids for 15 min at room temperature under shaking. Beads were washed successively with the three NucliSENS® extraction buffers and eluted in 100 µL of the third one. Eluted beads were vortexed then heated for 5 min at 65°C and stirred at 1600 rpm, allowing the release of nucleic acids. After a 30 sec centrifugation at 480 g, the supernatant (hereafter referred as RNA extract) was separated from the beads, carefully transferred into sterile microcentrifuge tubes and stored at -20°C prior to analysis.

## 2.9. Molecular quantification by RT-qPCR

RT-qPCR was carried out using the TaqMan Fast Virus One-Step Master Mix from Applied Biosystems™ (Waltham, MA, USA) with a total 20µL reaction volume. The reaction mixture contains 5µL of template, 5µL of Master Mix and primers and probes as needed per specific assay (Table 1). MNV-1 and NoV GI were quantified in multiplex reaction, while AdV was quantified in simplex one.

RT-qPCR was performed using a LightCycler 480 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland), with the following thermal cycling conditions: 5 min at 50 °C, 5 min at 95 °C, and 45 cycles of 20 s at 95 °C followed by 40 s at 60 °C. Data were collected at the end of each cycle. Results were validated after corresponding viruses' positive control and autoclaved ultrapure water negative control.

Table 1: primers and probe's sequences for each analysed virus

Matrix	Primers and probes	Primer and probes sequences (5' → 3')	Final concentration (nM)
Virus suspension in NaCl 0.1M and Wastewater	MNV-1-F5006	TGGAACAATGGATGCTGA	400
	MNV-1-R5078	GCTGCGCCATCACTC	800
	MNV-1-P5028	(Texas red) CCGCAGGAACGCTCAGCAGT (BHQ-2)	100
Wastewater	NoVGI-F5279	CCATGTTCCGYTGGATG	600
Wastewater	NoVGI-R5372	CCTTAGACGCCATCATCAT	600
	NoVGI-P5326	(FAM) GATCGCRATCTYCTGCCCGAATT (BHQ-1)	300
Wastewater	AdV_ABDEFG_F17676	TACATGCAYATCGCCG	300
	AdV_ABDEFG_R17727	CGGGCRAAYTGCACC	900
	AdV_ABDEFG_P17694	(FAM) CAGGAYGCYTCGGARTAYCT (BHQ-1)	400

### 2.10. Raw data formatting

LightCycler® 480 software (Roche, Basel, Switzerland) was used to analyse all RT-qPCR tests. Data were collected and managed in Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA). Cycle threshold (Ct) levels were manually set at the starting points of samples' internal positive control exponential phase.

All samples with a Ct larger than 40 or replicates with a  $\Delta Ct > 1$  were considered negative and discarded.

Differences between initial and final (after contact with the sorbent) virus concentrations in 0.1 M NaCl suspensions, were used as proxy of virus adsorptions on PAC materials.

Results from replicates were all summarised as medians (unknown data population distributions) and Median Absolute Deviations were computed accordingly.

The percentage of virus retrieved from the sorbent or which disappeared from the suspension at the end of adsorption experiments, was calculated as follows:

$$Q \text{ (MNV-1 recovery rate) (\%)} = \frac{Q_f \text{ (viral RNA genome copies recovered)}}{Q_0 \text{ (viral RNA genome copies seeded)}} \times 100$$

### 3. Results

#### 3.1. Viruses' adsorption and desorption using PAC-coated devices

The experiment aimed at the measure of MNV-1 adsorption on PAC-F and at the analysis of its repeatability.

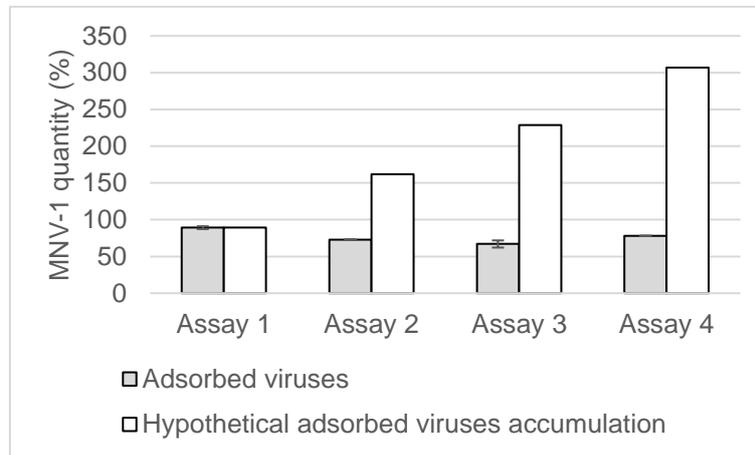


Figure 5. PAC-F 24h adsorption repeatability in 0.1M NaCl viral suspension. Error bars are  $\pm$  Median Absolute Deviation.

As stated on Figure 5, adsorption in the first assay appeared significantly higher than in the three following ones, attesting for a slight decrease of the sorbent adsorption capacity along the repeats. It was asserting the progress of adsorption toward its saturation. However, this decrease did not amplify from assay 2 to assay 4, despite each time virus accumulation on PAC-F was attested by the virus concentration drop in the suspension.

After a first decrease, CNovel™ kept a significant adsorption capacity, even after a four-times exposition to suspensions with same initial virus concentration. At the end of the experiment a total of  $8.69 \cdot 10^7$  viruses were then removed from the suspensions by the  $0.038 \pm 0.012$  g PAC-F (*i.e.*  $2.29 \cdot 10^9$  genome units.g<sup>-1</sup> of PAC).

Virus adsorption was then investigated with PAC-B designed as field-operational probes candidates. Compared to PAC-F, brushes coating resulted in a thin PAC layer, then with likely lower adsorption capacity, but with larger active surface.

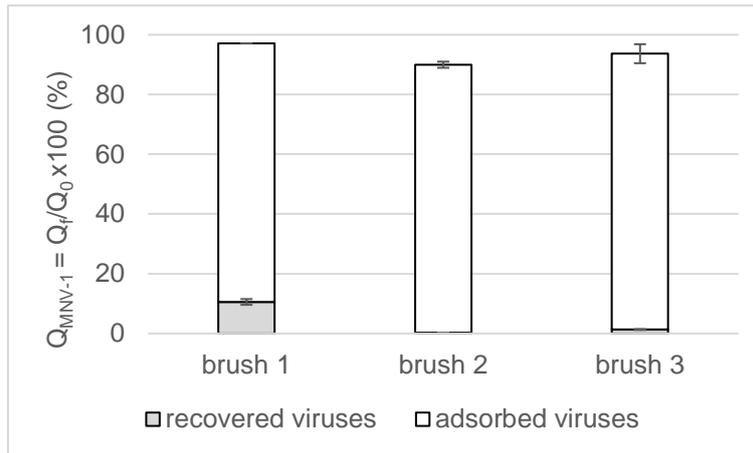


Figure 6. PAC-B MNV-1 adsorption in 0.1M NaCl viral suspension and recovering efficacies. Error bars are  $\pm$  Median Absolute Deviation.

MNV-1 adsorption on PAC-B 1, 2, and 3 (triplicates) reaches  $97 \pm 0.03\%$ ,  $90 \pm 1.03\%$  and  $94 \pm 3.18\%$  respectively, after 24 h contact with the viral suspension (Figure 6). After desorption,  $11 \pm 0.97\%$  of the adsorbed viruses were recovered from the first brush, while  $0.3 \pm 0.02\%$  and  $1.4 \pm 0.14\%$ , were obtained from the second and third recovery assays, respectively.

Thus, despite their thin PAC layer, PAC-B demonstrated to be efficient adsorbent devices, with a final adsorption of  $2.63 \cdot 10^7$  viruses on the  $1.2 \pm 0.3$  g of PAC-B (*i.e.*  $2.19 \cdot 10^7$  genome units.g<sup>-1</sup> of PAC-B). However, the desorption technique appeared rather inefficient on PAC-B, resulting in quite poor virus retrieval values.

### 3.2. Adsorption kinetics

Short sampling time is a key parameter in field-operational tools performances. PAC-B adsorption kinetics was therefore a focal point to be investigated.

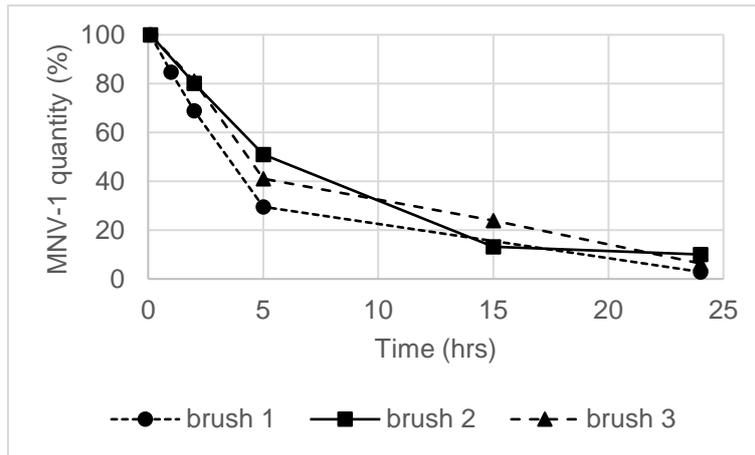


Figure 7. PAC-B adsorption kinetics in a 0.1M NaCl MNV-1 suspension. Values were calculated according to the following formula: ratio (%) = concentration of remaining viruses at x h/initial virus concentration x 100.

Three successive assays delivered the similar adsorption kinetic patterns (Figure 7). Virus concentration ranges from 30% to 51% after a 5h contact time, dropping to values as low as 10 to 3% after 24h, when a nearly total adsorption of the initial virus load was observed.

### 3.3. PAC reusability

PAC-F and PAC-B ability to be reused were studied with the perspective to use them in a field-operational tool.

Reusability was investigated from steadiness performances of both the two steps of virus "adsorption" sampling (alias virus concentration decrease in the 0.1 M NaCl suspension) and "recovery" (direct retrieval of virus nucleic acids after submitting PAC to the lysis buffer).

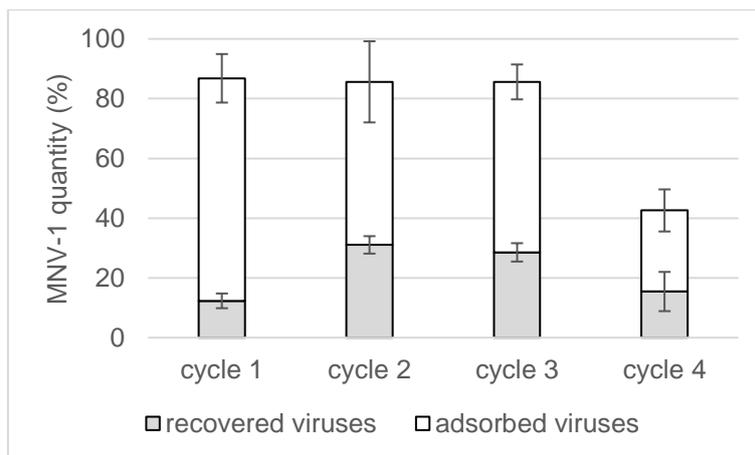


Figure 8. PAC-F reusability in the 0.1 M NaCl suspension assayed over four MNV-1 adsorption/recovery cycles. Error bars are  $\pm$  Median Absolute Deviation.

PAC-F reusability was tested over four virus adsorption/desorption cycles (Figure 8).

Adsorption efficiency kept quite steady during the firsts three cycles (85 to 86%), before falling to  $43 \pm 7\%$  at the last one. Recovery rate was about  $14 \pm 2\%$  at the first cycle, and reached  $36 \pm 3\%$ ,  $33 \pm 3\%$  and  $36 \pm 7\%$  at cycles 2, 3 and 4, respectively.

One of the main outcomes of the experiment is the lowest adsorption uptake occurring at the last assay. Despite the good performance of the recovery, with regard to this value, the result suggests that three successive uses (adsorption + recovery) of PAC-F, only are possible.

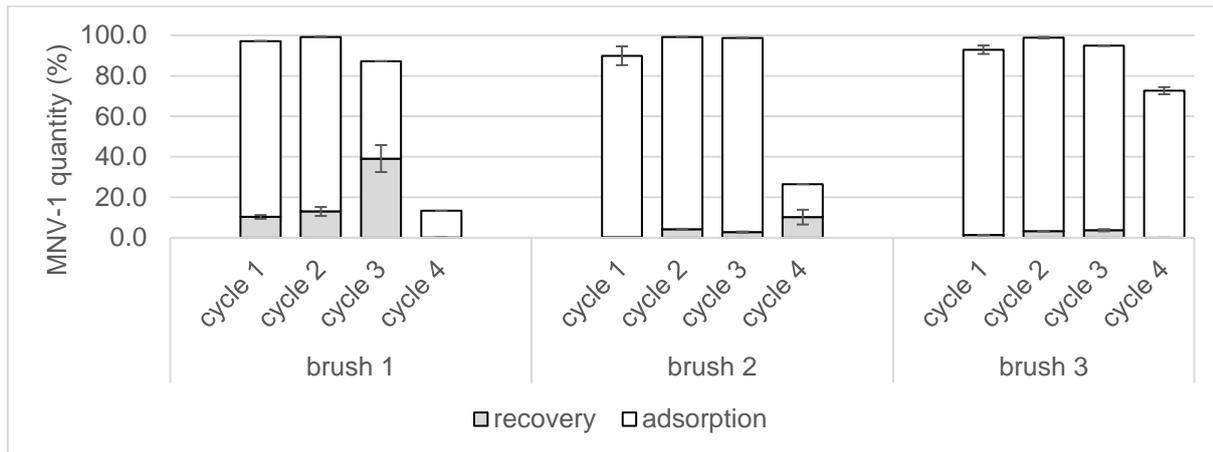


Figure 9. PAC coated brush (PAC-B) reusability during four adsorption/desorption cycles. Error bars are  $\pm$  Median Absolute Deviation.

Four repeats of virus adsorption/desorption cycle were performed, to investigate the PAC-B reusability. MNV-1 adsorption uptake rate ranged from 87 to 99 % during the first three cycles (Figure 9), then decreased to  $13 \pm 0.00\%$ ,  $16 \pm 0.02\%$  and  $73 \pm 1.76\%$  with brushes 1, 2 and 3 respectively, at the fourth cycle.

The corresponding virus recovery appeared slightly higher lately, after one or two reuses, especially with brush 1 at the 3<sup>rd</sup> cycle. Results, from brushes 1 and 2, mainly, also suggest that differences in PAC-coating masses, 1.56, 1.08 and 1.02 g on brushes 1, 2 and 3 respectively, were playing a part in these recovery rate values.

These assays corroborated conclusions from foils experiments in that, under our experimental conditions, PAC-devices (PAC-F and PAC-B) could hardly sustain more than three times reuses.

### 3.4. Polarization effect on PAC-F adsorption efficiency

Virus electrical charges play a major role in adsorption processes (Gerba, 1984). While large variations according to species and groups, have been recorded, virus IP frequently establishes between 3.5 and 7 (5.5 to 6.0 for Norwalk virus (Michen and Graule, 2010)). In environmental freshwaters at pH between 6.5 and 7.5, and certainly in our 0.1M NaCl virus suspension, virus

behave as anions, justifying that one of the most usual sampling techniques rely on positively charged filtration cartridges.

PAC-F polarisation experiments were designed to investigate a possible involvement of polarity in CNovel™ MNV-1 adsorption efficacy.

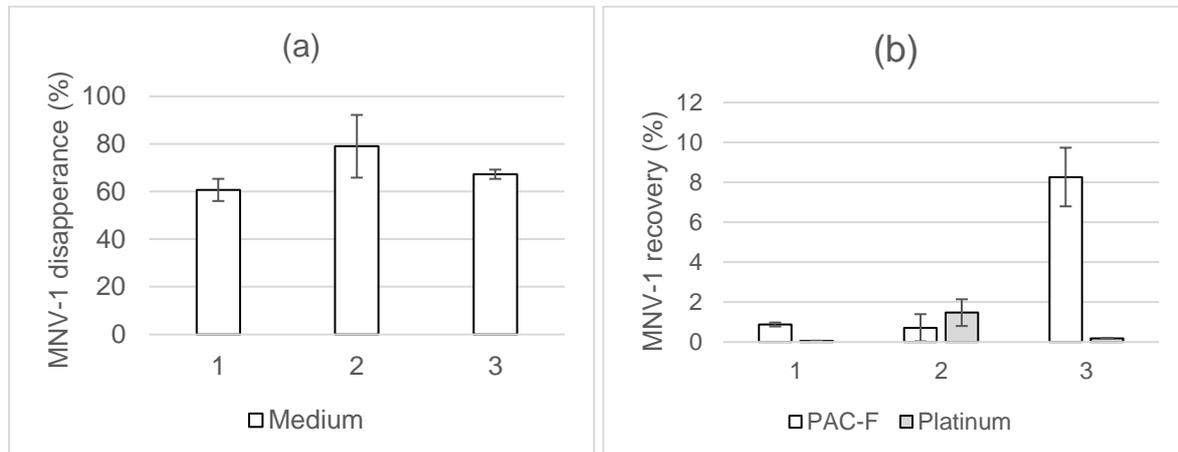


Figure 10. (a): Remaining virus in the 0.1 M NaCl MNV-1 suspension: at the end of the PAC-F polarisation experiment. (b): MNV-1 recovery rates from PAC-F and platinum electrodes. 1. PAC-F as anode. 2. PAC-F as cathode. 3. Unpolarised PAC-F. Error bars are  $\pm$  Median Absolute Deviation.

Three experiments were planned, respectively with PAC-F as anode (1), PAC-F as cathode (2) and with no polarisation (3), all with platinum foil as counter electrode.

As depicted on Figure 10 (a), PAC-F adsorption rate exhibited no clear significant difference whatever its electrode status, suggesting that, under our experimental conditions the foil polarity didn't play a meaningful part into virus adsorption efficacy. Here, the enforced polarisation probably did not shift the equilibrium of adsorption.

This conclusion was corroborated by results on recovery rates (Figure 10 (b)) where highest values appeared associated to non-polarised PAC-F assay (8%).

Such results were somewhat unexpected and could have been contrasted after adjustment of several parameters. Among them, foils composition (percentages of PAC, PTFE and conductive carbon) and varied applied voltages, within a narrow range, though, as the 0.9 V used during our experiments was considered the highest safe possible potential before triggering water electrolysis.

### 3.5. Preliminary assays operating PAC-probes to sample wastewater autochthonous HEV

Two types of samples were collected by the automatic sampler: PAC-S probes and a water sample integrated over the experiment period (section 2.6).

Whereas virus concentrations could easily be calculated from water analyses, virus quantities only can be derived from probes analyses, preventing all direct comparison of virus loads between water and probes: PAC-probes should be seen as devices devoted to virus-detection, with no possible standardisation by reference to the water volume that was flowing around.

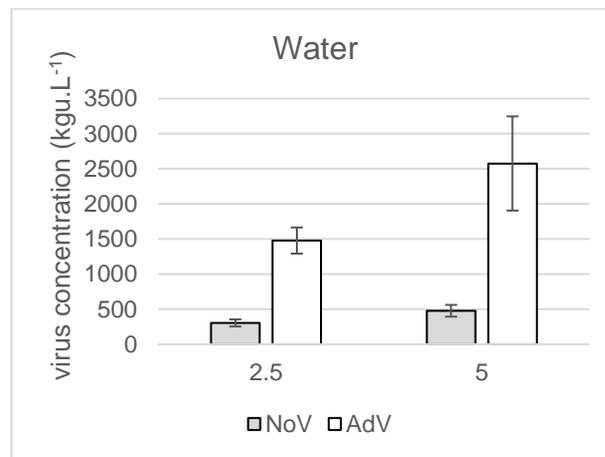


Figure 11. Concentrations of autochthonous NoV GI and AdV in the 2.5 h and 5 h integrated water. Error bars are  $\pm$  Median Absolute Deviation.

Figure 11 exhibits the overall increase in HEV loads between the two investigated contact time periods (2.5 h and 5 h). This was certainly linked to water-related human activities, as the 5 h period encompassed the after-lunch water uses. For some reasons, the increase was slightly higher for AdV (72%) than for NoV GI (56%).

A similar pattern was given by the probes analysis (Figure 12) but only for the 2.5 h exposure time as both virus groups found in water were also detected with PAC-Sand at the same ratio (Figure 81).

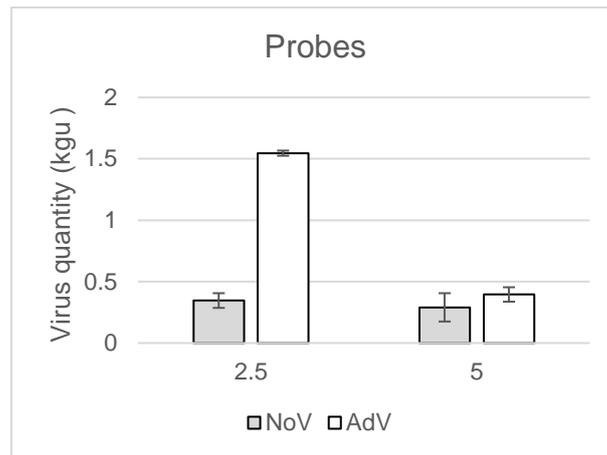


Figure 12. Amount of autochthonous NoV GI and AdV recovered from the PAC-S after 2.5 h and 5 h contact time with wastewater. Error bars are  $\pm$  Median Absolute Deviation.

A sharp decrease in the retrieved AdV load was observed after 5 h contact time, while twice the water volume of the 2.5 h period flowed through the probes (a total of 323 L). Probes clogging processes were likely to explain this result, as exemplified by a previous 24 h exposition-period experiment when no virus were detected due to a conspicuous clogging making totally inefficient the virus extraction technique (data not shown).

NoV GI appeared to be less affected than AdV by these hindrances, probably as a result of their differences in capsid size and peripheral structures: two decisive parameters for their diffusion speed (Zhdanov and Kasemo, 2010) and for the strength of their interactions with the activated carbon surface. The larger AdV capsid (about 80 nm in diameter) would thus be less likely adsorbed on clogged PAC-S than the smaller NoV GI (about 30 nm in diameter) (Kapikian *et al.*, 1972).

#### 4. Discussion

Our work intended to shape and validate PAC-based virus sampling tools, allowing their recovery for further analysis in a whole catch 'n' retrieve two steps procedure. First, it should be pointed out that most experiments were performed using MNV-1 suspensions. Even though it is an accepted surrogate of human noroviruses, our results cannot be extended to other viruses without further experiments, especially regarding the capsid size and properties such as the isoelectric point.

Implemented into our PAC-devices (foils and brushes), CNovel™ powdered activated carbon proved to be a very efficient MNV-1 adsorbent, demonstrating no saturation within the scope of our experiments. Our values of its adsorption efficacy cannot be easily compared to similar studies dedicated to virus adsorption on activated carbon, as most of them, dealt with virus integrity (/infectivity) therefore reporting adsorption efficacies as PFU.L<sup>-1</sup> (Matsushita *et al.*, 2013; Domagala *et al.*, 2021; Shimabuku *et al.*, 2018). A comparison may yet be tempted with some results from Cormier *et al.* (2014) putting forward a ratio of 9.18 genome units per PFU.

After conversion, their PFU results indicated that  $9.10^6$  to  $6.10^7$  MS2 genome units were adsorbed on 1 g of GAC in 2 h 45', whereas it took 24 h for 1g CNovel™ to adsorb  $2.19.10^7$  MNV1 genome units. The two viruses, MS2 and MNV-1 being similar in size, the comparison is suggesting that GAC adsorption kinetics would be faster than CNovel™ foil one (PAC-F). However, the difference could also be related to the high contribution of salinity in virus adsorption efficacy supported by Cormier *et al* (2014). According to their results, at 20°C, the optimal salinity was about at 20 ppt, whereas salinity in our 0.1M NaCl MNV-1 suspension was only 5.8 ppt. This comparison emphasized the fact that the adsorption capacities of PAC included in probes designed for virus sampling in wastewaters or other freshwaters, should be high enough to compensate for working far from their optimum conditions.

Polarisation of PAC foils appeared to be no help in virus adsorption improvement under our experimental conditions. The results suggested that virus polarity at pH 7 (conditions chosen close to the ones in sewage treatment plants) was not enough oriented toward an anionic or cationic behaviour which would trigger effective adsorption enhancement. They advocate for further experiments where polarity would be applied over short periods and with some adjustments of foils' composition.

CNovel™ appeared to be able to withstand some reusability, keeping a high and fairly constant adsorption efficacy over 3 repeats similarly with both, PAC-F and PAC-B (Figure 8 and Figure 9), then suggesting the involvement of device-independent parameters in this limitation that will be reviewed later in this discussion.

Bad between-brushes reproducibility (Figure 9) highlighted the difficulty to produce exact copies of hand-craft PAC-based devices. PAC coating was difficult to reproduce, leading to between-brushes differences in amount, thickness and evenness of the activated carbon layer. Making use of an automatic coating machine would be a better choice in future experiments. This is why, results from brush 1, the one with the highest PAC weight, mainly, will be considered in the following discussions.

Adsorption kinetic on PAC-B followed a slow exponential decay (Figure 7). A similar figure was described by Cormier *et al.* (2014) in their experiments where GAC was added to seawater spiked with MS2 bacteriophages.

Such pattern may be derived from a simple diffusion-controlled adsorption which apply to all particle suspensions in contact with an adsorbent under constant temperature and zero velocity (Zhdanov and Kasemo, 2010). Temperature was constant in our experiments (20°C), however, a reciprocal shaker allowed some sort of stirring of both, brushes and virus suspension, then increasing the probability viruses came into contact with the activated carbon. As virus concentration decreased due to the adsorption, the concentration gradient between viruses and activated carbon was decreasing and consequently the diffusion flow speed decreased as well as the adsorption rate. Actually, the figure was probably more complex: when working with non-planar activated carbon surfaces, particles transport

limitation comes not only from diffusion but also from some shapes' parameters of the activated carbon, like particles radius in the case of activated carbon powder (Alvarez *et al.*, 2010).

Adsorption rate decrease could also be explained by a self-limiting process where adsorption impaired itself because of the progressive saturation of the adsorption sites by the adsorbed virus. In addition, the lysis buffer action at the end of each adsorption/ recovery cycle, probably left debris and molecules (proteins) which were not all collected with the buffer and in a number much higher than the initial number of intact viruses. Both, processes, diffusion-controlled adsorption and adsorption drift to saturation, were likely main contributors in the adsorption rate decrease (Figure 7) and the one observed at cycle 4 for PAC devices reusability experiments, occurring with both, PAC-F and PAC-B (Figure 8 and Figure 9).

Unlike adsorption, virus recovery measurements yielded contrasted, quite low and highly variable values in all our experiments. A maximum of 40% virus recovery was registered from one of our brushes after 3 times reuse and a few percent only, from the two other brushes, during the same experiment. Aside their volatility, these results represented a significant progress where other authors just failed to isolate RNA from powdered activated carbon (Cormier *et al.*, 2014). However, they still are questioning the processes from which they derived, probably related to conflicting parameters, some impairing, some promoting the underlying reactions.

The performance of the adsorbed virus recovery process was primarily explained by the one of the NucliSENS® lysis buffer. It was relying from both its composition and its ability to reach and react with the virus while its diffusion progressed into the PAC porosity and the bulk of mineral and organic material that might be deposited on it. Results from our reusability experiments, both with foils (PAC-F) and brushes (PAC-B) illustrated the way this material covering the activated carbon might have interfered with the operability of the buffer. Lowest values of recovery rate always occurred at the 1<sup>st</sup> use of either PAC-F or PAC-B (Figure 8 and Figure 9, brush 1). At this time, a bare PAC surface was exposed to the virus suspension. It can be expected that the strength of adsorption forces (van der Waals and electrostatic) were then at their maximum. Two reasons might explain a poor performance of the buffer, at the moment:

- 1) RNAs released from the virus lysis, might have been adsorbed by the activated carbon and then no longer able to be collected by the buffer. Such an adsorption was demonstrated with DNAs and RNAs solutions on materials like graphene, nanotubes or biochar (Kirtane *et al.*, 2015; Pividori and Alegret, 2005; Bimová *et al.*, 2021). Conversely, other studies were suggesting that PAC may improve DNA analysis by removing some qPCR inhibitors like humic acids (Barbaric *et al.*, 2015), a benefit which was not evidenced in our measures.
- 2) Part of the buffer could be made ineffective by its contact with the activated carbon after its components were dissociated, due to differences in their affinities with the carbon

adsorption sites. Indeed, both thiocyanate and EDTA could be adsorbed on activated carbon with different efficacies as reported by Aguirre *et al.* (2010) and Zhu *et al.* (2011) on activated carbons with similar BET surface areas.

Figure 8 and Figure 9 also show that the virus recovery rate increased at cycles 2 and 3, with both, foils and brushes. At this time, part of the PAC porosity might be clogged by virus debris (capsid and/or protein residuals) and some virus left untouched by the lysis buffer, from the previous assay. We may assume that the consequences of this extra layer were to maintain newly released RNA a bit farther from the active carbon, then lowering the adsorption forces and consequently easing its collection by the lysis buffer. This interpretation is consistent with the expected decrease of adsorbate interaction energy when adsorption uptake increases, as observed by Baker *et al.* (2010) with heterogeneous surfaces, such as our PAC coating.

Briefly, four processes were probably contributing to these low values of virus recovery: 1. of course the adsorption itself with the amount of virus collected, 2. lysis buffer inability to reach adsorbed virus 3. its dissociation, and 4. RNA adsorption. All are related to the amount of proteins and debris clogging the activated carbon which should be large enough for weakening adsorption forces. However, they shouldn't be too overwhelming, then shielding the carbon surface from new contacts with viruses, and obstructing lysis buffer reaching already adsorbed viruses.

Optimal conditions for an efficient "catch 'n 'retrieve" virus sampling protocol, probably laid within a narrow range of activated carbon obstruction, as demonstrated when adsorption itself came to be affected. It occurred at cycle 4 of our reusability experiments, whatever the PAC device (foils or brushes). At this time, a value of virus recovery could be registered from brush 2 but not from brush 1, while, in both cases, virus adsorption was low (Figure 9). According to our assays and the way our PAC devices were designed, such a trade-off appeared to be met after two to three reuses of the devices.

Field experiments involving our PAC-S, demonstrated that adsorbent based probes were able to endure wastewater harsh conditions, for short exposition periods, allowing the retrieval of part of the HEV autochthonous load and part of its diversity (Figure 12). Significant amount of virus was collected despite a quite low temperature (15°C). This result appeared to be in line with studies supporting for no temperature effect on protein adsorption on activated carbon, at least within the range of wastewater's temperatures (Cookson, 1969). The exposition period should be optimized to compromise for the aforementioned trade-off between beneficial clogging and lysis buffer efficacy, a threshold that was obviously outreached with the 5 h exposition time.

## 5. Conclusion

One of the main achievements of this work was to set up and validate PAC-based devices. Supported by a performing adsorption and despite some volatility of the recovery step, our catch 'n' retrieve protocol, in association with our CNovel™-based sampling tools (PAC-B and PAC-S particularly) were able to supply virus samples to downstream molecular analysis. Our experiments highlighted the importance of two parameters in operating PAC-based devices: 1) the choice of an exposition time balancing efficient adsorption and virus recovery 2) the need for a pre-use probes conditioning (pre-use allowing some degree of clogging of the activated carbon porosity) which compensate in part, for the too effective adsorption forces of the CNovel™.

## 6. Acknowledgments

The research was supported by the ABIOLAB laboratory (Montbonnot Saint-Martin, France), where most experiments were performed and by the ASPOSAN association.

Fields experiments were possible thanks to the Grand Chambéry WWTP authorities. Their help in setting up the automatic sampler at the trickling filters outlet was greatly appreciated.

## 7. References

- Aguirre, N.V., Vivas, B.P., Montes-Morán, M.A., Ania, C.O., 2010. Adsorption of Thiocyanate Anions from Aqueous Solution onto Adsorbents of Various Origin. *Adsorption Science & Technology* 28, 705–716. <https://doi.org/10.1260/0263-6174.28.8-9.705>
- Ahmed, W., Bertsch, P.M., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., Haramoto, E., Gyawali, P., Korajkic, A., McMinn, B.R., Mueller, J.F., Simpson, S.L., Smith, W.J.M., Symonds, E.M., Thomas, K.V., Verhagen, R., Kitajima, M., 2020. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of The Total Environment* 739, 139960. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139960>
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J.M., Courtois, S., Girones, R., 2009. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods* 158, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.004>
- Alvarez, N.J., Walker, L.M., Anna, S.L., 2010. Diffusion-limited adsorption to a spherical geometry: The impact of curvature and competitive time scales. *Phys. Rev. E* 82, 011604. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.82.011604>
- Aslan, A., Xagorarakis, I., Simmons, F.J., Rose, J.B., Dorevitch, S., 2011. Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05130.x>
- 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>
- Baker, T.A., Kaxiras, E. & Friend, C.M. Insights from Theory on the Relationship Between Surface Reactivity and Gold Atom Release. *Top Catal* 53, 365–377 (2010). <https://doi.org/10.1007/s11244-010-9446-3>

- Barbarić, L., Bačić, I., Grubić, Z., 2015. Powdered Activated Carbon: An Alternative Approach to Genomic DNA Purification. *J Forensic Sci* 60, 1012–1015. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12773>
- Bimová, P., Roupčová, P., Klouda, K., Matějová, L., Staňová, A.V., Grabicová, K., Grabic, R., Majová, V., Híveš, J., Špalková, V., Gemeiner, P., Celec, P., Konečná, B., Bírošová, L., Krahulcová, M., Mackuľak, T., 2021. Biochar – An efficient sorption material for the removal of pharmaceutically active compounds, DNA and RNA fragments from wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 105746. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105746>
- Blacklow, N.R., Greenberg, H.B., 1991. Viral Gastroenteritis. *N Engl J Med* 325, 252–264. <https://doi.org/10.1056/NEJM199107253250406>
- Bouseettine, R., Hassou, N., Bessi, H., Ennaji, M.M., 2020. Waterborne Transmission of Enteric Viruses and Their Impact on Public Health, in: *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*. Elsevier, pp. 907–932. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819400-3.00040-5>
- Canh, V.D., Osawa, H., Inoue, K., Kasuga, I., Takizawa, S., Furumai, H., Katayama, H., 2019. Ferrihydrite treatment to mitigate inhibition of RT-qPCR virus detection from large-volume environmental water samples. *Journal of Virological Methods* 236, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.018>
- Cioffi, B., Monini, M., Salamone, M., Pellicanò, R., Di Bartolo, I., Guida, M., La Rosa, G., Fusco, G., 2020. Environmental surveillance of human enteric viruses in wastewaters, groundwater, surface water and sediments of Campania Region. *Regional Studies in Marine Science* 38, 101368. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2020.101368>
- Cookson, J.T., North, W.J., 1967. Adsorption of viruses on activated carbon. Equilibriums and kinetics of the attachment of Escherichia coli bacteriophage T4 on activated carbon. *Environ. Sci. Technol.* 1, 46–52. <https://doi.org/10.1021/es60001a002>
- Cookson, J.T., 1969. MECHANISM OF VIRUS ADSORPTION ON ACTIVATED CARBON. *Journal - American Water Works Association* 61, 52–56. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1969.tb03702.x>
- Cormier, J., Gutierrez, M., Goodridge, L., Janes, M., 2014. Concentration of enteric virus indicator from seawater using granular activated carbon. *Journal of Virological Methods* 196, 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.008>
- Crini, G., Lichtfouse, E., Wilson, L.D., Morin-Crini, N., 2019. Conventional and non-conventional adsorbents for wastewater treatment. *Environ Chem Lett* 17, 195–213. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0786-8>
- Domagała, K., Bell, J., Yüzbaşı, N.S., Sinnet, B., Kata, D., Graule, T., 2021. Virus removal from drinking water using modified activated carbon fibers. *RSC Adv.* 11, 31547–31556. <https://doi.org/10.1039/D1RA06373A>
- Enserink, R., van den Wijngaard, C., Bruijning-Verhagen, P., van Asten, L., Mughini-Gras, L., Duizer, E., Kortbeek, T., Scholts, R., Nagelkerke, N., Smit, H.A., Kooistra-Smid, M., van Pelt, W., 2015. Gastroenteritis Attributable to 16 Enteropathogens in Children Attending Day Care: Significant Effects of Rotavirus, Norovirus, Astrovirus, Cryptosporidium and Giardia. *Pediatric Infectious Disease Journal* 34, 5–10. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000472>
- Gerba, C.P., Sobsey, M.D., Wallis, C., Meinick, J.L., 1975. Adsorption of poliovirus onto activated carbon in waste water. *Environ. Sci. Technol.* 9, 727–731. <https://doi.org/10.1021/es60106a009>
- Gerba, C.P., 1984. Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 133–168. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70054-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70054-6)
- Gerba, C.P., 2000. Assessment of Enteric Pathogen Shedding by Bathers during Recreational Activity and its Impact on Water Quality. *Quantitative Microbiology*, 2(1), 55–68. <https://doi.org/10.1023/A:1010000230103>
- Goldin, M.M., Volkov, A.G., Namychkin, D.N., Filatova, E.A., Revina, A.A., 2005. Adsorption of Copper and Calcium Cations on Polarized Activated Carbon Modified by Quercetin. *J. Electrochem. Soc.* 152, E172. <https://doi.org/10.1149/1.1882032>

- Hjelmsø, M.H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancencko, O., Seidel, M., Elsässer, D., Aarestrup, F.M., Löfström, C., Bofill-Mas, S., Abril, J.F., Girones, R., Schultz, A.C., 2017. Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS ONE* 12, e0170199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170199>
- Hmaïed, F., Jebri, S., Saavedra, M.E.R., Yahya, M., Amri, I., Lucena, F., Hamdi, M., 2016. Comparison of Two Concentration Methods for the Molecular Detection of Enteroviruses in Raw and Treated Sewage. *Curr Microbiol* 72, 12–18. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0909-4>
- Janahi, E.M., Mustafa, S., Parkar, S.F.D., Naser, H.A., Eisa, Z.M., 2020. Detection of Enteric Viruses and Bacterial Indicators in a Sewage Treatment Center and Shallow Water Bay. *IJERPH* 17, 6483. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186483>
- 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. <https://doi.org/10.1128/jvi.10.5.1075-1081.1972>
- Kauppinen, A., Pitkänen, T., Miettinen, I.T., 2018. Persistent Norovirus Contamination of Groundwater Supplies in Two Waterborne Outbreaks. *Food Environ Virol* 10, 39–50. <https://doi.org/10.1007/s12560-017-9320-6>
- Kirtane, A., Atkinson, J.D., Sassoubre, L., 2020. Design and Validation of Passive Environmental DNA Samplers Using Granular Activated Carbon and Montmorillonite Clay. *Environ. Sci. Technol.* 54, 11961–11970. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01863>
- Martín-Díaz, J., Lucena, F., 2018. Extraction and RT-qPCR detection of enteroviruses from solid environmental matrixes: Method decision tree for different sample types and viral concentrations. *Journal of Virological Methods* 251, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.004>
- Masclaux, F.G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., Oppliger, A., 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Research* 47, 5101–5109. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.050>
- Matsushita, T., Suzuki, H., Shirasaki, N., Matsui, Y., Ohno, K., 2013. Adsorptive virus removal with super-powdered activated carbon. *Separation and Purification Technology* 107, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.01.017>
- Michen, B., Graule, T., 2010. Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology* 109, 388–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04663.x>
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Girones, R., 1998. Characterization of a Strain of Infectious Hepatitis E Virus Isolated from Sewage in an Area where Hepatitis E Is Not Endemic. *Appl. Environ. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.11.4485-4488.1998>
- Pividori, M.I., Alegret, S., 2005. DNA Adsorption on Carbonaceous Materials, in: Wittmann, C. (Ed.), *Immobilisation of DNA on Chips I, Topics in Current Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 1–36. <https://doi.org/10.1007/b136064>
- Powell, T., Brion, G.M., Jagtoyen, M., Derbyshire, F., 2000. Investigating the Effect of Carbon Shape on Virus Adsorption. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2779–2783. <https://doi.org/10.1021/es991097w>
- Prado, T., de Castro Bruni, A., Barbosa, M.R.F., Garcia, S.C., de Jesus Melo, A.M., Sato, M.I.Z., 2019. Performance of wastewater reclamation systems in enteric virus removal. *Science of The Total Environment* 678, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.435>
- Prata, C., Ribeiro, A., Cunha, Â., Gomes, Newton.C.M., Almeida, A., 2012. Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. *J. Environ. Monit.* 14, 64–70. <https://doi.org/10.1039/C1EM10603A>
- Qiu, Y., Lee, B.E., Neumann, N., Ashbolt, N., Craik, S., Maal-Bared, R., Pang, X.L., 2015. Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada. *J Appl Microbiol* 119, 1729–1739. <https://doi.org/10.1111/jam.12971>

- Robles, I., Moreno-Rubio, G., García-Espinoza, J.D., Martínez-Sánchez, C., Rodríguez, A., Meas-Vong, Y., Rodríguez-Valadez, F.J., Godínez, L.A., 2020. Study of polarized activated carbon filters as simultaneous adsorbent and 3D-type electrode materials for electro-Fenton reactors. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, 104414. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104414>
- Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L., 2011. Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6884–6888. <https://doi.org/10.1128/AEM.05806-11>
- Sharkey, M.E., Kumar, N., Mantero, A.M.A., Babler, K.M., Boone, M.M., Cardentey, Y., Cortizas, E.M., Grills, G.S., Herrin, J., Kemper, J.M., Kenney, R., Kobetz, E., Laine, J., Lamar, W.E., Mader, C.C., Mason, C.E., Quintero, A.Z., Reding, B.D., Roca, M.A., Ryon, K., Solle, N.S., Schürer, S.C., Shukla, B., Stevenson, M., Stone, T., Tallon, J.J., Venkatapuram, S.S., Vidovic, D., Williams, S.L., Young, B., Solo-Gabriele, H.M., 2021. Lessons learned from SARS-CoV-2 measurements in wastewater. *Science of The Total Environment* 798, 149177. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149177>
- Shimabuku, Q.L., Ueda-Nakamura, T., Bergamasco, R., Fagundes-Klen, M.R., 2018. Chick-Watson kinetics of virus inactivation with granular activated carbon modified with silver nanoparticles and/or copper oxide. *Process Safety and Environmental Protection* 117, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.04.005>
- Sidhu, J.P.S., Sena, K., Hodggers, L., Palmer, A., Toze, S., 2018. Comparative enteric viruses and coliphage removal during wastewater treatment processes in a sub-tropical environment. *Science of The Total Environment* 616–617, 669–677. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.265>
- Sinclair, R.G., Jones, E.L., Gerba, C.P., 2009. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks a review. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04367.x>
- Soto-Beltran, M., Ikner, L.A., Bright, K.R., 2013. Effectiveness of Poliovirus Concentration and Recovery from Treated Wastewater by Two Electropositive Filter Methods. *Food Environ Virol* 5, 91–96. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9104-6>
- Strubbia, S., Schaeffer, J., Oude Munnink, B.B., Besnard, A., Phan, M.V.T., Nieuwenhuijse, D.F., de Graaf, M., Schapendonk, C.M.E., Wacrenier, C., Cotten, M., Koopmans, M.P.G., Le Guyader, F.S., 2019. Metavirome Sequencing to Evaluate Norovirus Diversity in Sewage and Related Bioaccumulated Oysters. *Front. Microbiol.* 10, 2394. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02394>
- Zhdanov, V.P., Kasemo, B., 2010. Diffusion-limited kinetics of adsorption of biomolecules on supported nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76, 28–31. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.004>
- Zhu, H., Yang, X., Mao, Y., Chen, Y., Long, X., Yuan, W., 2011. Adsorption of EDTA on activated carbon from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 185, 951–957. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.112>

**Title: Chitosan-based sampling protocol for environmental studies on non-enveloped virus**

**Authors:** Delafosse, D., Sayah, H., Reynaud, A., Prévost, B., Gibeaux, C., Reinert, L., Fontvieille, D., Duclaux, L.

**Abstract**

The presence of human viruses in aquatic environments puts a significant threat to public health, highlighting the need for effective monitoring strategies. Hydrogels of chitosan, a natural biopolymer derived from chitin, were studied for their capacity to adsorb, and release murine norovirus (MNV-1) in aqueous samples to develop virus sampling protocols in aquatic media.

Several types of chitosan beads were prepared by gelation of raw chitosan, some by copper imprinting with or without additional magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles.

Virus recovery was investigated using several approaches: high pH (8.2-9), high ionic strength (NaCl, 2M), surfactant addition (Tween 20), and enzymatic degradation (chitosanase). The hydrolytic degradation was optimised in terms of contact time and in combination with other approaches.

The obtained results confirm the high virus adsorption efficacy of both chitosan hydrogels, and rehydrated-lyophilised ones (> 99%) regardless of their shaping methods (with or without copper imprinting). Regarding the virus recovery, our experiments resulted in a very contrasting figure, with retrieval rates in the range 0%-72 % depending on the method and conditions.

Chitosanase enzymatic degradation led to 72% of MNV-1 release after contact time optimisation but the efficiency was proved to depend on the enzyme batch origin. After chitosan enzymatic degradation, much higher virus recovery values were achieved with copper-imprinted beads than with raw chitosan (29 % vs 1 %, respectively). Their low porosity and lower surface specific surface area may have contributed to such an efficiency. However, considering the whole process, adsorption plus recovery, the chitosan beads made from raw chitosan gelation remain the best materials to capture a maximum of MNV-1.

The ability to sample viruses from wastewaters, using our chitosan enzymatic degradation method, was demonstrated seemingly despite the competition and interferences which may originate from their high organic and mineral matters contents.

## Keywords

Adsorption - Recovery - Chitosan – Virus – Sampling

### 1. Introduction

The need for monitoring human viruses in all structures related to sewage transportation and treatment is paramount. Their inadequacies and failures (sewer leakages, water runoffs, Wastewater Treatment Plant (WWTP) malfunctioning) allow viruses to enter the environment, potentially contaminating recreational and drinking waters, then setting human communities health at risk (Katayama *et al.* 2008, Prevost *et al.* 2015).

Wastewater virus analysis is a challenging task due to the complexity of the media – a mixture of high concentrations of organic and mineral components associated to a large diversity of microorganisms – and to the absence of gold standard methods. Virus analysis in aquatic media has already been performed using adsorbent materials: Vincent-Hubert *et al.* (2017), assayed commercial membranes to sample human norovirus genogroup II (NoV GII) from seawater and sewage samples, achieving 1% of recovery in sewage with zetapore membrane after 24h; granular activated carbon was used by Hayes *et al.* (2022) to sample and analyse spiked SARS-CoV-2 in sewage samples. When based on molecular biology, sample analysis may require that viruses or nucleic acids are separated from the adsorbent which is done by adding a recovery step after the adsorption step in sampling protocols. So far, such a recovery procedure is poorly documented in the literature.

Chitosan is a statistical linear copolymer of  $\beta$ -(1–4)-linked D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine, derived from chitin, a major component of the exoskeletons of insects and crustaceans, as well of fungi and algae cell walls. It carries its main interest from its adsorption capacity, associated to additional valuable properties for both, medical and environmental applications, such as biodegradability, biocompatibility, and low toxicity (Crini *et al.*, 2009; Morin-Crini *et al.*, 2019).

Chitosan can be used as an adsorbent, a coagulant, or a flocculant to clarify water by removing suspended solids and turbidity from water (Zemmouri *et al.* 2011, Feria-Diaz *et al.* 2018, Soros *et al.* 2019). Its biodegradability and low toxicity make it a safe and environmentally friendly alternative to chemicals traditionally used in water treatment. Among all its applications, chitosan is especially at stake in polluted water filtration and purification where it helps to extract compounds such as pesticides, heavy metals, pharmaceuticals, dyes, organic compounds, and microbes (Jaiswal *et al.* 2012, Ranjbari *et al.* 2020, Kyzas *et al.* 2013, Chiou *et al.* 2004, Yamada *et al.* 2005, Oza *et al.* 2022).

Chitosan has been shown to exhibit an antimicrobial activity, including against viruses (Hassan *et al.* 2016, Amankwaah *et al.* 2020, Jaber *et al.* 2022). The antiviral activity of chitosan is attributed to its ability to interact with viral envelopes or capsids, preventing them from binding to host cells (Su *et al.* 2009, Barnes *et al.* 2021).

The issue of virus sampling by using sorbent materials, like chitosan, has already been addressed with studies relating to chitosan-based passive samplers (Li *et al.* 2011, Mi *et al.* 2014, Barnes *et al.* 2021). Ciejka *et al.* (2017) even demonstrated the reversibility of coronaviruses adsorption by increasing the ionic strength of the solution (recovering 34% of adsorbed viruses), then suggesting the possibility for the virus to be retrieved for further analysis. The main focus of this study was to extend the scope of this type of investigation using chitosan to capture and retrieve, at least some of the adsorbed virus, with the ultimate aim of developing a human enteric virus monitoring procedure relying on a chitosan-based probe in accordance with relevant analytical protocols.

In the first part of this paper, the efficiencies of several chitosan hydrogel types to adsorb the murine norovirus (a surrogate for human enteric viruses) from NaCl 0.1 M suspensions, were investigated. The second part is dedicated to experiments on several virus recovery protocols and to an application of chitosan beads to virus analysis in wastewaters.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chitosan beads preparation and characterisation

A 3.5 mass % chitosan solution was prepared by dissolving chitosan powder (Zhejiang AOXIN Biotechnology Co., Ltd., China, deacetylation degree: 90.16%, average molecular weight  $M_w = 193\,400$  Da) in a 0.5 M acetic acid solution (Carl Roth, Germany). The mixture was firmly stirred overnight at room temperature. 5 % of  $\text{Cu}^{2+}$  (w of Cu/w of chitosan) ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , > 99%, Carl Roth) and/or 20 mass % of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanopowder (Sigma-Aldrich, USA) were also added to the solution mixture to obtain copper imprinted and magnetic hydrogel beads respectively. Chitosan-based hydrogel beads were produced by dropwise adding the chitosan solutions (50 mL) into a 10 mass % NaOH solution bath. Beads were then washed to neutrality in 8 successive baths of deionised water (200 mL), 2 h each. For imprinted beads (with  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  addition or not), a subsequent step of copper desorption was conducted in a 0.03 Ethylenediaminetetraacetic acid solution for 45 minutes, followed by another series of 8 deionised water baths (200 mL) (David *et al.* 2022, patent N°3117378). Finally, four kinds of chitosan-based hydrogel beads were produced: raw Chitosan Hydrogels (CH), Cu-Imprinted Hydrogels (I-CH), Magnetic Hydrogels (M-CH), and Magnetic Cu-Imprinted Hydrogels (MI-CH). The ionic imprinting method allows preparing chitosan hydrogel beads with higher mechanical strength than conventional gelation shaped beads (David *et al.* 2022, patent N°3117378). The magnetic beads containing  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles can be removed easily from solution by magnetic separation (Ma and Zheng, 2020).

Lyophilisation was performed in a freeze-dryer (Lyovapor™ L-200, Buchi, Switzerland) for 48 h at 1.65 mbar and  $-54.6^\circ\text{C}$ , on two types of hydrogels to compare the virus adsorption properties of lyophilised beads with respect to hydrogels composition. The raw chitosan (CH) and imprinted (I-CH) lyophilised hydrogels are referred as L-CH and LI-CH, respectively, in Table 1 where characteristics of all types of studied chitosan-based hydrogel beads are summarised.

Table 1. Characteristics of the chitosan-based beads tested and associated experiments.

Chitosan beads name	LI-CH	L-CH	I-CH	CH	MI-CH	M-CH
<b>Bead types</b>	Lyophilised copper imprinted chitosan	Lyophilised chitosan	Copper-imprinted chitosan	Chitosan	Magnetic copper imprinted chitosan	Magnetic chitosan
<b>Water mass. % in hydrogel</b>	-	-	82.7	91.2	81.7	92.8
<b>Mean diameter (mm)</b>	1.0 ± 0.2	2.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	2.0 ± 0.3	1.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2
<b>Density (g.cm<sup>-3</sup>) 21°C</b>	N/A	N/A	1.020 ± 0.001	1.011 ± 0.001	1.050 ± 0.002	1.013 ± 0.001
<b>Isoelectric pH point</b>	-	-	7	7	-	7
<b>BET specific surface area (m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>)</b>	10.0 ± 0.1	59.4 ± 0.3	N/A	N/A	14.5 ± 0.2	16.5 ± 0.1
<b>Mesoporous Volume (cm<sup>3</sup>. g<sup>-1</sup>)</b>	0.04	0.13	N/A	N/A	0.05	0.06
<b>Experiments</b>	Adsorption	Adsorption	Adsorption Recovery WWTP assay	Adsorption Recovery WWTP assay	Adsorption Recovery WWTP assay	Adsorption Recovery WWTP assay

The water content (mass %) of the hydrogels was determined by thermogravimetric analysis. The mean diameter of the beads was determined by measuring the bead size diameter using image analysis (Image J software) of a scaled photograph of approximately 80 beads. The apparent densities of the beads were measured using a calibrated glass pycnometer (approximately 24 mL) filled with water. The isoelectric pH was determined by measuring the pH dependence of the zeta potential using a Litesizer™ 500 particle analyser (Anton Paar, Austria) and was taken at the pH where the zeta potential is zero.

The Brunauer Emmett Teller (BET) specific surface areas ( $S_{BET}$ ) were calculated in the  $P/P_0$  range of 0.05 to 0.2 from the  $N_2$  adsorption isotherms of the lyophilized beads measured with a Micromeritics ASAP 2020 sorptometer. In this relative pressure range, the "Rouquerol" criterion is verified:  $n(1 - P/P_0)$  increases continuously with pressure, where  $n$  (mol) is the amount of  $N_2$  adsorbed (Rouquerol *et al.*, 1964). The mesoporous volume (volume of pores in the diameter range [2 nm-50 nm]) was calculated from the difference between the total porous volume determined at  $P/P_0=0.99$  and the microporous volume estimated from the volume at  $P/P_0=0.005$ .

The differences between the densities of the beads (Table 1) are not significant because they contain mainly water. The water content is about 90 mass% for hydrogel beads based on pure chitosan and about 80 mass% for those based on imprinted chitosan. These differences are also related to the smaller size of the beads made from imprinted chitosan (about 1 mm diameter) than those made without imprinting (2 mm diameter). In fact, the  $Cu^{2+}$  ionic

imprinting methods allow the chitosan chains to be brought closer together, so that the estimated mesoporosity measured from N<sub>2</sub> adsorption at 77K of imprinted chitosan-based beads is quite lower than that of pure chitosan-based beads (Table 1). The addition of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles to the hydrogels induces a slight increase in mesoporosity, which is attributed to the intrinsic mesoporosity of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle aggregates within the biopolymer gel. The S<sub>BET</sub> of the prepared beads after lyophilisation clearly depends on the preparation method and the addition or not of magnetic nanoparticles. S<sub>BET</sub> follows the trend: LCH > LI-CH > MCH > MI-CH (Table 1). We can assume that the S<sub>BET</sub> and porosity of the undried hydrogels are certainly higher than those of their freeze-dried derivatives, but they should follow the same trends.

Freeze-dried beads were observed using a Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM, Ultra 55, Carl Zeiss AG, Germany) after coating with a carbon layer at CMTC (INP, Grenoble). The surface chemical composition of CS-IMP was examined by Energy Dispersive Spectroscopy (EDS, Bruker AXS-30 mm<sup>2</sup>) to ascertain the presence of Fe and O in Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles.

Figure 1 (a) shows that the lyophilised CH sample consists of a network of more or less large macropores (pore diameter > 50 nm) separated by walls made of chitosan polymer. The larger ones are about 1 mm in diameter. The presence of mesopores (2 nm < pore diameter < 50 nm) that can be observed at higher magnification is consistent with the largest mesoporous volume. By contrast, the lyophilised I-CH bead has a very smooth surface with rough edges consisting of spherical nanoparticles arranged from chitosan chains (Figure 1 (b)) in agreement with its lowest S<sub>BET</sub>. The (c) and (c') images (Figure 1) of M-CH show aggregates of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles (100-200 nm diameter for the elementary particle) supported on the macroporous chitosan matrix. However, this biopolymer matrix of M-CH is significantly less porous than CH. Surface of I-MCH bead (Figure 1 (d)) displays a rather smooth surface similar to I-CH, with additional nanoparticle aggregates identified by EDS as Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (top right corner).

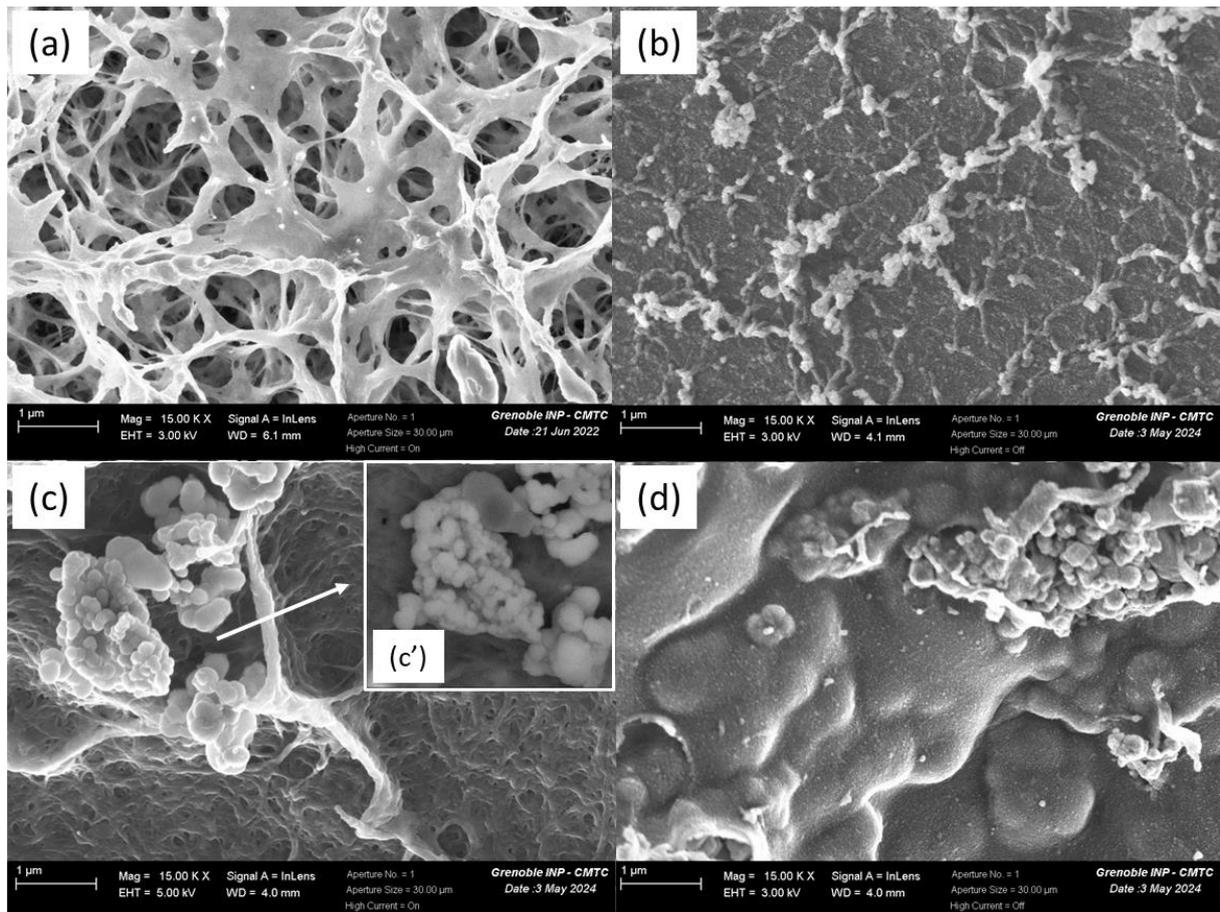


Figure 2. SEM images (magnification  $\times 15000$ ) of the surface of various freeze-dried hydrogel beads (a) CH, (b) I-CH, (c) M-CH and (d) MI-CH. The (c') insert represents aggregates of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles observed in the back-scattered electron mode.

## 2.2 Virus stock production

The murine norovirus MNV-1, a surrogate for human norovirus, was used as internal control in all experiments.

MNV-1 (ATCC VR-1937) was propagated by infecting a confluent RAW 264.7 cell line (ATCC TIB-71) as described in Delafosse *et al.* (2022). Stocks were quantified by TCID50 (Tissue Culture Infective Dose 50%) and RT-qPCR (Reverse-Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction), then diluted to about  $1\text{E}08$  genome copies per mL ( $\text{gc.mL}^{-1}$ ), before being used in samples spiking

## 2.3 Wastewater sampling

24 h-integrated wastewater samples were collected in July 2021 from the Aquapole WWTP, in Grenoble, France, and transported to the laboratory at  $4^\circ\text{C}$  within one hour. The WWTP treats both, industrial wastewater, and domestic wastewater from a population of approximately 470

000. Rainwaters are partly collected by the sewage system; no rainfalls were recorded during the 24 h prior to our wastewater sampling.

2 mL of MNV-1 spiked ( $\approx 1E07$  gc.mL<sup>-1</sup>) wastewaters were aliquoted for adsorption experiments.

## 2.4 Virus adsorption

Adsorption experiments were performed thrice, in triplicates.

The volume of the virus suspension was adjusted so that the chitosan beads (either hydrogels or re-hydrated lyophilised beads, depending on the assay) were fully immersed, without excess, ensuring the smallest distances between viruses and sorbent surfaces. In detail, 2 mL of a calibrated MNV-1 suspension (about  $5E06$  gc.mL<sup>-1</sup>) in NaCl 0.1M (AppliChem GmbH, Germany) were added in a 15 mL centrifuge tube containing 1 mL equivalent volume of chitosan beads. Samples were then incubated at room temperature under a continuous 30 rpm rotative agitation. After a given contact time (4 h for equilibrium studies), the beads were separated from the suspension. The suspension was collected into another tube for the RNA extraction, while the beads were subjected to virus recovery assays. The positive control, used as reference for adsorption and recovery rate calculation, was a virus suspension to which no chitosan beads were added. The negative control was chitosan beads in 2 mL NaCl 0.1M. Both controls were incubated under the same conditions as the samples.

The kinetic experiments were performed on raw, and copper imprinted lyophilised chitosan beads (L-CH and LI-CH, respectively) previously rehydrated after immersion in ultrapure sterile water and vigorous stirring during 24 h. In these experiments, contact time with a  $4.11E06$  gc.mL<sup>-1</sup> MNV-1 suspension, ranged from 0 to 4 h.

The effect of weight adsorbent on CH and L-CH (rehydrated samples) adsorption was obtained from equilibrium adsorption studies in which beads load ranging from 2 to 28 mg (number of beads from 5 to 70) were placed in contact for 4 h with a  $4.62E06$  gc.mL<sup>-1</sup> MNV-1 suspension.

## 2.5 Virus recovery studies

The goal of these experiments was to reverse or counteract some of the main forces involved in adsorption, namely, electrostatic (ionic strength), Van der Waals and hydrophobic forces. As an alternative, the enzymatic degradation of the chitosan itself, by means of a chitosanase, was also assessed to indirectly release previously adsorbed virus. Different combinations of ionic strength, pH, enzymatic treatment, and surfactant addition were tested in triplicate, resulting in 7 versions of the recovery protocol (Table 3).

Table 3. Recovery protocol designs. Relevant modified parameters are highlighted (grey cells). The surfactant was Tween 20® (AppliChem GmbH, Germany).

Protocol number	Ionic strength (mol.L <sup>-1</sup> )	pH	Enzymatic treatment	Temperature (°C)	Surfactant concentration (%vol)	Recovery treatment incubation time (min)
1	2	7.0	No	40	0	120
2	0.1	9.0	No	40	0	120
3	0.1	7.0	Yes	60	0	15, 30, 60 or 120
4	0.1	7.0	No	40	0.5	120
5	2	7.0	Yes	60	0	15 (chitosanase) 10 (NaCl 2M)
6	0.1	8.2	Yes	60	0	15 (chitosanase) 10 (pH 8.2)
7	2	8.2	Yes	60	0	15 (chitosanase) 10 (NaCl 2M) 10 (pH 8.2)

#### Detailed protocols:

- (1) Effect of a high ionic strength: chitosan beads were incubated in a 2M NaCl solution at 40°C, for 2 h.
- (2) Effect of pH: a pH 9 phosphate buffer saline (PBS) was prepared from 0.1M solutions of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and NaOH (AppliChem GmbH, Germany). 2 mL of buffer were added to the beads before being stirred at 1400 rpm at 40°C, for 2 h.
- (3) Enzymatic degradation: an 18.9 international units.mL<sup>-1</sup> chitosanase solution was prepared extemporaneously by dissolving food-grade powdered chitosanase (GreenStone Swiss Co., China) in warm autoclaved ultrapure water. It was then kept warm under agitation until it became a clear, amber-coloured solution. 3.5 mL of this solution was added onto the chitosan beads and the mixture was incubated in a ThermoMixer® (Eppendorf, Germany) set at 1400 rpm and 60°C, for 15 to 120 min.
- (4) Surfactant addition: chitosan beads were incubated for 2 h at 40°C in 2 mL of a 0.1M NaCl solution in which Tween 20® (AppliChem GmbH, Germany) was added to a 0.5 % vol final concentration.
- (5) and 6. Protocols combining two successive beads' incubations: first in the chitosanase solution for 15 minutes, then, in a 2M NaCl solution for 10 minutes, (5), or in a solution at pH 8.2 (6).
7. Protocol combining three successive beads' incubations: first in the chitosanase solution for 15 minutes, then, in a 2M NaCl solution for 10 minutes, and lastly, another 10 minutes in a pH 8.2 solution.

After incubation in the recovery solution, the liquid was carefully separated from the beads and transferred to another tube for RNA extraction. The analysis of the extract by RT-qPCR yielded to the number of viruses collected in the liquid, from which the recovery efficiency was estimated.

## **2.6 RNA extraction**

All triplicates, RNA extraction and purification were carried out using NucliSENS® reagents (Biomérieux, France) and the semi-automated eGENE-UP® platform (Biomérieux, France) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, virus lysis was performed by incubating samples for 30 min at room temperature after the addition of a lysis buffer at a 1:1 volume ratio. 50 µL of NucliSENS® easyMAG® magnetic silica beads were then added to the lysate and allowed to bind nucleic acids for 15 min at room temperature with repeated pipetting mixing. The beads were then successively washed with the three NucliSENS® extraction buffers and eluted in 100 µL of the third one. The eluted beads were vortexed and heated for 5 min in the ThermoMixer®, set at 1400 rpm and 65°C, to allow the release of nucleic acid from the beads. After a centrifugation at 480 x g for 30 s, the supernatant (hereafter referred as RNA extract) was carefully transferred into sterile microcentrifuge tubes and stored at -20°C.

## **2.7 Molecular quantification by RT-qPCR and inhibition assays**

Reverse-transcription qPCR (RT-qPCR) was performed using the TaqMan Fast Virus One-Step Master Mix (Applied Biosystems™, USA) with a total reaction volume of 20 µL and Abiolab's in-house primers and probe. The reaction mixtures contain 0.4 µM of forward primer (5'-TGG AAC AAT GGA TGC TGA-3'), 0.8 µM of reverse primer (5'-GCT GCG CCA TCA CTC-3'), 0.1 µM of probe (5'-Texas Red-CCG CAG GAA CGC TCA GCA GT-BHQ2-3') and 5 µL of Master Mix. RT-qPCR was performed using a LightCycler® 480 thermocycler (Roche, Switzerland), with the following thermal cycling conditions: 50 °C for 5 min, 95 °C for 5 min, and 45 cycles of 95 °C for 20 s and 60 °C for 40 s (data acquisition step). Corresponding MNV-1 positive control and autoclaved ultrapure water negative control were used to validate the results. qPCR analysis of each sample was performed in duplicate.

Raw results from the thermocycler were analysed using the LightCycler® 480 software (Roche, Switzerland). Data were then gathered and managed using Microsoft Excel (Microsoft Corp., USA). Cycle quantification (Cq) levels were manually set at the point where the sample internal positive control started its exponential increase. The standard curve was derived from the log<sub>10</sub>-linear regression of the duplicate Cq values, with the following parameters: Linearity R<sup>2</sup> = 0.9981; Slope = -3.39; Efficiency E= 97.1%; Y-intercept = 43.3.

The limit of detection was estimated at 10 genome copies per reaction, according to the lowest number of diluted standards detected in duplicate by the instrument.

As they could be anticipated, possible inhibitions of RT-qPCR by chitosan or chitosanase were investigated. The assumption was rejected as no such interferences was found in our analysis of chitosan and chitosanase extracts directly seeded with MNV-1 RNA (all within  $\pm 1$ -Cq values on either side of the reference value).

The total number of seeded MNV-1 (copies quantified by RT-qPCR) was used as a reference (100%) in both formulae to estimate virus adsorption and recovery efficacies.

Percentage of adsorbed MNV-1 were computed using the following formula:

$$\text{Adsorption (\%)} = \frac{\text{RNA copies seeded} - \text{RNA copies in the suspension after adsorption}}{\text{RNA copies seeded}} \times 100$$

Recovery efficacy was calculated as follow:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{RNA copies in recovery solution}}{\text{RNA copies seeded} - \text{RNA copies in the suspension after adsorption}} \times 100$$

### 3. Results

#### 3.1 Adsorption efficiency of the chitosan beads

##### 3.1.1 Adsorption kinetics

Adsorption of MNV-1 is the first step in the chitosan-based capture/recovery sampling protocol.

One of the key parameters is the minimum contact time allowing a maximum virus amount to be adsorbed. This value was obtained from the adsorption kinetic experiments performed on raw and copper-imprinted lyophilised chitosan beads (L-CH and LI-CH, respectively) which had been previously rehydrated after immersion in ultrapure water and vigorous stirring for 24 h.

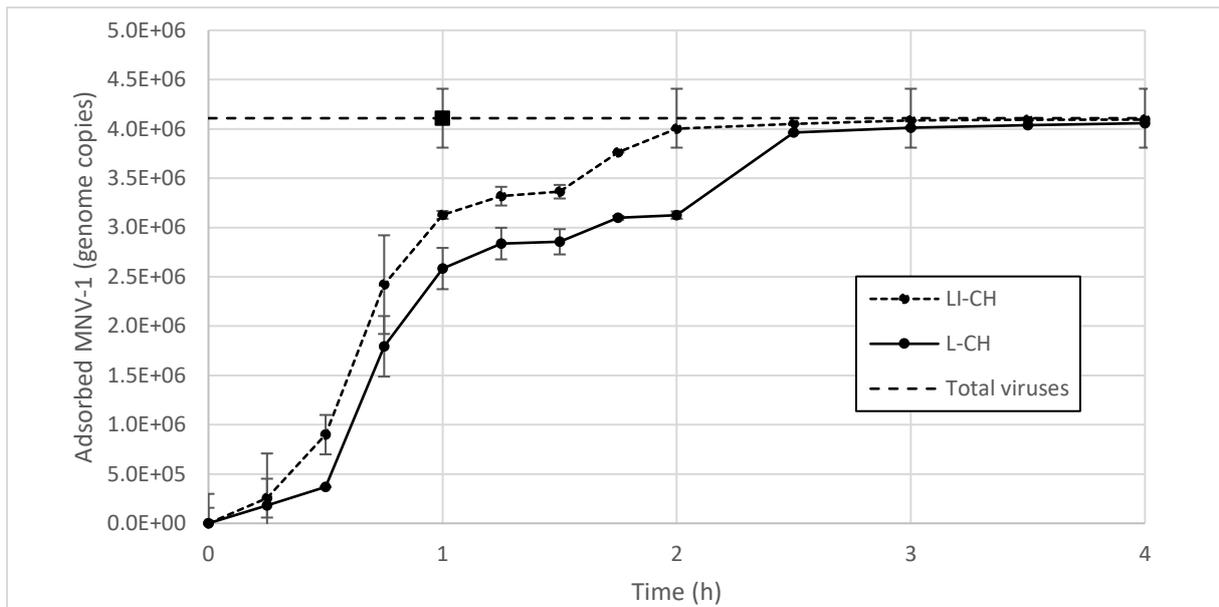


Figure 2. MNV-1 adsorption kinetics on raw (L-CH) and copper-imprinted (LI-CH) rehydrated-lyophilised chitosan hydrogel beads (100 mg dry weight). The dashed line represents the initial number of viruses in the suspension in which L-CH beads were added ( $4.1E06 \pm 0.3E06$  genome copies). Error bars represent the median absolute deviation.

Both materials display a high adsorption capacity, with  $99.9 \pm 0.1\%$  of the seeded MNV-1 disappearing from the suspension after 2.5 hours contact time (Figure 2). The adsorption curves display an apparently lower adsorption rate for L-CH during the first 30 minutes of contact time (9% of viruses adsorbed on L-CH compared to 22% on LI-CH after 30 minutes). This could be related to the higher specific surface area of CH ( $S_{BET} \sim 59 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) compared with the lower one of the LI-CH ( $S_{BET}$  around  $10 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) probably associated to a slower diffusion of virus particles toward the adsorption sites, particularly throughout the interstitial water enclosed in the mesoporous volume.

As the adsorption then progressed at a similar rate for both materials, a corresponding offset was observed between the maximum values reached 30 min later.

In this experiment, it was not possible to conclude about the maximum adsorption capacity of the materials (in genome copies per g of material), as all viruses were adsorbed before an equilibrium was reached.

In all subsequent experiments, a contact time of four hours was chosen for this step of the analysis to ensure that all viruses were retained.

### 3.1.2 Variation of virus adsorption efficacy as a function of the amount and type of chitosan beads

To obtain approximate value for the adsorption efficacy of the two materials, five different amounts of CH and rehydrated L-CH beads were added to a  $9E06$  genome copies MNV-1 suspension (Figure 3).

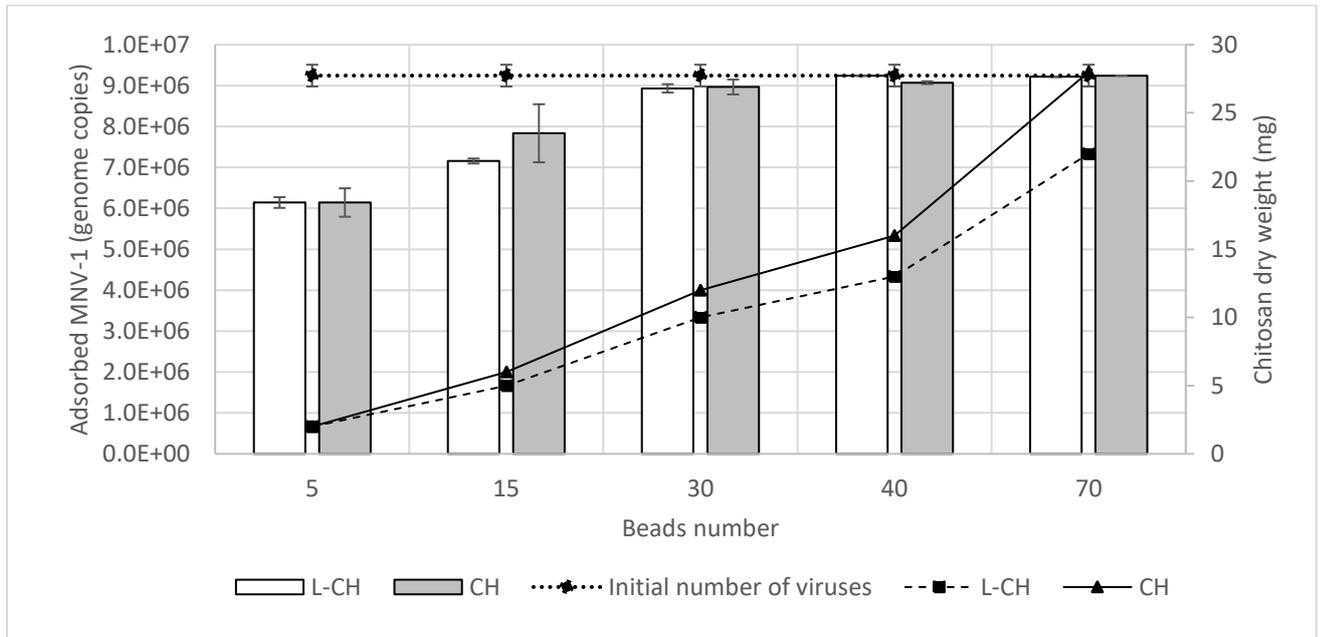


Figure 3. Variation of MNV-1 adsorption (after a 4 h contact time) of rehydrated-lyophilised (L-CH) and hydrated (CH) raw chitosan beads versus increase in adsorbent material (number of beads). The dotted line represents the initial number of viruses in the suspension. Dashed and solid lines are L-CH and CH beads dry weight respectively. Error bars represent the median absolute deviation.

As materials saturation values were not available, the optimisation of the virus/adsorbent ratio was sought by measuring the adsorption efficacy with increasing the number of beads.

As illustrated on Figure 3, MNV-1 adsorption increased with the amount of chitosan added to the viral suspension. From 30 beads (corresponding to 10 and 12 mg of dry mass of rehydrated LI-CH or CH, respectively) and beyond, nearly all viruses (98%) were adsorbed, whatever the bead type. It demonstrates that, once again, the virus suspension was the limiting factor, as it was not concentrated enough to allow the saturation of the adsorption sites. The two types of chitosan beads can then only be compared from the 5 and 15 beads assays, *i.e.* a chitosan weight of less than 10 g. These show that lyophilisation did not significantly affect the adsorption efficiencies.

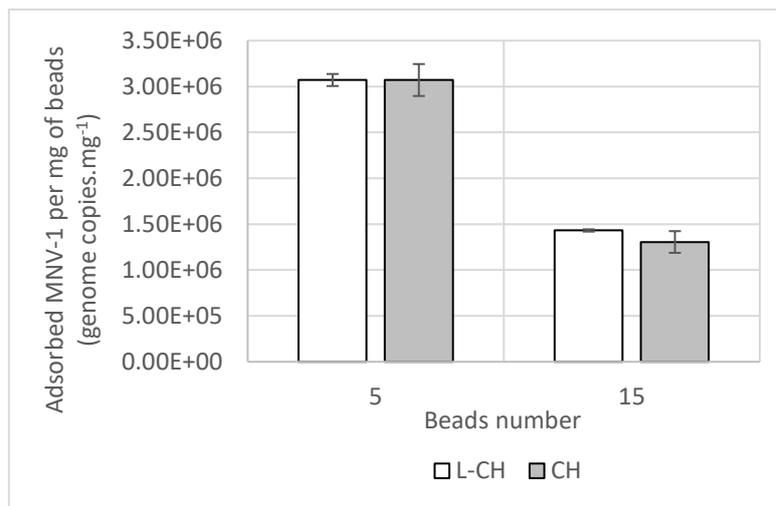


Figure 4. Variation of MNV-1 adsorption per adsorbent weight (samples raw (CH) and rehydrated-Lyophilised (L-CH) Chitosan Hydrogels) as a function of the number of beads. Error bars represent the median absolute deviation.

The adsorption capacities of the CH and L-CH beads turned to be very different, clearly depending on the weight of adsorbent beads in contact with MNV-1. (Figure 4). It is noticeable to observed that its value decreases when the amount of adsorbent increases: the adsorption capacity was 2.6 times lower with the 15 beads batch than with the 5 beads batch.

### 3.2 Solutions assayed for adsorbed virus recovery

The direct application of the lysis buffer onto the virus-loaded beads failed to extract the MNV--1 RNA (data not shown). Suspecting the beads interference in viruses releasing, a two-steps protocol was set up in which the viruses were first released from the beads, and then, in a second step, the liquid containing the collected viruses was separated from the beads before receiving the lysis buffer.

Four different experimental conditions were tested, each framed within the constraints related to the nucleic acid analysis: high ionic strength, high pH, enzymatic degradation, and surfactant addition. High ionic strength was supposed to modify the interaction forces between the virus particle and the adsorbent surface electrical double layer (Schaldach *et al.* 2006). By modifying the isoelectric point of viruses, high pH was intended to reduce the attractive forces due to the chitosan surface charges. The enzymatic endo-hydrolysis of the chitosan was expected to release the virus particles from the polymer chains. Lastly, the weakening of the CH surface tension was assayed by adding a surfactant to the 0.1 M NaCl solution into which the beads were introduced

Results are presented from two perspectives: the virus analysis (quantification, identification), where a minimum virus concentration is required for the application of techniques such as RT--qPCR or RNA sequencing, and the recovery efficacy expressed as a percentage of the number of viruses previously adsorbed on CH. To some extent, low values are less detrimental

for recovery efficiency than they are for virus concentration assessment, as the number of viruses collected may be large enough to be amplified prior to analysis.

### 3.2.1 Comparison of the four virus recovery approaches

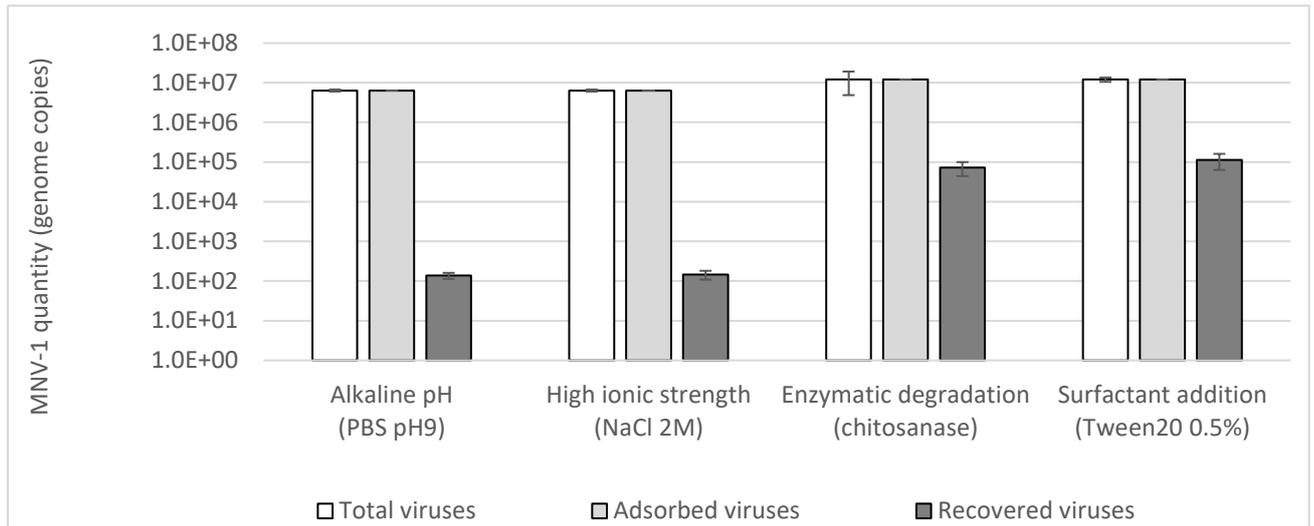


Figure 5. Virus recovery tested on CH beads after 4 h virus adsorption time. CH beads were then separated from the suspension and added into four types of elution solutions aiming to assess the effects of increasing pH, increasing ionic strength, hydrolytic degradation of CH and addition of a surfactant. Error bars represent the median absolute deviation.

High ionic strength (protocol 1) and high pH (protocol 2) resulted- in poor virus recovery, less than 0.01% of the adsorbed viruses. The values obtained by chitosanase catalytic degradation (protocol 3), and surfactant addition (protocol 4) were more promising but still with very low values, reaching  $0.6 \pm 0.2\%$  and  $0.9 \pm 0.3\%$ , respectively (Figure 5). Nevertheless, the amounts of virus recovered from both the cumulative adsorption and recovery processes, were in all cases high enough to support further analysis such as -RT-qPCR.

The quantities of virus released by chitosanase, and surfactant solutions were quite close, reaching  $7.2 \pm 2.8E04$  and  $1.1 \pm 0.5E05$  genome copies, respectively (Figure 5). As none of these appeared to be more efficient than the other, we chose to keep on with the enzymatic degradation, as it seemed the most promising method at this stage of the study.

### 3.2.2 Optimisation of the chitosan-based virus recovery protocol

#### 3.2.2.1 Comparison of chitosan hydrogel beads made by simple gelation (CH) and by copper imprinting (I-CH)

Virus recovery was measured after incubating CH beads and I-CH beads in an MNV-1 suspension for 2 h (Figure 6).

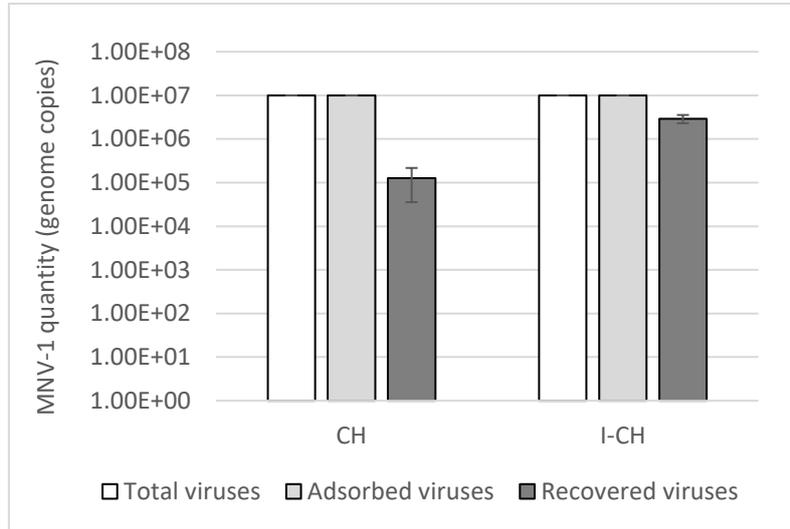


Figure 6. Study of MNV-1 recovery from copper-Imprinted (I-CH) and raw (CH) Chitosan Hydrogel beads by a chitosanase-catalysed degradation. Error bars represent the median absolute deviation.

In terms of the adsorption, the results of the two types of beads were consistent with those previously obtained, with an adsorption efficacy of 99.9 % of the viruses seeded, again demonstrating that chitosan imprinting did not change the adsorption performance.

In terms of the recovery, I-CH beads were associated with a higher virus release than those of CH ( $29 \pm 6$  % of the total amount of adsorbed viruses, versus  $1 \pm 1$  %, respectively).

In addition to its performances, I-CH has several drawbacks mainly related to its -time-consuming production process. Therefore, it was not included in the subsequent experiments.

#### 3.2.2.2 Effect of the lysis step position along the chitosanase protocol sequence, on the virus recovery performance

Based on the assumption that the low level of virus' recovery observed in the previous experiments, resulted in a large number of viruses still adsorbed on the beads, a new attempt was made to extract nucleic acids directly from these viruses, this time in combination with an enzymatic treatment (described in Figure 6). The CH degradation was expected to reduce its potential interference with the lysis buffer, thus allowing a more efficient nucleic acids

extraction. In this experiment, two options were compared (framed by the dotted line in Figure 7) depending on whether the lysis buffer was added to the chitosanase recovery solution while it still contained the beads or after they had been removed.

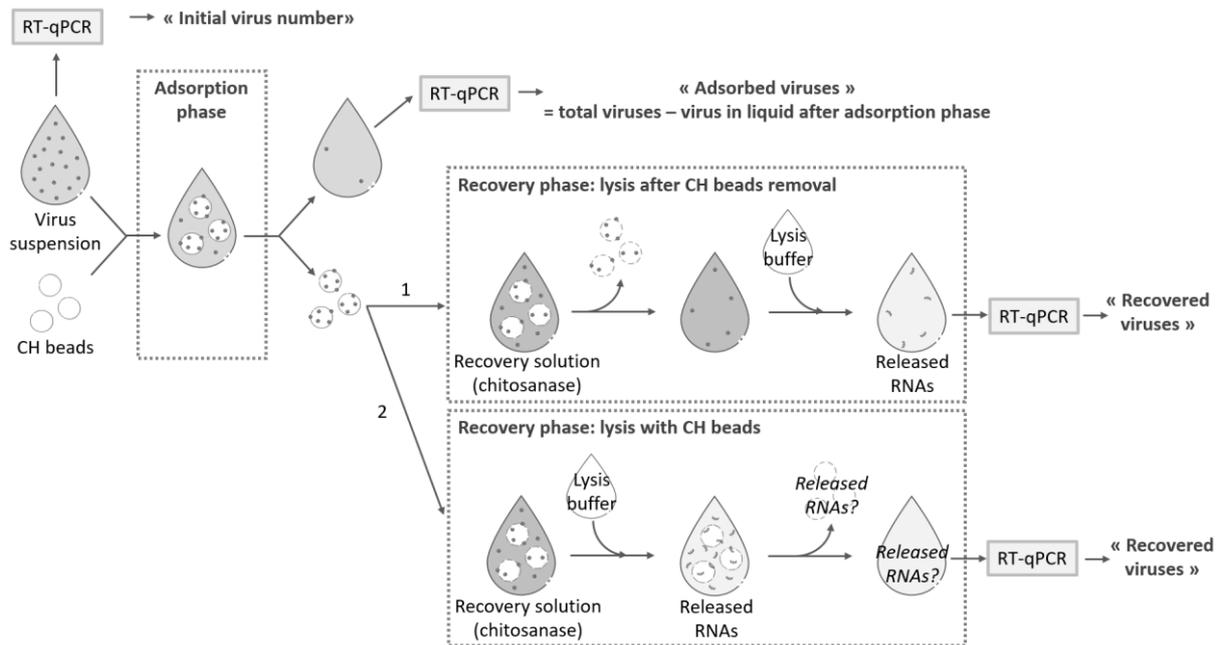


Figure 7. Design of the two-step experiment (adsorption - recovery). "Initial virus number" = number of viruses in the initial virus suspension. RVS = remaining viruses in the suspension at the end of the 4 h adsorption phase. Quantity of adsorbed viruses = IVN - RVS. Recovery phase (2h): two options depending on whether the lysis buffer was added to the solution after removal of the beads (option 1) or left in the solution (option 2).

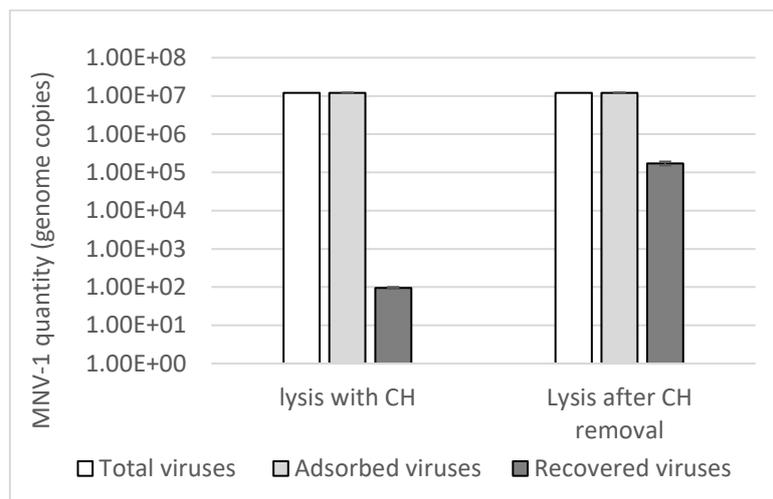


Figure 8. Comparison of the virus adsorption and recovery with raw CH beads. Recovery was performed using two protocols: 1) lysis buffer directly added to the chitosanase solution containing the beads after 2 h of incubation, 2) beads removed from the chitosanase solution before the addition of the lysis buffer. Error bars represent the median absolute deviation.

As shown in Figure 8, the virus recovery appeared to be strongly affected by the presence of the beads at the time of lysis buffer addition, with only 0.001% of the adsorbed virus being recovered, whereas the percentage reached 1.4 % when the beads were removed.

The adsorption of, at least, some of the released nucleic acids on the remnants of the degraded beads and/or on some of the hydrolysed chitosan chains could be expected. It was supported by the results of an experiment in which CH beads were added to a solution of MNV-1 RNA (Figure 9), which showed that more than 99% of the MNV-1 genome copies were adsorbed on the material within the first 15 minutes.

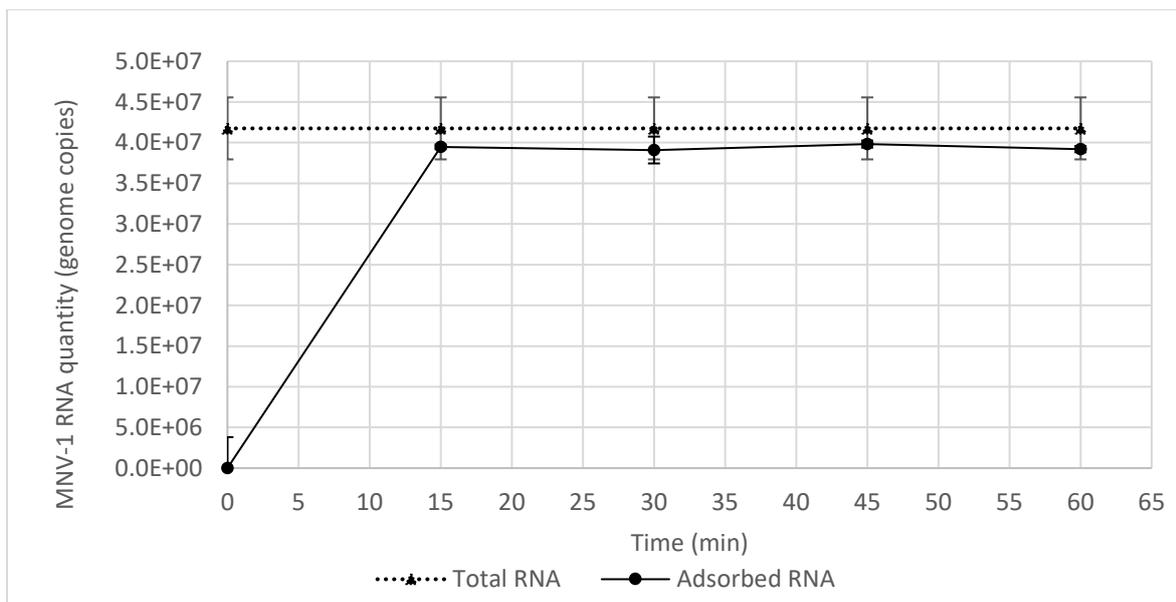


Figure 9. Adsorption of MNV-1 nucleic acids on raw Chitosan Hydrogels (CH) after incubation with chitosanase for different time periods: 15-, 30-, 45- and 60-min. Error bars represent the median absolute deviation.

This result implied that the viruses must be separated from the beads prior to the lysis buffer addition. All experimental protocols were then implemented accordingly.

### 3.2.2.3. Effect of the chitosanase contact time on the viruses' recovery

Seeking for an optimum recovery, contact times between virus-loaded CH beads and the chitosanase solution were investigated, ranging from 5 minutes to 2 hours (Figure 10).

The highest recovery of MNV-1 ( $72 \pm 9$  % of the adsorbed viruses) was achieved after 15 min (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). The recovery values then gradually decreased with increasing contact time, suggesting the onset of counteracting processes, one of the most likely being some kind of virus re-adsorption processes.

Low virus recovery values were observed after 5- and 10-min contact time (less than 1 %). This might be due to the delay required for the chitosanase enzymatic reaction to develop

sufficiently to release the viruses. The diffusion rate of the chitosanase into the porosity of the materials was probably one of the determining factors.

Assuming that the above hypothesis are correct, it means that the optimal virus recovery performance was achieved at a time when sufficient chitosanase activity and weak hypothetical virus re-adsorption occurred.

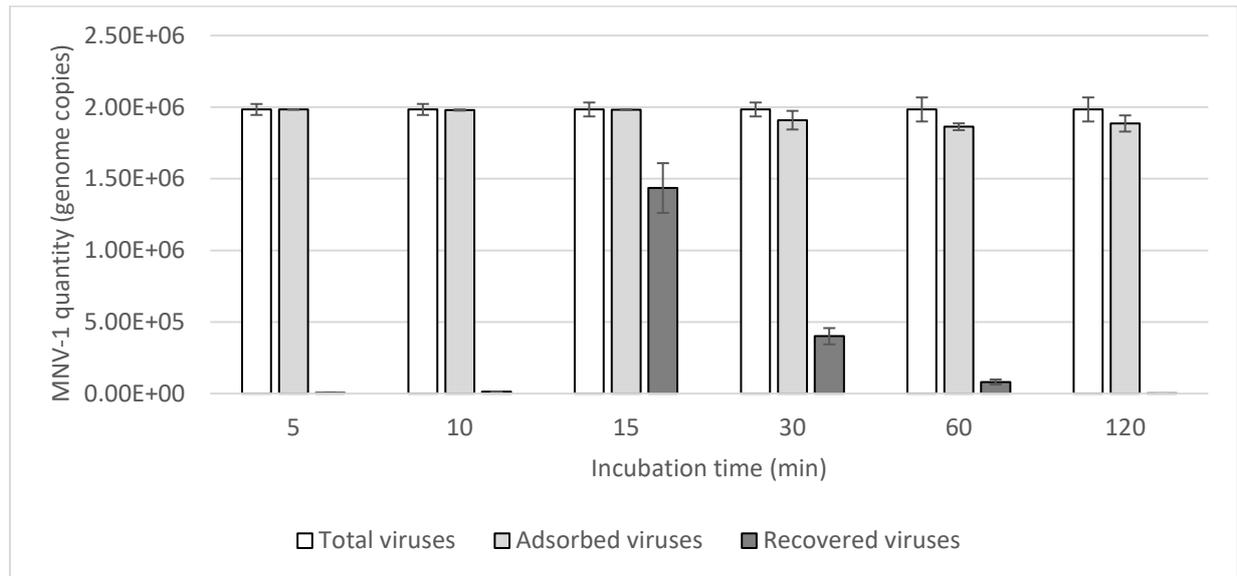


Figure 10. Effect of the contact time between CH beads and chitosanases on the MNV-1 recovery. Error bars represent the median absolute deviation.

#### 3.2.2.4 Combined recovery protocols including a first enzymatic beads' degradation step and a second elution step

In these assays, a possible improvement in the virus recovery was expected if the chitosanase incubation was followed by an elution step, while maintaining optimal conditions for the chitosanase activity (*i.e.* 15 min of contact time) (Figure 11).

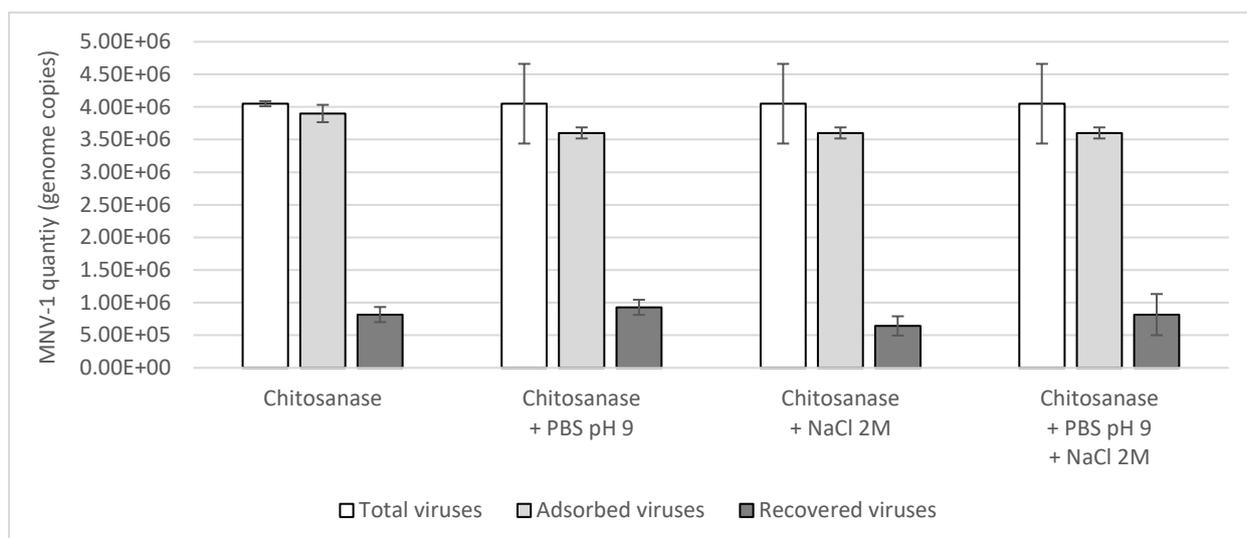


Figure 11. Virus recovery by chitosanase-catalysed degradation of raw CH alone (15 min incubation), or in combination with other elution treatments: high ionic strength (NaCl 2M), high pH (pH 8.2) and both together. Lysis buffer was added to the suspension after removal of the beads. Error bars represent the median absolute deviation.

As shown in Table 4, all recovery efficiencies from the extended chitosanase protocols were close to each other (about 22% on average), as well as to the value observed after the 30 min incubation in the chitosanase single treatment. Although the incubation times are different, we may consider that the comparison is appropriate as the 30 min incubation time is in between the 25 min and 35 min total incubation times of the combined treatments. It may then be concluded that the recovery efficacy was not significantly improved with the combined treatments.

Table 4. Values of virus recovery efficacy resulting from a chitosanase treatment alone (treatment 1) and from 3 treatment combinations. All combinations started with a 15 min incubation of raw CH beads in the chitosanase solution. PBS pH 9 and/or NaCl 2 M were then added to the mixture (sequentially in the case of treatment 4) and incubated for a further 10 min (2 x 10 min in treatment 4).

Treatment number	Recovery solutions combination	Incubation time (min)	Recovery efficacy (%)
1	Chitosanase	30	21 ± 3
2	Chitosanase + pH 8.2	25 (15+10)	26 ± 2
3	Chitosanase + NaCl 2M	25 (15+10)	18 ± 4
4	Chitosanase + pH 8.2 + NaCl 2M	35 (15+10+10)	23 ± 9

### 3.2.2.5 Preliminary experiment on the use of a chitosan-based material for wastewater sampling

All previously described experiments were performed on NaCl 0.1M MNV-1 suspensions. They could not be ended without an attempt to apply our chitosan-based sampling protocol to a wastewater, which is its intended final destination.

The experiment was conducted as an in-lab study where four types of chitosan-based beads were immersed in a freshly sampled wastewater, from the inlet of a medium-sized urban WWTP (Grenoble Aquapole), which was spiked with MNV-1. Beads containing Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles were included in the comparison with the perspective that of facilitating their recovery from the sampled water using their magnetic properties.

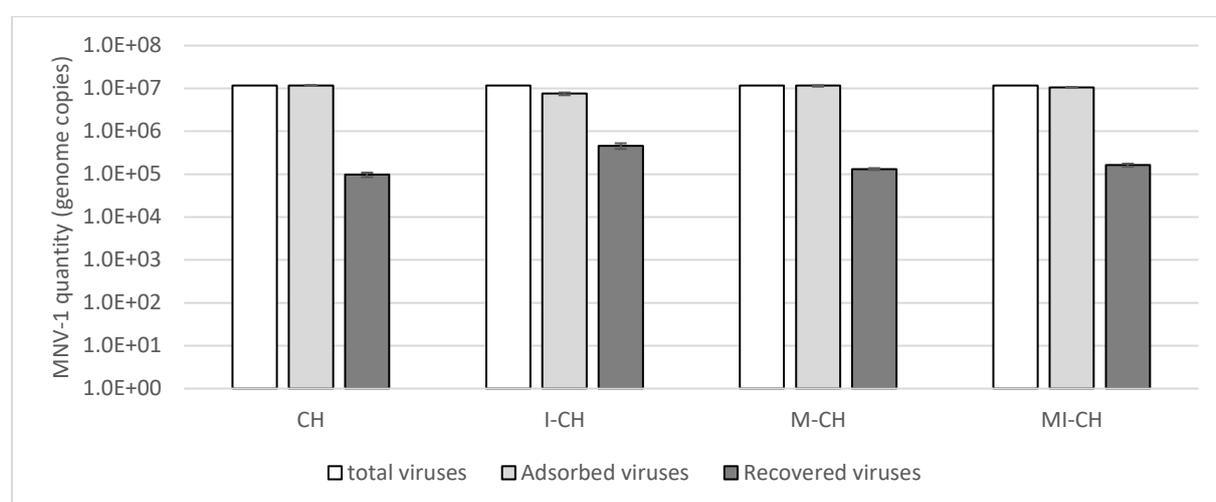


Figure 12. MNV-1 adsorption and recovery from wastewater with different types of beads: CH: raw Chitosan Hydrogels, I-CH: Cu-Imprinted Hydrogels, M-CH: Magnetic Hydrogels, and MI-CH Magnetic Cu-Imprinted Hydrogels. Adsorption: 4 h incubation in 2 mL spiked wastewater. Recovery: 15 min incubation in an 18.9 iu/mL chitosanase solution. Error bars represent the median absolute deviation.

Imprinted beads gave slightly lower adsorption values (although well-marked with I-CH, 65% vs 91 % with MI-CH) than raw -CH beads (99 %) (Figure 12) whereas no such difference was observed with the 0.1M NaCl MNV-1 suspension (section- 0)

The adsorption capacity may then be enhanced by the addition of magnetite.

Virus recovery was higher with I-CH beads (6%) than with raw CH beads (1%) (Figure 12). Symmetrically with non-magnetic beads, MI-CH beads were associated with higher virus recovery values (2%) than M-CH beads (1%). Thus, copper imprinting seems to have improved the virus recovery, whether the beads are magnetic or not, although the performance of I-CH beads appeared to be reduced by the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> addition ( $1.5 \pm 0.1$  % vs  $6.0 \pm 0.7$  % for non-magnetic I-CH).

### 3.2.3 Possible concerns related to the chitosanase grade

In order to establish a cost-effective operating protocol, a food grade batch of chitosanase was used, from the start of our experiments, although it was recognised that some variability in the composition of the product could be expected.

This was checked at the end of our experiments, when a new batch of the same chitosanase grade, ordered from the same chemical company was received.

The two parts of the same batch of CH beads, previously loaded with MNV--1 and split, were used to compare the two chitosanase batches (contact time 15 min).

*Table 5. Comparison of two batches of chitosanase for their efficiencies in recovering MNV--1 from the same batch of CH beads. Recovery protocol: 15 min incubation in the 18.9 iu/mL chitosanase solution.*

Chitosanase batch	Adsorption efficacy	Recovery efficacy
lot #1	100 ± 0 %	72 ± 9 %
lot #2	100 ± 0 %	< 1 ± 0 %

As displayed in In order to establish a cost-effective operating protocol, a food grade batch of chitosanase was used, from the start of our experiments, although it was recognised that some variability in the composition of the product could be expected.

This was checked at the end of our experiments, when a new batch of the same chitosanase grade, ordered from the same chemical company was received.

The two parts of the same batch of CH beads, previously loaded with MNV--1 and split, were used to compare the two chitosanase batches (contact time 15 min).

Table 5, the lot #2 chitosanase yielded a very low virus recovery value. Several other examples of such a variability were found in many of our subsequent assays (not shown here). The inherent variability of the food grade chitosanase (probably related to the origin of the chitin and the proportion and composition of the excipient) appears to be a critical parameter to be considered in further studies to improve the protocol.

## 4 Discussion

While most chitosan-related studies are oriented towards adsorption of chemicals (heavy metals, pesticides, etc.), our work adds new data to the very few number of publications where chitosan adsorption properties are related to viruses.

As mentioned above, our aim in this work was to use chitosan, not only to collect non-enveloped viruses from aqueous media, but mainly to retrieve them for further genomic analysis.

### **Chitosan hydrogel beads adsorption efficacy**

In our experiments, at least  $7.5E05$  viruses were adsorbed per milligram of CH confirming the CH high adsorption efficacy of this type of particles. If all the CH surface was appropriate for viruses' attachment, such number of viruses would be far from being able to saturate the material. Indeed, assuming that the MNV-1 particle matches a 30 nm radius sphere, the total surface occupied by these  $7.5E05$  viruses would be about  $\sim 2E-09 \text{ m}^2$  (half sphere projection), whereas the surface area of the chitosan beads is expected to be close to  $6 \text{ m}^2$  (0.1 g of chitosan of SBET  $59 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ). It would be true even with the initial virus concentration of the suspension, around  $4E06 \text{ gc} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

The hypothesis that all the CH surface is not appropriate to virus adsorption due to some specificity of the ways they attach to the material, may also be considered.

In this study, the use of two parameters commonly defining the performance of adsorbents, is extended to viruses as adsorbates.

*Adsorption Capacity (AC)* is defined as the amount of adsorbate adsorbed per unit mass of the adsorbent at the time when an equilibrium between the suspension and the beads is established. In our study which is concerned with virus concentration, this is the time when no additional virus has been adsorbed on the chitosan. The second parameter, the *adsorption efficiency*, is oriented toward the adsorbate. It is defined as the percentage of viruses that disappeared (supposedly adsorbed) from the suspension, by reference to their concentration in the suspension before the adsorbent was added. It can be calculated at any time, thus requiring the specification of the contact time at the end of which it was evaluated.

In order to ensure the collection of the maximum number of viruses from the studied waters, we intended to calculate the optimal number of beads to be added to the samples, based on a value of the chitosan AC. To this end, first, we had, to find experimental conditions where an equilibrium between the suspension and the beads was reached. In our assays, it was achieved with the 5 and 15 beads batches (Figure 3 and Figure 4). However, the results show unexpectedly large differences between the AC values derived from each of the two assays:  $AC_{5\text{beads}} = 2.6 AC_{15\text{beads}}$ . Our hypothesis is that this discrepancy can be attributed to the heterogeneity of our beads with regard to several parameters including diameter, porosity distribution and the extent of the channels through which viruses may disseminate throughout the bead volumes. The diameter of the beads may have played a significant role in the observed difference as it is included in the denominator of the adsorption capacity formula ( $AC = \text{adsorbed virus} / \text{CH density} \times 4/3 \times \text{PI} \times (D/2)^3$  with D as diameter). Given the observed average variability of the beads' diameter ( $\pm 15 \%$ ), it can be estimated that its contribution to the AC variations may have been by a range of  $+63 \%$  to  $34 \%$ , depending on whether the radius was above or below the average value. Then, despite the conclusive performance of

chitosan as adsorbent, even after being transformed, like after lyophilisation, its usefulness may be compromised by the heterogeneity of the beads which is related to the technique used for their production. Such heterogeneity may undermine any attempt to discriminate virus groups based on some specificities in their attachment to the chitosan and then, studies aiming at the assessment of their relative abundance.

The lower value of AC observed with the batch of 15 beads compared with the batch of 5 beads can be explained by the decrease of the ratio of the initial quantity of virus particles to the total number of adsorption sites as the number of beads increases, shifting the adsorption equilibrium according to the Le Chatelier's principle. The Freundlich-type isotherm is expected for modelling the equilibrium adsorption of MNV-1 as reported for the adsorption of other types of viruses on solid surfaces (Gerba, 1984), but to our knowledge no adsorption isotherm of MNV-1 viruses on solid surface has been reported previously. The MNV-1 virus particles are more likely to be adsorbed on some preferential sites. The heterogeneity of the surface of the beads (Figure 1), suggests that there are preferential adsorption sites for MNV-1 particles (those with a high energy of interaction with the viruses having a pore diameter larger or close to the virus diameter size). The proportion of these preferential sites occupied is greater when there are more adsorption sites compared to the initial number of viruses (i.e. when the number of beads is greater). Desorption is then, more likely to occur with a lower proportion of preferential sites occupied. This suggests that the weaker virus – surface site interactions may have contributed to a greater extent to the virus detachment in the 5 beads assay than in the 15 beads assay.

Our results agree with previous references (Gerba, 1984) which considered the adsorption of viruses as similar to colloidal particles. However, they also suggest that, due to their size and the complexity of their structures, they cannot be treated with the same criteria as the ones used with non-biological particles, either mineral or organic, and dissolved substances.

### **Virus recovery from CH beads**

The amount of virus adsorbed on an adsorbent is the result of an equilibrium between adsorption and release mechanisms. Retrieval of the virus from the bead surface can then be achieved by unbalancing these two processes, i.e. enhancing release and/or impairing reattachment. This was the expected result from immersing the beads in a high ionic strength solution (NaCl 2M), where the high ionic concentration should inhibit virus attraction to the bead surface (Schaldach *et al.*, 2006). In the 8.2 pH solution, the zeta potential of the bead surface was shifted to negative values (the isoelectric point of CH is at pH 8). This should result in repulsive electrostatic forces between the two negatively charged entities, beads and viruses, promoting the desorption.

The elevated virus recovery, though, less than 1 %, achieved by elution with the surfactant solution was probably due to an increase in the surface hydrophilicity of both the virus particles and the chitosan beads, and thus a decrease in the hydrophobic-hydrophobic

interactions. The result is consistent with the demonstration that the addition of a non-ionic surfactant, such as Tween 20, has a negative effect on virus adsorption (Pisharody *et al.* 2021).

Elution by chitosanase solutions gave results in the same low range. With this treatment, virus recovery can result from two processes: the disappearance of adsorption sites at or near the chitosan cleavage sites and the formation of chitosan chains small enough to join as solutes, the virus suspension, together with the viruses attached to them. At this point, both free viruses, and those still attached to oligomers are collected for analysis. One reason why the results of the chitosanase treatment were kept in the low ranges could be the development of counteracting mechanisms related to the cleavage of the chitosan chains: indeed, while opening the bulk of the chitosan mass, the enzyme may increase the number of fresh unused adsorption sites, then facilitating the re-adsorption of the formerly freed virus. An optimum recovery rate might occur at a time when the rates of both destruction of adsorption sites (as a result of surfaces destruction) and opening of new sites were equal. The contact time between the beads and the chitosanase solution then appeared to be as a key factor in the search for an optimum recovery. Experiments testing this assumption resulted in very low levels of virus recovery with contact times of 10 minutes and less. It may indicate that more time was required for the enzyme to diffuse far enough into the materials porosity to produce significant results. The highest value, reached after 15 minutes of incubation, was followed by a gradual decrease in virus recovery values, suggesting that this delay may be a good approximation of the time at which the optimum recovery occurs.

In an attempt to further improve the chitosanase treatment, it was tempting to increase the virus recovery by dampening the re-adsorption mechanisms (section 0). In that end, two of the previously tested treatments (high pH and high ionic strength) were used in combination with the chitosanase treatment, in the expectation that they might be more effective after chitosan chains cleavage. The resulting treatment combinations did not significantly improve the virus recovery. However, no definitive statement should be made from these results as too few pH and ionic strength values were tested, especially for ionic strength which is less constrained than pH by the need to preserve the integrity of the organic material. In any cases, additional treatment increases the contact time between the beads and the chitosanase and thus increases the access to new adsorption sites, favouring the readsorption processes.

Our experiments established that virus recovery was much higher with I-CH than with CH. One of the main differences between the two materials relates to the stiffness of I-CH, which results from textural modifications owing to the imprinting. It can be expected that it affects the accessibility of the chitosanase to the CH cleavage sites, thus reducing its activity in terms of both, the production of short chitosan chains and the opening of new adsorption sites. As the two processes are opposite in their effects on the virus recovery, the latter was probably not significantly controlled by the rate of the chitosanase activity. However, due to lower surface porosity of the I-CH beads (Table 1 and Figure 1), the interaction forces between the viruses and the material were probably weaker than with the higher surface area and porous volume of the CH beads. By facilitating the virus release, the weaker interaction forces of ICH beads, may explain why they allow higher virus recoveries than CH beads.

## Sampling viruses in wastewater

The wastewater components were anticipated to introduce a considerable degree of interferences, with notable discrepancies in the manner by which the two steps of the protocol (adsorption and recovery), could be influenced. Due to the progressive clogging of the beads, adsorption processes were likely to be gradually affected over the sampling time, whereas the recovery processes could be undermined from the outset by inhibiting components. This should be taken into account when selecting an incubation time.

All beads, except the I-CH beads, showed high adsorption efficiencies (above 90%), indicating that the shielding processes, which developed steadily over the 4 h contact time due to the high concentrations of organic and mineral matter, were not too detrimental to virus adsorption. The addition of magnetite to I-CH appeared to increase the adsorption efficiency of the material (from 65% to 91%) (Table 6.). This performance, coupled with its magnetic property should encourage further research into this type of material. The adsorption results are consistent with the ranking of the materials according to their BET specific surface areas: CH > M-CH > MI-CH > I-CH (Table 1).

Not surprisingly, the efficiency of virus recovery in wastewater exhibited a dramatic decrease when compared to the results of assays performed with NaCl 0.1M virus suspension ( $0.8 \pm 0.1\%$  and  $72 \pm 8\%$  with CH respectively) under very similar operating conditions (section 0, chitosanase, 15 min incubation time). This was observed for all types of beads, with CH beads, whether magnetic or not, showing the lower performances. Once again, the ferrite magnetite addition to I-CH beads (*i.e.* MI-CH) seemed to induce huge changes in their performance, but this time in the opposite direction: non-magnetic I-CH beads presented a significantly higher recovery efficiency than magnetic ones. This could be related to the presence of a large number of adsorption sites, associated with weak interaction energies in the imprinted materials, due to their smaller pore volume and  $S_{BET}$  (Table 1) as evidenced by the SEM observations (Figure 1). The lower porosity of I-CH compared to MI-CH, could have allowed the chitosanase solution to diffuse faster into the bead surfaces, facilitating the hydrolytic degradation and subsequent virus desorption, resulting in a higher recovery efficacy.

These results were consistent with those obtained from the experiments performed with NaCl 0.1M virus suspensions (section 0), and demonstrated a higher virus retrieval with I-CH than with CH. However, they also provided the first evidence that recovery performance can be dramatically reduced in- wastewater samples, owing to the competition of virus adsorption with organic matter, suspended particles, and microorganisms.

## 5 Conclusions, perspectives

This work reports on initial investigations into the use of chitosan beads in a catch-and-recovery virus sampling protocol for environmental waters. It highlights several obstacles that should be addressed in further studies aimed at establishing a truly operational sampling technique.

The overall efficiency of our chitosan-based sampling protocol required the success of both its two complementary steps: adsorption, mainly related to the adsorbent properties, and adsorbate recovery, mainly based on dedicated treatments, their mutual ranks in the protocol and the reagents involved.

In most of our "catch and recovery" experiments, adsorption efficiency was the relevant parameter to describe the performance of the adsorbent, since our aim was to collect as many viruses as possible from the initial MNV-1 suspension. Among all the types of material studied, raw chitosan rehydrated lyophilised or hydrated, CH beads, magnetic or not, regularly provided higher adsorption efficiencies (> 99 % after 4h incubation time) than imprinted I-CH or MI-CH beads, probably in line with their lower BET specific surface area.

Our measurements have demonstrated that the beads can be lyophilised without significant loss of adsorption performance, in response to conservation and weight problems which may arise from their hydrated form. Despite the undoubted performance of chitosan as an adsorbent, even after this treatment, the difficulty of producing batches of beads with a sufficiently high homogeneity, may limit its use in studies aimed at the assessment of virus groups relative abundance.

Our virus recovery assays yielded highly variable results ranging from almost 0 % to 72 % depending on the protocols. Owing to the large viruses' concentrations in wastewater, high recovery rates are not required for genome amplification. However, the performance and reliability of the protocols need to be further improved before they can be used in studies on the occurrence of rare virus groups.

Our results highlighted the obvious challenge in setting up such a capture and recovery protocol, where the adsorption performance of the material, in the first step of the protocol, needs to be mitigated for the second part of the protocol to be efficient. The strength of the chitosan retention forces appeared to impair the efficiency of virus recovery by contributing to re-adsorption mechanisms.

We have shown that one of the best methods for the removal of MNV-1 adsorbed on chitosan beads is the hydrolytic degradation of chitosan by using chitosanase. The optimisation of the contact time resulted in a recovery efficiency of 72 %. Coupled either with a surfactant addition or an ionic strength increase, or a pH shift up to 8.2, did not significantly enhance the MNV-1 removal efficiency. In addition, the method is clearly dependent on the composition, quality and grade of the chitosanase batch.

Our experiments on imprinted chitosan resulted in rather low values of adsorption (65%) but decent values of enzymatic degradation recovery (23%). This is probably related to their

porosity and specific surface area which are lower than those of raw chitosan. Considering both the adsorption and desorption efficiency, the maximum amount of virus collected was obtained with chitosan beads prepared by conventional gelation.

Clearly, recovery treatments are still needing significative improvements that could be carried out as extensions of our conclusions. In particular, significant progress could be made by resuming our attempts to reduce or counteract the retention forces by acting on ionic forces, surface tension and hydrophilicity, in combination or not with chitosan hydrolysis. Research could also be oriented towards chitosan derivatives (metal imprinting, functionalisation, blending with activated carbon) whose surface polarity is more amenable to manipulation than raw chitosan.

Our study demonstrated the applicability of the protocol to wastewater, despite all the competition and interferences owing to their high organic and mineral matters contents.

## 6 Acknowledgments

The authors thank the Auvergne-Rhône-Alpes region for supporting the “Virocaptur” project (“Pack Ambition recherche” program), the NORMEC-ABIOLAB laboratory (Montbonnot Saint-Martin, France), where most of the experiments were performed and the ASPOSAN association.

## 7 References

- Amankwaah, C., Li, J., Lee, J., Pascall, M.A., 2020. Antimicrobial Activity of Chitosan-Based Films Enriched with Green Tea Extracts on Murine Norovirus, *Escherichia coli*, and *Listeria innocuous*. International Journal of Food Science 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/3941924>
- Barnes, C., Barber, R., Schneider, K.R., Danyluk, M.D., Wright, A.C., Jones, M.K., Montazeri, N., 2021. Application of Chitosan Microparticles against Human Norovirus. Journal of Food Protection 84, 2092–2098. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-220>
- Brunauer, S., Emmett, P. H., & Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. Journal of the American chemical society, 60(2), 309-319. <https://doi.org/10.1021/ja01269a023>
- Chiou, M.-S., Ho, P.-Y., Li, H.-Y., 2004. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. Dyes and Pigments 60, 69–84. [https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(03\)00140-2](https://doi.org/10.1016/S0143-7208(03)00140-2)
- Ciejka, J., Wolski, K., Nowakowska, M., Pyrc, K., Szczubiałka, K., 2017. Biopolymeric nano/microspheres for selective and reversible adsorption of coronaviruses. Materials Science and Engineering: C 76, 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.047>
- Crini, G., Badot, P.-M., Guibal, E., 2009. Chitine et chitosane, Du biopolymère à l’application (in french), Presses Universitaires de Franche-Comté – ISBN : 978-2-84867-249-6 – 304 pages

David, L., Clayer-Montembault, A., Perrier, A. E., Vibert, R., Duclaux, L., Reinert, L., Lakehal, I. (French patent (in french) N°3117378 du 17/06/2022 Procédé de fabrication par complexation et gélification d'un matériau à base de chitosane, et matériau associé.

Delafosse, D., Reinert, L., Azaïs, P., Fontvieille, D., Soneda, Y., Morand, P., Duclaux, L., 2022. Potentialities of a mesoporous activated carbon as virus detection probe in aquatic systems. *Journal of Virological Methods* 303, 114496. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2022.114496>

Feria-Diaz, J.J., Tavera-Quiroz, M.J., Vergara-Suarez, O., 2018. Efficiency of Chitosan as a Coagulant for Wastewater from Slaughterhouses. *Indian Journal of Science and Technology* 11, 1–12. <https://doi.org/10.17485/ijst/2018/v11i3/117169>

Gerba, C.P., 1984. Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 133–168. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70054-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70054-6)

Hassan, M.I., Mohamed, A.F., Taher, F.A., 2016. Antimicrobial Activities of Chitosan Nanoparticles Prepared from *Lucilia Cuprina* Maggots (Diptera: Calliphoridae). *JESP* 46, 563–570. <https://doi.org/10.12816/0033977>

Hayes, E.K., Stoddart, A.K., Gagnon, G.A., 2022. Adsorption of SARS-CoV-2 onto granular activated carbon (GAC) in wastewater: Implications for improvements in passive sampling. *Science of The Total Environment* 847, 157548. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157548>

Jaber, N., Al-Remawi, M., Al-Akayleh, F., Al-Muhtaseb, N., Al-Adham, I.S.I., Collier, P.J., 2022. A review of the antiviral activity of Chitosan, including patented applications and its potential use against COVID-19. *J of Applied Microbiology* 132, 41–58. <https://doi.org/10.1111/jam.15202>

Jaiswal, M., Chauhan, D., Sankararamkrishnan, N., 2012. Copper chitosan nanocomposite: synthesis, characterization, and application in removal of organophosphorous pesticide from agricultural runoff. *Environ Sci Pollut Res* 19, 2055–2062. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0699-6>

Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research* 42, 1441–1448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.029>

Kyzas, G.Z., Kostoglou, M., Lazaridis, N.K., Lambropoulou, D.A., Bikiaris, D.N., 2013. Environmental friendly technology for the removal of pharmaceutical contaminants from wastewaters using modified chitosan adsorbents. *Chemical Engineering Journal* 222, 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.048>

Li, X., Wu, P., Gao, G.F., Cheng, S., 2011. Carbohydrate-Functionalized Chitosan Fiber for Influenza Virus Capture. *Biomacromolecules* 12, 3962–3969. <https://doi.org/10.1021/bm200970x>

Ma, L., Zheng, Q., 2021. Selective adsorption behavior of ion-imprinted magnetic chitosan beads for removal of Cu(II) ions from aqueous solution. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 39, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.09.030>

Mi, X., Vijayaragavan, K.S., Heldt, C.L., 2014. Virus adsorption of water-stable quaternized chitosan nanofibers. *Carbohydrate Research* 387, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.01.017>

- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., Crini, G., 2019. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environ Chem Lett* 17, 1667–1692. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00904-x>
- Oza, H.H., Holmes, E.B., Bailey, E.S., Coleman, C.K., Sobsey, M.D., 2022. Microbial reductions and physical characterization of chitosan flocs when using chitosan acetate as a cloth filter aid in water treatment. *PLoS ONE* 17, e0262341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262341>
- Pisharody, L., Suresh, S., Mukherji, S., 2021. Development and evaluation of DEAE silica gel columns for simultaneous concentration of coliphages and rotavirus from natural water samples. *Water Research* 203. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117508>
- Prevost, B., Lucas, F.S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L., Wurtzer, S., 2015. Large scale survey of enteric viruses in river and wastewater underlines the health status of the local population. *Environment International* 79, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.004>
- Ranjbari, S., Tanhaei, B., Ayati, A., Khadempir, S., Sillanpää, M., 2020. Efficient tetracycline adsorptive removal using tripalmylammonium chloride conjugated chitosan hydrogel beads: Mechanism, kinetic, isotherms and thermodynamic study. *International Journal of Biological Macromolecules* 155, 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.188>
- Rouquerol, F., Rouquerol, J., Imelik, B., 1964. “Validité de la loi BET dans le cas de l’adsorption d’azote, d’argon et de butane sur des adsorbants poreux” (in French), *Bull. Soc. Chim. Fr.* 635.
- Schaldach, C.M., Bourcier, W.L., Shaw, H.F., Viani, B.E., Wilson, W.D., 2006. The influence of ionic strength on the interaction of viruses with charged surfaces under environmental conditions. *Journal of Colloid and Interface Science* 294, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.06.082>
- Soros, A., Amburgey, J.E., Stauber, C.E., Sobsey, M.D., Casanova, L.M., 2019. Turbidity reduction in drinking water by coagulation-flocculation with chitosan polymers. *Journal of Water and Health* 17, 204–218. <https://doi.org/10.2166/wh.2019.114>
- Su, X., Zivanovic, S., D’Souza, D.H., 2009. Effect of Chitosan on the Infectivity of Murine Norovirus, Feline Calicivirus, and Bacteriophage MS2. *Journal of Food Protection* 72, 2623–2628. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.12.2623>
- Vincent-Hubert, F., Wacrenier, C., Desdouts, M., Jousse, S., Schaeffer, J., Le Mehaute, P., Nakache-Danglot, F., Le Guyader, F.S., Bertrand, I., Boni, M., Gantzer, C., Maday, Y., Marechal, V., Mouchel, J.-M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2022. Development of passive samplers for the detection of SARS-CoV-2 in sewage and seawater: Application for the monitoring of sewage. *Science of The Total Environment* 833, 155139. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155139>
- Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, T., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M., 2005. Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol Progress* 21, 823–829. <https://doi.org/10.1021/bp0495668>
- Zemmouri, H., Kadouche, S., Lounici, H., Hadioui, M., Mameri, N., 2011. Use of chitosan in coagulation flocculation of raw water of Keddara and Beni Amrane dams. *Water Supply* 11, 202–210. <https://doi.org/10.2166/ws.2011.038>

### I.3. Conclusions du chapitre I

Face au constat des problèmes rencontrés par les techniques d'échantillonnage et d'analyse des virus dans les eaux usées, nous nous étions donnés comme 1<sup>er</sup> objectif la recherche d'amélioration des protocoles existants et celle de techniques innovantes. Ces recherches nous étaient apparues comme préambule incontournable à une étude de l'évolution des charges virales des eaux dans leur trajet au sein des établissements de traitement des eaux usées.

Au terme de ce 1<sup>er</sup> chapitre le bilan de l'ensemble des essais que nous avons réalisés dans ce sens peut être résumé dans les deux principaux résultats :

- Celui de la mise au point d'un protocole dans lequel l'efficacité d'extraction des acides nucléiques viraux a été associée à une optimisation des coûts matériels et humains imposés par sa mise en œuvre. Mis au point dans le contexte des eaux usées et des boues, ce protocole devrait pouvoir être appliqué d'autres familles de virus circulant dans ces matrices. Comme indiqué précédemment, il a été intégré dans l'offre analytique du laboratoire.

- Celui de la démonstration du potentiel de deux matériaux adsorbants, un charbon actif et un chitosan, dans la recherche d'approches alternatives pour l'étape d'extraction des VEH à partir d'eaux usées. Nos essais à ce sujet ont mis l'accent sur deux points essentiels :

- 1) Les capacités remarquables de ces matériaux à capter les virus par adsorption, et donc, dans ce passage du milieu liquide au milieu solide, à les concentrer ;
- 2) L'inconvénient que représente cette forte efficacité d'adsorption pour la récupération des virus à partir de ces matériaux, seconde étape, en aval de celle de la captation des virus, pour que l'ensemble constitue un protocole d'échantillonnage. C'est la raison pour laquelle nos expérimentations se sont concentrées sur les méthodes de récupération des virus dont les résultats montrent la nécessité de poursuivre les recherches dans le prolongement des pistes que nous avons pu définir.

Par ailleurs, nos essais portant sur les eaux usées ont fait apparaître que dans les conditions de fortes concentrations et de grande variabilité des éléments de toutes nature, qui prévalent dans ces les eaux usées, les performances des matériaux adsorbant varient, elles aussi, dans de larges mesures, probablement loin de leurs performances optimales.

Il en résulte :

- Que les quantités adsorbées (dans un temps déterminé) ne peuvent pas être reliées de façon simple au volume d'échantillon dans lequel les virus sont recrutés ;
- Que le calcul du temps d'exposition à partir duquel la saturation des sites d'adsorption est atteinte n'est pas possible.

Nous en déduisons que dans l'état actuel des recherches, l'intérêt de ces matériaux pour l'étude des charges virales dans les STEPs, relève plus des techniques de détection que de celles de quantification.



# Chapitre II

Evolution des charges véhiculées par les eaux usées dans une station d'épuration, à l'exemple de l'UDEP Grand Chambéry

## Chapitre II – Evolution des charges véhiculées par les eaux usées dans une station d'épuration, à l'exemple de l'UDEP Grand Chambéry

Il est utile de rappeler ici que notre projet avait pour objectif d'apporter des précisions sur la contribution des principales étapes de traitement à l'abattement des charges virales, en considérant, autant que possible, le détail des mécanismes qui les sous-tendent. Il convenait donc, en préambule, d'acquérir la connaissance des niveaux de charge auxquels ces mécanismes s'adressent, dans l'établissement modèle choisi (UDEP Grand Chambéry) et leur variabilité, informations auxquelles ce chapitre est consacré.

La nécessité de mieux comprendre ces mécanismes, évoquée par quelques auteurs ([Sima et al. 2011](#), [Maurya et al. 2020](#), [Li et al. 2021](#)), a été l'un des points à l'initiative de notre travail. Nous n'avons notamment pas l'intention d'apporter une nouvelle contribution aux nombreuses études comparatives :

- Des charges virales entrantes, tant du point de vue quantitatif que qualitatif ;
- Des performances globales d'une STEP vis-à-vis de celles d'autres STEPs ;
- Des procédés de traitement mis en œuvre à l'UDEP (pour leurs spécificités avec l'ajout de polymères, par exemple), avec ceux implémentés sur d'autres sites.

Beaucoup de travaux ont été publiés relatifs à l'un ou à plusieurs de ces sujets, certains dans leur généralité ([Victoria et al. 2010](#), [Qiu et al. 2015](#), [Tandukar et al. 2021](#), [Ibrahim et al. 2021](#)), d'autres plus spécifiquement dédiés aux procédés de traitement ([Fong et al. 2010](#), [Sima et al. 2011](#), [Schmitz et al. 2016](#), [Bhatt et al. 2020](#)), ou à la nature des charges virales ([Hata et al. 2013](#), [He et al. 2022](#), [Hewitt et al. 2011](#), [Li et al. 2021](#)), certains dans le cadre de contextes spécifiques à propos de la contamination de mollusques, par exemple ([Le Guyader et al. 2013](#)).

Le problème que posent ces comparaisons est celui du nombre de facteurs dont dépendent les charges observées à un instant donné :

- Sur le plan de l'échantillonnage, outre la technique utilisée pour collecter les échantillons, l'heure (dans le cas de prélèvement ponctuels), le jour de la semaine et la période de l'année à laquelle ces opérations sont menées ([Tunçal et al. 2009](#)).
- Concernant le réseau collecteur avec trois principaux critères : son caractère unitaire ou séparatifs ou toutes situations intermédiaires, sa situation

géographique en liaison avec le climat local et son degré de maillage dont dépend le temps de transit et donc le temps durant lequel les transformations des charges inertes et vivantes des eaux usées ont pu se développer, en amont de la STEP ([Gao et al. 2023](#)).

- Concernant le type de population dont les eaux sont collectées (zones urbaines, zones rurales incluant ou non des eaux industrielles) et son importance en nombre d'équivalents habitants.

- Concernant les techniques d'analyse, en particulier les techniques d'extraction des acides nucléiques et les séquences choisies pour les PCR ([Akter et al. 2024](#)).

En toute rigueur, c'est donc l'ensemble de ces facteurs qui devrait être pris en compte dans le choix des sites dont la comparaison est envisagée. Il est évident que le travail d'enquête correspondant est conséquent et nous n'avons effectivement pas trouvé de publications dans lesquelles toutes ces spécifications étaient données. A l'inverse, dans beaucoup d'entre elles, la simple information de l'heure à laquelle la prise d'échantillon a été faite et du jour de la semaine, n'est pas indiquée.

Il en résulte que la comparaison de charges d'eaux usées issues de travaux conduits dans des conditions différentes doit être nuancée. Cela concerne autant les concentrations mesurées à l'entrée qu'à la sortie des STEPs, mais aussi celles de différents groupes viraux les uns vis-à-vis des autres. Le travail de [Wade et al. \(2022\)](#) à propos du monitoring du SARS-CoV-2 en Grande Bretagne, est particulièrement instructif à ce sujet.

Les comparaisons conservent toute leur signification, en revanche, lorsque l'abondance des groupes viraux dans les eaux d'une même station, sont exprimées relativement les uns aux autres. C'est aussi le cas de la comparaison entre eux de procédés de traitement, lorsque qu'ils sont implémentés sur un même site ou sur des sites géographiquement voisins. Cette situation a été exploitée par quelques auteurs ([Polanco et al. 2023](#), [Tandukar et al. 2021](#)).

Au-delà donc de ces publications qui font état de l'élimination d'une partie des charges virales des eaux usées par les stations d'épuration ([da Silva et al. 2007](#), [Hewitt et al. 2011](#), [Lizasoain et al. 2017](#), [Prado et al. 2019](#)), notre projet avait pour objectif d'apporter des précisions sur la contribution des principales étapes des traitements à l'élimination de la charge de quelques groupes de virus, à travers les mécanismes qui les sous-tendent.

Comme évoqué précédemment, les installations de traitement des eaux usées diffèrent, dans une large mesure, par leur dimension, par l'étendue du territoire dont les eaux sont drainées, par le type et la taille de la population concernée et par les types de procédés mis en œuvre.

Notre choix s'est porté sur l'unité de dépollution (UDEP) de la communauté de Communes Grand Chambéry, essentiellement pour les raisons suivantes :

- L'ajout systématique de polymères au niveau du décanteur primaire.
- L'importance de ses capacités de traitement (260 000 EH) et celle de la population concernée (environ 140 000 habitants).
- Sa proximité du laboratoire de recherche.
- L'ouverture de son administration à des collaborations avec les universités voisines.

Sur le plan des charges virales, comme indiqué plus haut dans ce mémoire, le choix a été fait de suivre trois groupes de virus entériques humains : NoV GI, NoV GII et AdV.

Le fonctionnement des STEPs fait l'objet d'une surveillance réglementaire à travers l'analyse hebdomadaire de paramètres clefs de la composition des eaux usées, à l'entrée, en aval du décanteur primaire (Entrée BioF) et à la sortie de l'établissement. Une partie des résultats est rendue publique par Eaufrance (service public d'information sur l'eau et les milieux aquatiques), sous la forme d'un indicateur de performance. Cet indicateur (pourcentage de "bilans 24h conformes de l'ensemble des stations d'épuration d'un service d'assainissement, en regard des prescriptions d'autosurveillance des arrêtés préfectoraux d'autorisation de traitement) ne concerne que les services comportant au moins une station d'épuration de capacité supérieure à 2 000 EH". Pour la Savoie, sa valeur moyenne au 01/01/2022 s'établissait à 96,7 % ([EauFrance, 2022](#)).

Ce chapitre présente le fonctionnement de l'UDEP Grand Chambéry à travers une partie de ces analyses réglementaires, complétées par celles des NoV GI, NoV GII et AdV que nous avons réalisées durant une partie de notre période d'étude (11 mois, août 2022 - juin 2023). Les charges en VEH étant principalement liées aux charges organiques, les formes minérales de l'azote et du phosphore (nitrates, phosphates) n'ont pas été prises en considération.

Les données présentées dans ce qui suit ont pour objectif de situer nos résultats dans le contexte général des variations de la composition des eaux usées reçues par l'UDEP et du fonctionnement de la station, durant la période pendant laquelle nous y avons fait des prélèvements d'eaux usées et de boues. Leur analyse vient répondre aux besoins internes à notre travail tel, par exemple, que la nécessité de connaître l'historique récent (à 6 jours) de la composition de l'eau en liaison avec les événements météorologiques locaux. Elle n'a donc pas pour objectif de faire la comparaison des performances de l'UDEP avec celles d'autres établissements.

## II.1. Fonctionnement de la station à travers les valeurs des charges en MES, DCO et DBO

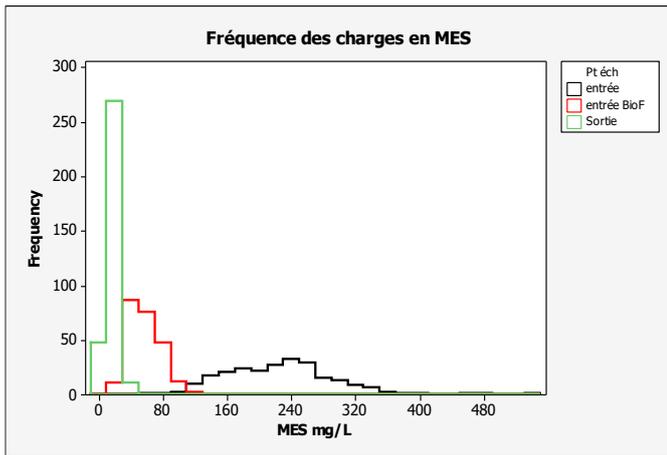
Pour rappel, la DBO est une mesure couramment appliquée aux eaux usées, traduisant la quantité de matières organiques biodégradables dans les échantillons. La DCO, quant à elle, donne une estimation de la quantité de la majeure partie des composés organiques mais également de sels minéraux oxydables (sulfures, chlorures...). Le rapport DBO/DCO donne une indication sur le niveau de biodégradabilité des eaux. Il peut être compris entre 0.3 et 0.8 dans les eaux usées (Bader *et al.* 2022). Une valeur élevée de ce ratio traduit une bonne biodégradabilité des éléments présents dans ces eaux. Les valeurs de MES représentent la concentration en particules minérales et organiques, auxquels les VEH peuvent notamment être associés.

Notre analyse s'est adressée à une matrice couvrant la période allant du 01/08/2022 au 30/06/2023, soit aux résultats de 334 dates d'analyse. Toutes n'ont pas pu être retenues, selon les descripteurs et les points d'échantillonnage, en raison des aléas d'échantillonnage et d'analyse, comme le fait apparaître la colonne 3 du Tableau II-1.

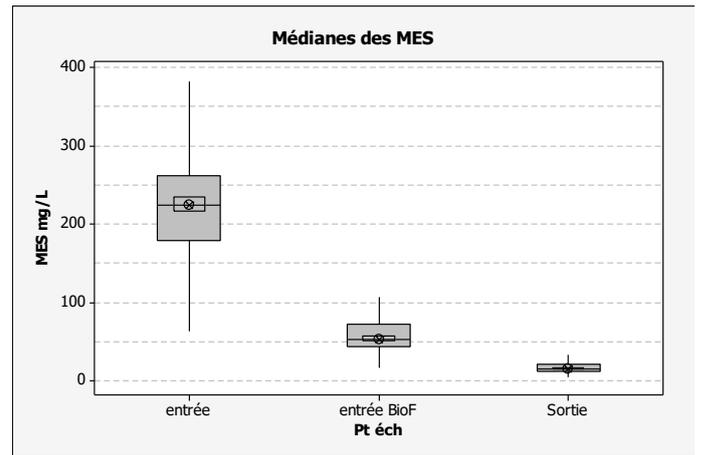
### II.1.1. Distribution des valeurs des charges en MES, DCO et DBO aux trois points d'échantillonnage

L'examen de la distribution des valeurs des trois descripteurs (MES, DCO, DBO) fait apparaître de fortes similitudes quant à leur évolution au niveau des trois points d'échantillonnage (Figure II-1 A, Figure II-2). La remarque concerne tout à la fois l'amplitude des valeurs et leur dispersion (Figure II-1 B, Figure II-3, Tableau II-1 col. 9, IQR). L'écart interquartile (IQR) a été préféré à l'étendue pour l'estimation de la dispersion des distributions, en raison de l'existence de quelques valeurs exceptionnelles dans le jeu de données.

L'efficacité des traitements est bien mise en évidence par les différences entre les distributions des trois descripteurs, au niveau de chacun des trois points d'échantillonnage : l'avancée des traitements se traduit par une diminution de leurs amplitudes et de leur kurtosis.



A



B

Figure II-1. (A) Fréquences des charges en MES aux trois points d'échantillonnage, (B) Médianes, écarts interquartiles, minima et maxima des MES aux trois points d'échantillonnage.

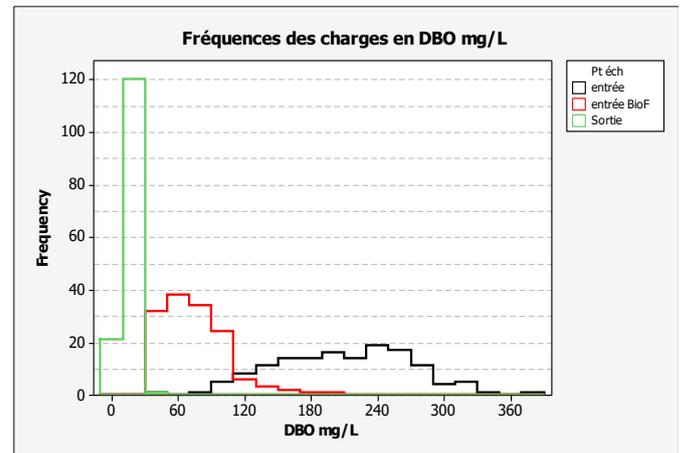
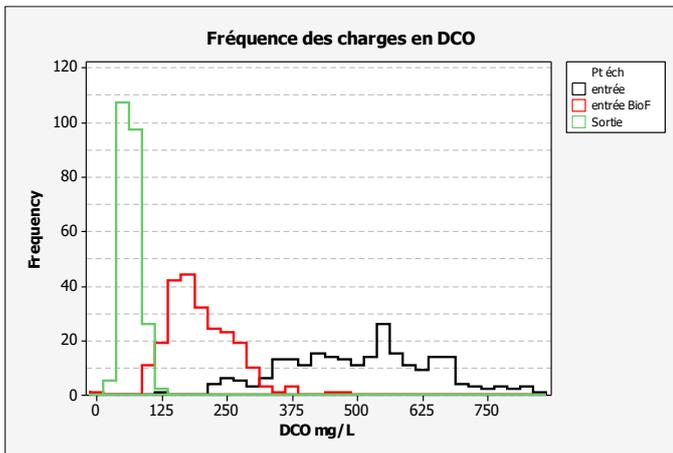


Figure II-2. Fréquences des charges organiques (DCO, DBO) aux trois points d'échantillonnage.

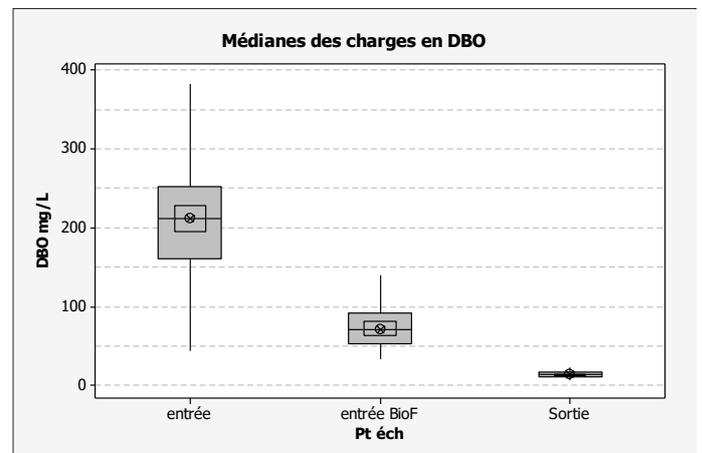
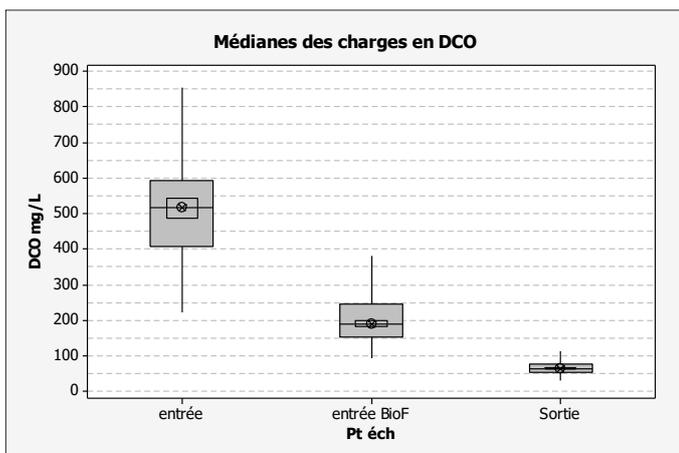


Figure II-3. Médianes, écarts interquartiles, minima et maxima de la DCO et de la DBO aux trois points d'échantillonnage.

Tableau II-1. Statistiques descriptives des charges en MES, DCO et DBO. Q1 = 1<sup>er</sup> quartile ; Q3 = 3<sup>ème</sup> quartile ; IQR = écart interquartile ; IQR/Md = écart interquartile normalisé par la médiane.

Variable	Point échantillonnage	N obs.	Minimum (mg/L)	Q1	Médiane (mg/L)	Q3	Maximum (mg/L)	IQR	IQR/Md
MES	Entrée	236	62	179	224	262	537	83	0.37
MES	Entrée BioF	234	16	44	52	71	116	27	0.52
MES	Sortie	328	4	11	15	20	43	9	0.60
DCO	Entrée	236	121	406	516	593	853	187	0.36
DCO	Entrée BioF	234	10	153	187	244	466	91	0.49
DCO	Sortie	237	29	53	63	77	130	24	0.38
DBO	Entrée	142	43	161	210	251	382	90	0.43
DBO	Entrée BioF	141	33	52	70	91	206	39	0.56
DBO	Sortie	142	6	11	13	16	37	5	0.39

#### II.1.1.1. Comparaison des traitements sur le plan de l'abattement des charges en MES, DCO et DBO

La Figure II-4, donne deux représentations de l'efficacité des traitements sur les charges de l'eau, en correspondance avec les formules données dans la légende. Elle montre que les plus fortes éliminations de charge, entre l'entrée et la sortie de la station, sont celles de la DBO et des MES (Figure II-4 B), avec des valeurs respectives de 93.8 % et de 93.3 %. Dans le détail, ce sont les MES qui sont le plus fortement éliminées au niveau du traitement primaire (76.8 %) et la DBO au niveau du traitement secondaire (81.4 %), en toute logique donc, avec la nature des procédés auxquels ces traitements correspondent. En fait, le constat concerne aussi le second descripteur des charges organiques dont l'élimination est effectivement plus grande au niveau des réacteurs biologiques qu'au niveau de la décantation primaire. La différence est moindre pour la DCO que pour la DBO, en liaison avec le caractère réfractaire d'une partie des composés qui sont pris en compte dans cette analyse. A l'inverse, c'est au niveau du traitement primaire que la plus grande partie des MES est éliminée, en liaison avec la nature minérale d'une grande partie de ses constituants.

Au bilan, c'est donc avec la DBO et les MES que la station s'avère la plus performante avec des charges de sortie réduites à environ 6.5 % des charges entrantes (Figure II-4 A). Dans le cas de la DCO, cette valeur s'établit à 12.2 % malgré des pourcentages d'abattement importants au niveau des deux traitements (36.3 % et 33.6 %, respectivement pour les traitements primaire et secondaire). La charge en MES éliminée au niveau du traitement secondaire reste importante, contribuant ainsi, de façon significative, à la performance globale de la station pour ce descripteur.

D'autres aspects de l'effet des traitements sur la charge des eaux usées seront recherchés, plus loin dans ce chapitre, pour la période durant laquelle les charges virales ont été analysées.

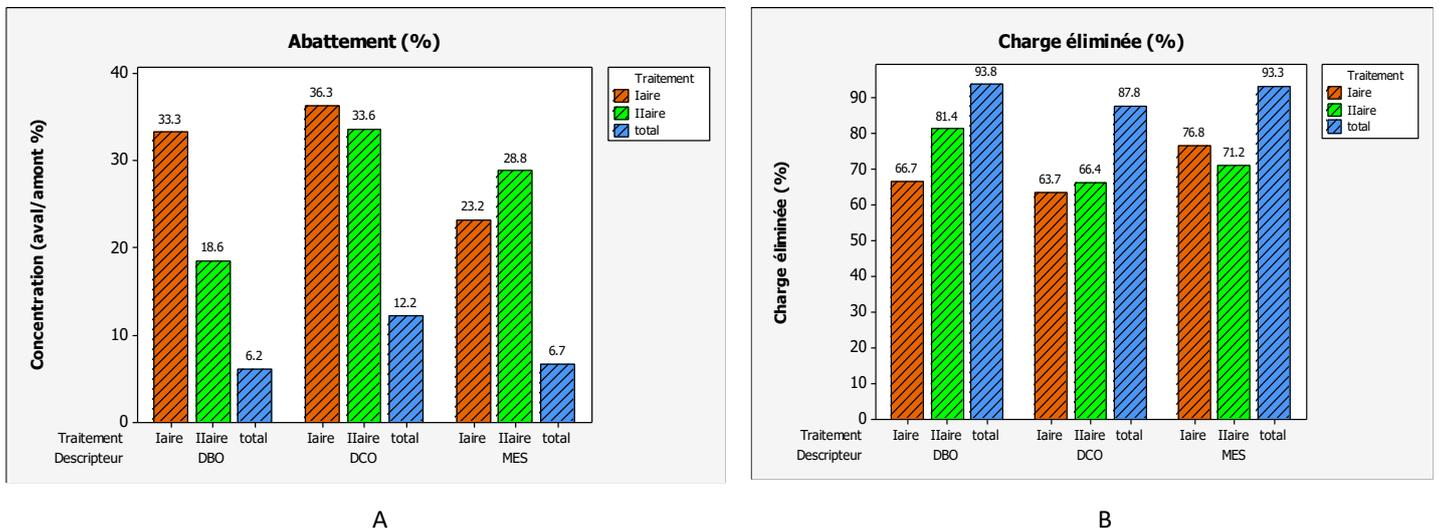


Figure II-4. Comparaison des traitements sur le plan de l'abattement des charges. (A) Valeurs du rapport  $[C]_{\text{aval}}/[C]_{\text{amont}}$  en %, (B) Valeurs résultant du calcul :  $([C]_{\text{amont}} - [C]_{\text{aval}}) \times 100 / [C]_{\text{amont}}$ .

#### II.1.1.2. Comparaison des trois points d'échantillonnage du point de vue de la dispersion des valeurs

La dispersion d'une distribution est synonyme de la variabilité des valeurs enregistrées au point d'échantillonnage considéré. Son examen présente un intérêt pour l'interprétation des disfonctionnements qui peuvent affecter les traitements. Dans le cas des ajouts de polymères au niveau de la décantation primaire, par exemple, l'irrégularité des apports en volume ou en charge, écarte le système des conditions pour lesquelles leur dosage a été calculé. Dans le cas des réacteurs biologiques l'irrégularités des apports trophiques affectent, à l'évidence, l'activité des biofilms microbiens.

Pour toutes les variables (MES, DCO, DBO), la diminution de la concentration entre l'entrée de la station et la sortie s'accompagne de celle de la dispersion des valeurs (Figure II-3) selon des fonctions qui semblent très similaires (Figure II-5). Outre la diminution de l'amplitude des charges, les traitements ont donc pour effet de lisser la concentration des éléments qui entrent dans la composition des eaux. Cet effet diffère cependant selon les descripteurs, comme le montre le Tableau II-2. La dispersion des valeurs de MES est réduite dans la même mesure (33 %) par les traitements primaires et les traitements secondaires. Dans le cas des descripteurs organiques, elle subit une réduction significativement plus grande au niveau du traitement biologique, en toute logique, puisque ce traitement s'adresse spécifiquement à la charge organique. La différence entre DBO et DCO est, elle aussi, significative et cohérente

avec le caractère réfractaire d'une fraction de l'ensemble de la matière organique auquel s'adresse les réactions d'oxydation de l'analyse DCO.

Dans la partie B de la Figure II-6, les valeurs de l'écart interquartile ont été standardisées par leurs médianes respectives, afin de les comparer d'un descripteur à un autre. Cette représentation vient compléter l'examen des différences entre MES et descripteurs organiques : Elle montre que les IQR standardisés des deux descripteurs organiques diminuent au passage des réacteurs biologiques, pour atteindre des valeurs sensiblement identiques, alors qu'il augmente dans le cas des MES.

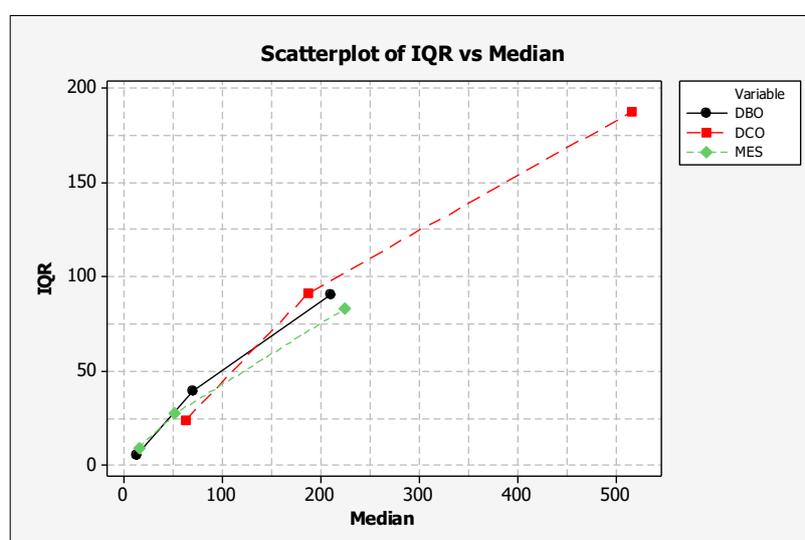


Figure II-5. Comparaison des distributions des 3 descripteurs sur le plan de la relation entre médiane et dispersion (IQR).

Tableau II-2. Effet des traitements sur la dispersion des valeurs des trois descripteurs. IQR = écart interquartile.

Descripteur	Traitement	IQR last/prev (%)
<b>MES</b>	Primaire	32.9
	Secondaire	33.0
<b>DCO</b>	Primaire	48.7
	Secondaire	26.3
<b>DBO</b>	Primaire	43.6
	Secondaire	12.7

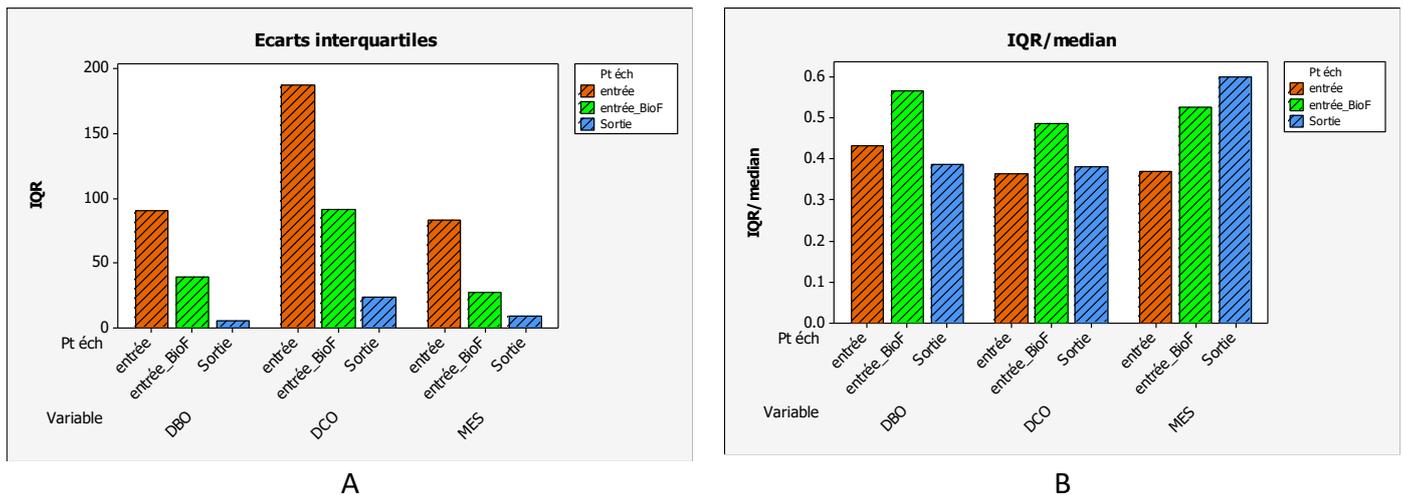


Figure II-6. Valeurs des écarts interquartiles selon les variables et les points d'échantillonnage. (A) valeurs brutes, (B) valeurs standardisées par la médiane.

### II.1.2. Identification d'épisodes particuliers du point de vue de la composition des eaux reçues par la station

La représentation de l'évolution des concentrations des 3 descripteurs, à l'entrée de la station, durant la période d'étude, fait clairement apparaître des épisodes structurants, tels que de fortes baisses de concentrations, à quelques jours d'intervalle ou des tendances marquées à une évolution (croissance ou diminution) soutenue pendant plusieurs jours (Figure II-7, Figure II-8, Figure II-9, Figure II-24).

S'agissant d'eaux usées, le principal facteur explicatif des charges transportées est le facteur humain, (densité de la population raccordée au réseau d'égout, activités humaines domestiques et professionnelles). L'une des particularités du réseau connecté à l'UDEP Grand Chambéry est d'être partiellement séparatif. En conséquence, le facteur météorologique participe lui aussi, en partie, à la détermination des concentrations, et non seulement par les volumes d'eau apportés, mais aussi à travers les charges propres des eaux de ruissellement. Les conséquences de ces apports sont doubles : 1) ils accroissent la variabilité dans le temps de la composition des eaux et 2), la nature des substances transportées accroît la diversité des composés auxquels les traitements doivent faire face, deux points qui peuvent compromettre leur efficacité.

Dans les paragraphes qui suivent, nous remontons la chaîne des facteurs explicatifs en examinant tout d'abord, les relations entre charges et débit à l'entrée de la station, puis les relations entre les précipitations et le débit.

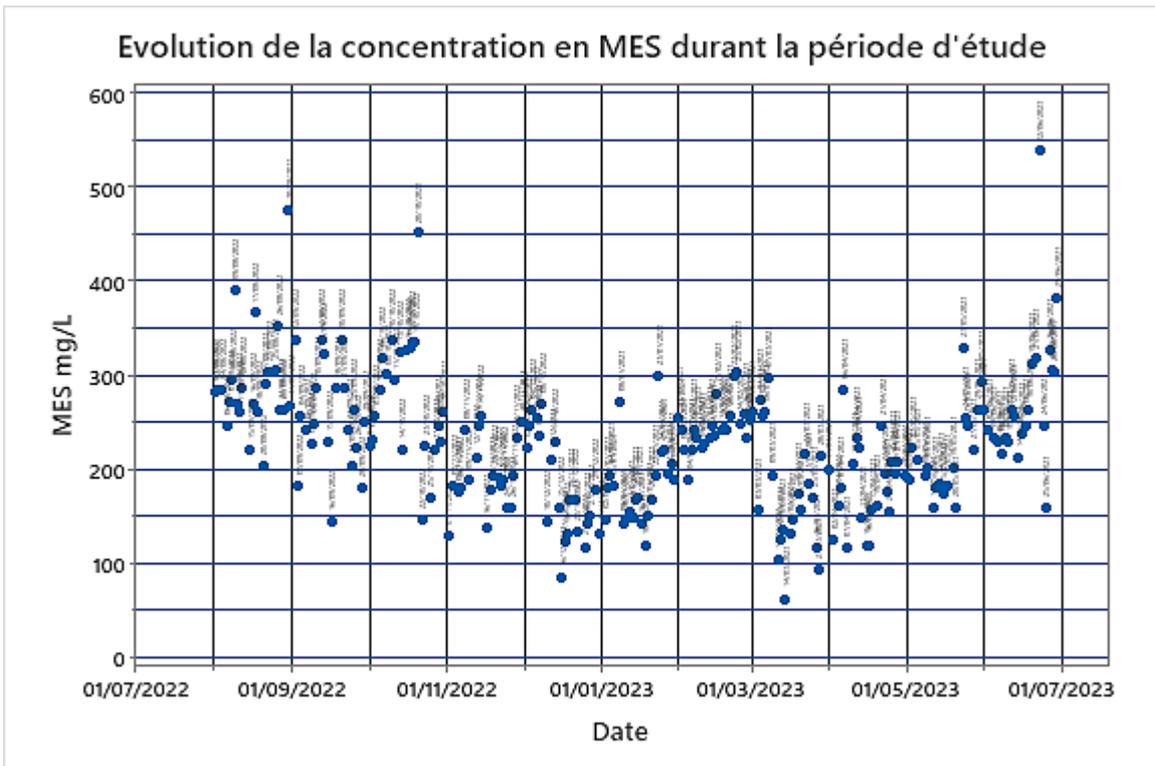


Figure II-7. Evolution de la concentration en MES durant la période d'étude.

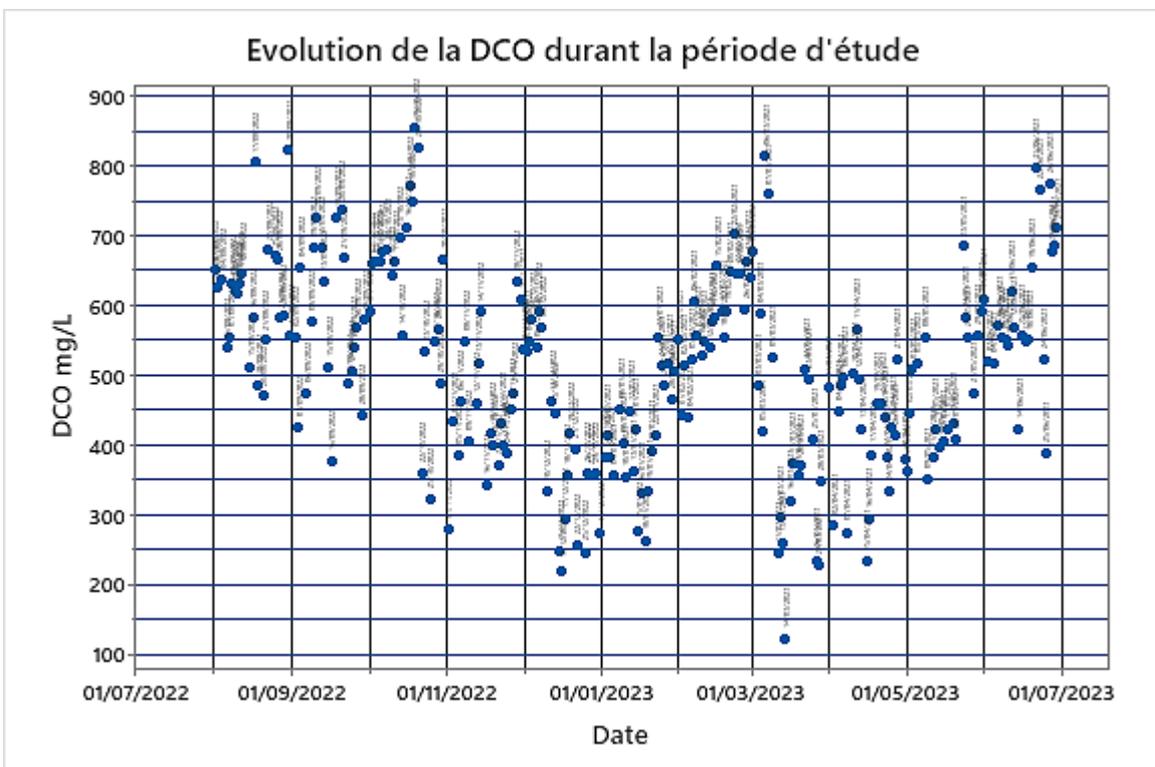


Figure II-8. Evolution de la DCO durant la période d'étude.

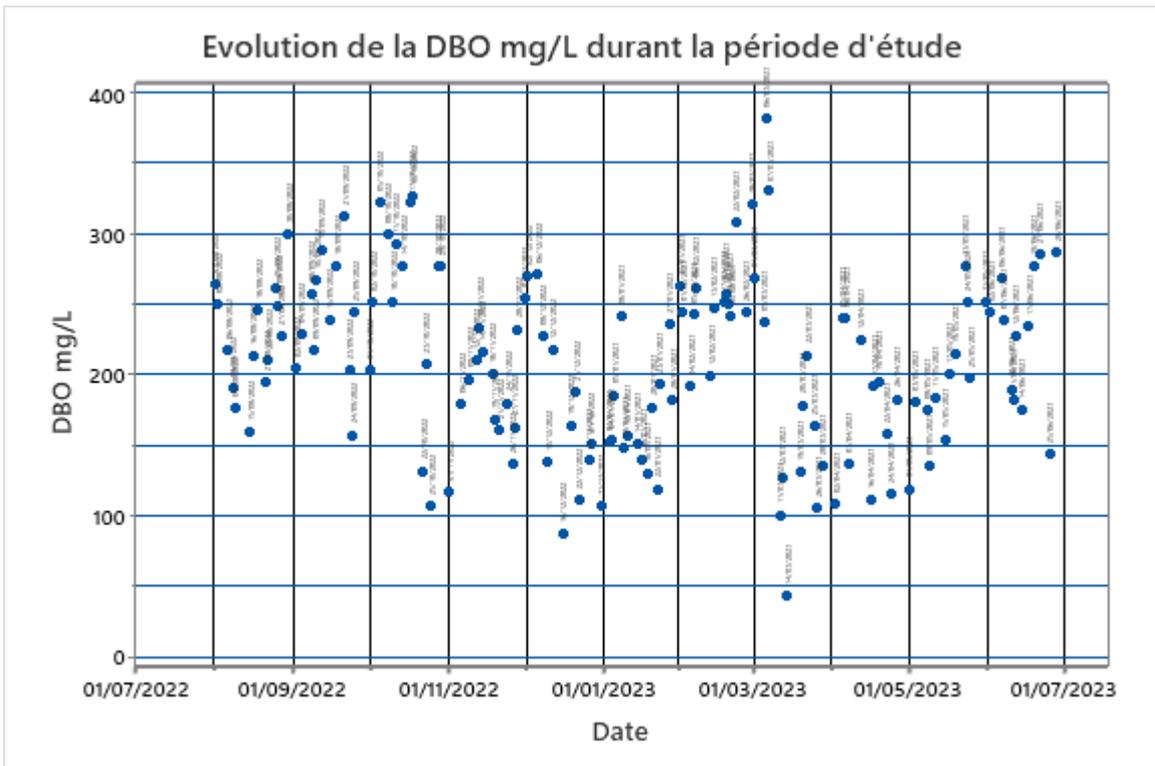


Figure II-9. Evolution de la DBO durant la période d'étude.

### II.1.2.1. Relations entre charges et débit à l'entrée de la station

La Figure II-10 montre que les grandes fluctuations de la concentration en MES, observées plus haut, sont liées à des épisodes de haut débit des eaux d'entrée de la station, notamment en octobre et décembre 2022 et en mars 2023. Ce constat pourrait attester de l'entrée, parfois importante, d'eaux pluviales dans le réseau de collecte des eaux usées.

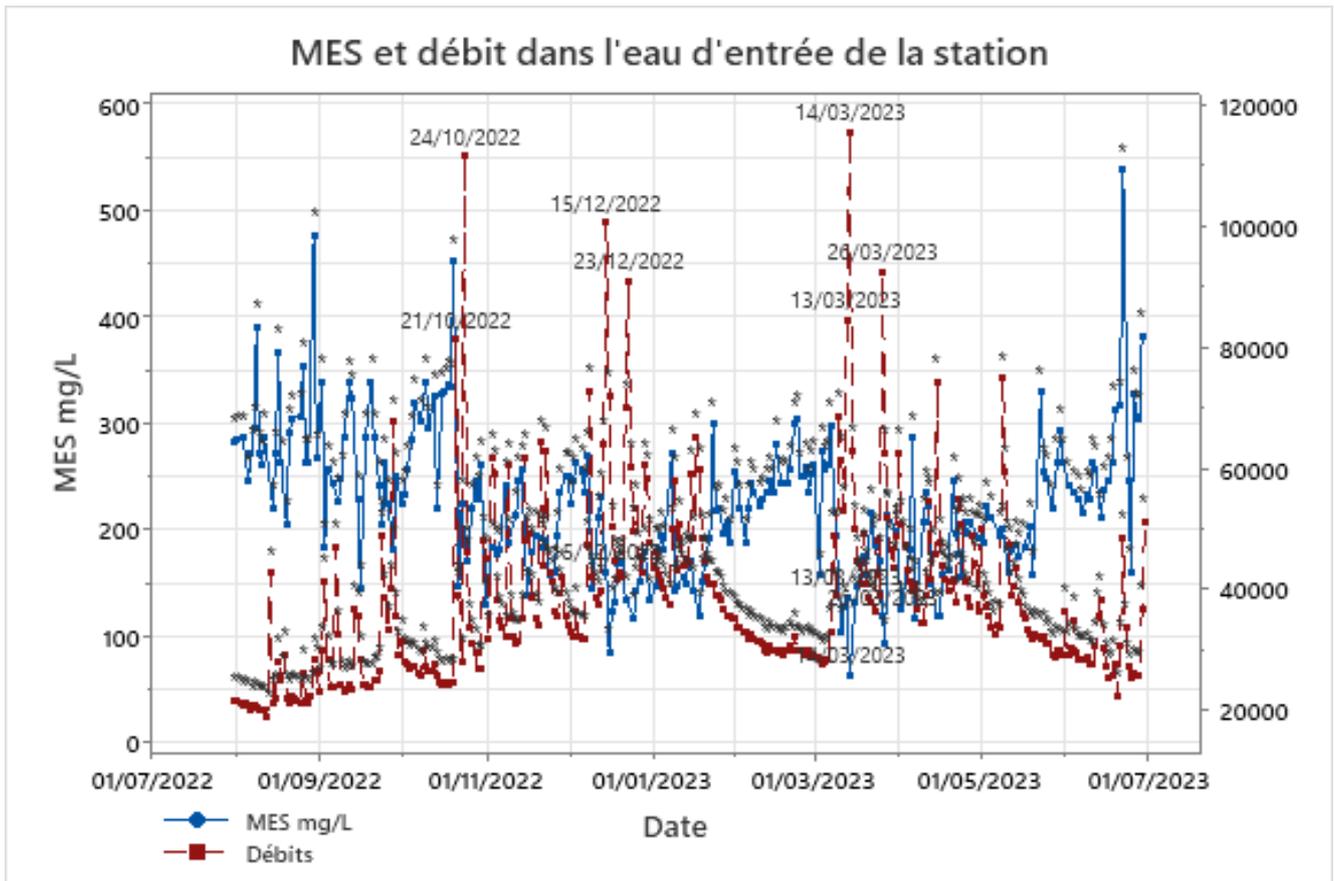


Figure II-10. Variations du débit et de la concentration en MES de l'eau d'entrée de la station, durant la période d'étude.

La relation entre le débit des eaux à l'entrée de la station et les charges transportées représentée sur la Figure II-11, montre qu'elle ne résulte évidemment pas de la simple dilution des eaux usées. Elle ne révèle pas de spécificité notable pour l'un ou l'autre des trois descripteurs. La variabilité des charges est importante dans la gamme des "petits" débits (20000 à 40000 m<sup>3</sup>/h) et s'amenuise au-delà. Un point d'inflexion particulier apparaît au niveau d'un débit de l'ordre de 55000 m<sup>3</sup>/h.

### II.1.2.2. Identification de périodes de régime hydrauliques homogènes

Les analyses des paragraphes précédents montrent que l'interprétation de la composition des eaux à l'entrée de la station et, en aval, celle des effets des traitements sur ses constituants, ne peut pas être faite à l'échelle de l'ensemble des dates d'analyse. La matrice devait donc être partitionnée en périodes que nous avons choisi de définir à partir des relations pluies - débits (périodes de stabilité, périodes d'instabilité, périodes au cours

desquelles les évolutions ont été monotones). Pour qu'une interprétation générale puisse en être donnée, il fallait aussi que chacun des types de situation soit reconnu à plusieurs reprises durant les 11 mois couverts par la base de données.

Deux types de régime pluie-débit ont ainsi été retenus :

- Périodes sans précipitation ou avec précipitations de faibles amplitudes et de courtes durées durant lesquelles le débit diminue régulièrement (périodes désignées "QDécr")
- Périodes de forte instabilité, couvrant l'amont et l'aval d'épisodes de fortes précipitations (QInst-2)

Durant la période d'étude, ces épisodes ont été identifiés à 4 reprises, pour le régime QDécr et à 3 reprises pour le régime QInst-2 (Figure II-12). Les évolutions des précipitations et du débit durant ces périodes sont données dans la Figure II-13 et dans la Figure II-14.

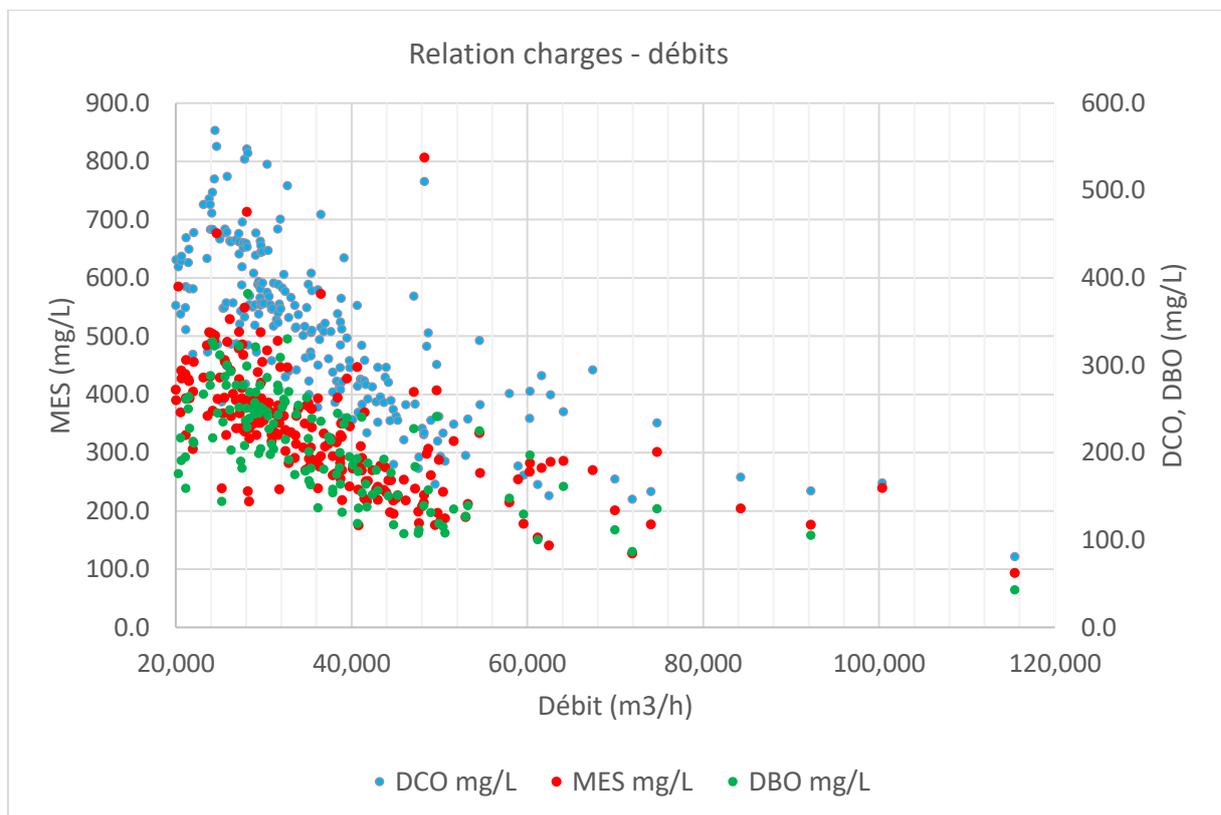


Figure II-11. Relation entre le débit et les charges en MES, DCO et DBO dans l'eau d'entrée de la station.

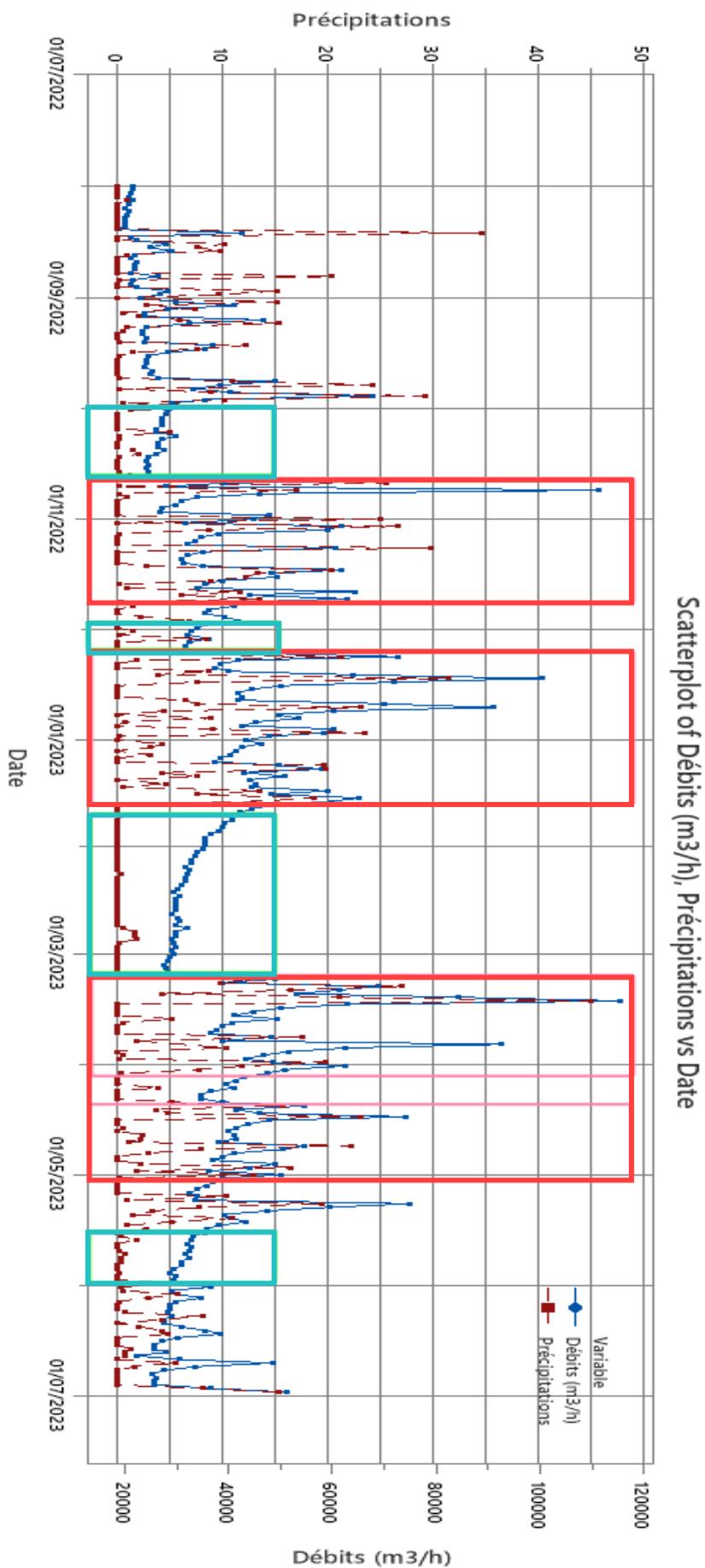


Figure II-12. Situation des types de régimes pluies-débit durant la période d'étude. Les encadrés bleus correspondent aux périodes Qdéc, les rouges aux périodes Qinst-2. Leurs définitions sont données dans le texte.

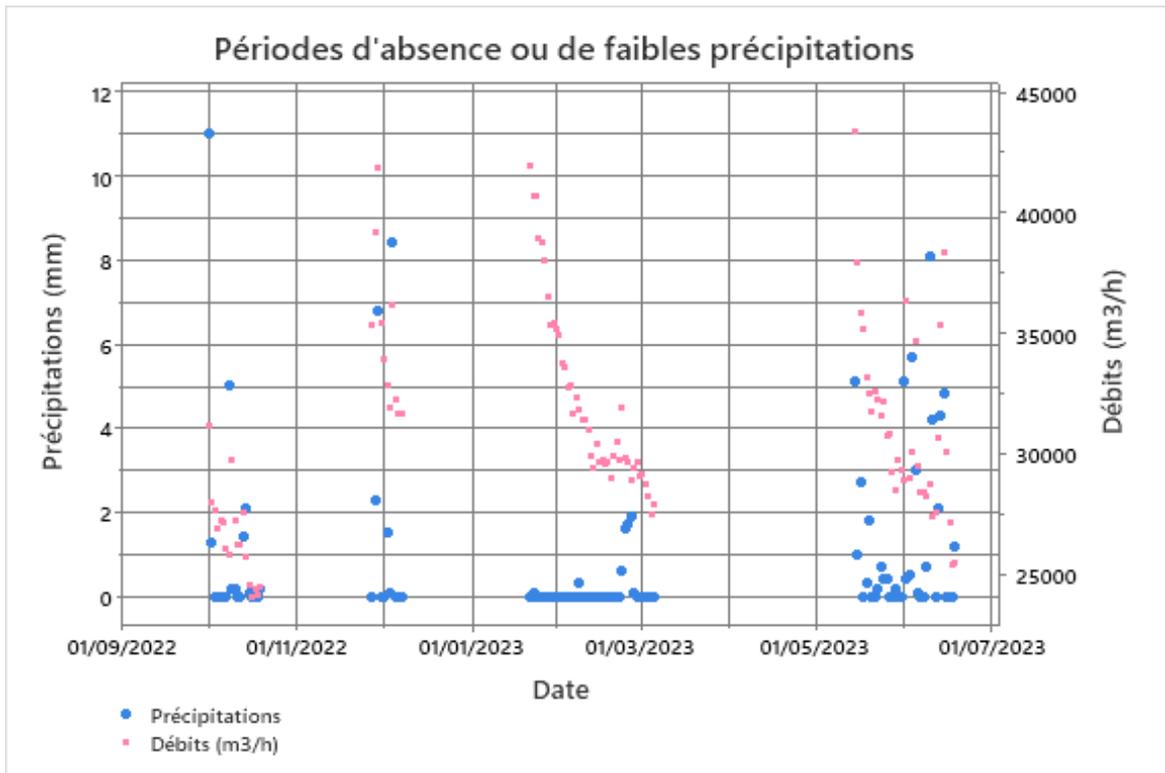


Figure II-13. Evolutions des précipitations et du débit durant les périodes d'absence ou de faibles précipitations.

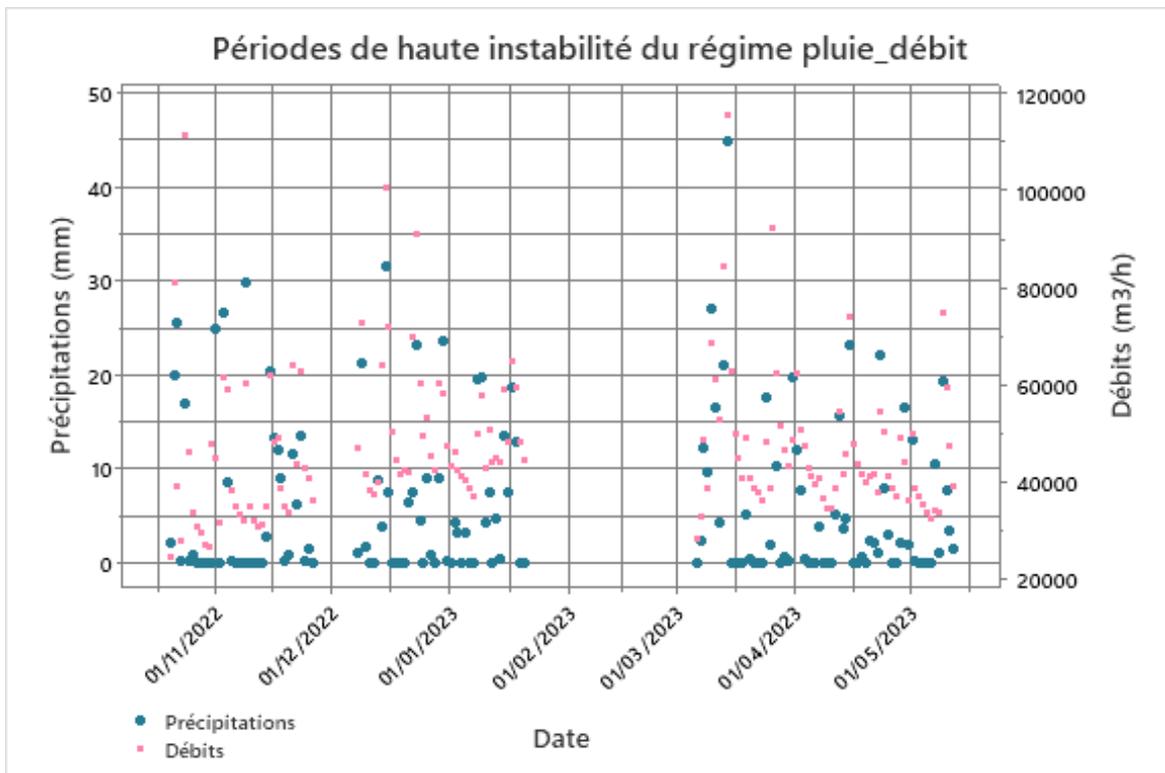


Figure II-14. Evolutions des précipitations et du débit durant les périodes de forte instabilité du régime pluie-débit.

C'est donc dans le cadre de chacun de ces régimes pluies-débits que nous avons poursuivi l'étude de leurs effets sur les charges des eaux usées et, en aval, sur les performances des traitements. Les médianes des descripteurs, dans chacune de ces périodes, sont données dans le Tableau II-3 et la Figure II-15. Une comparaison est faite des rapports des descripteurs de charge entre eux dans la Figure II-16.

*Tableau II-3. Médianes des descripteurs pour les périodes correspondant aux régimes pluies-débit choisis. DECR = périodes d'absence de précipitation ou de faibles précipitations ; INST-2 = périodes de forte instabilité.*

Descripteur	Périodes	
	DECR	INST-2
<b>Pluies</b>	0	2.2
<b>Débits (m<sup>3</sup>/h)</b>	29885	44642
<b>MES mg/L</b>	249.5	169.5
<b>DBO mg/L</b>	252	158
<b>DCO mg/L</b>	582	386.1
<b>DBO/DCO</b>	0.44	0.42

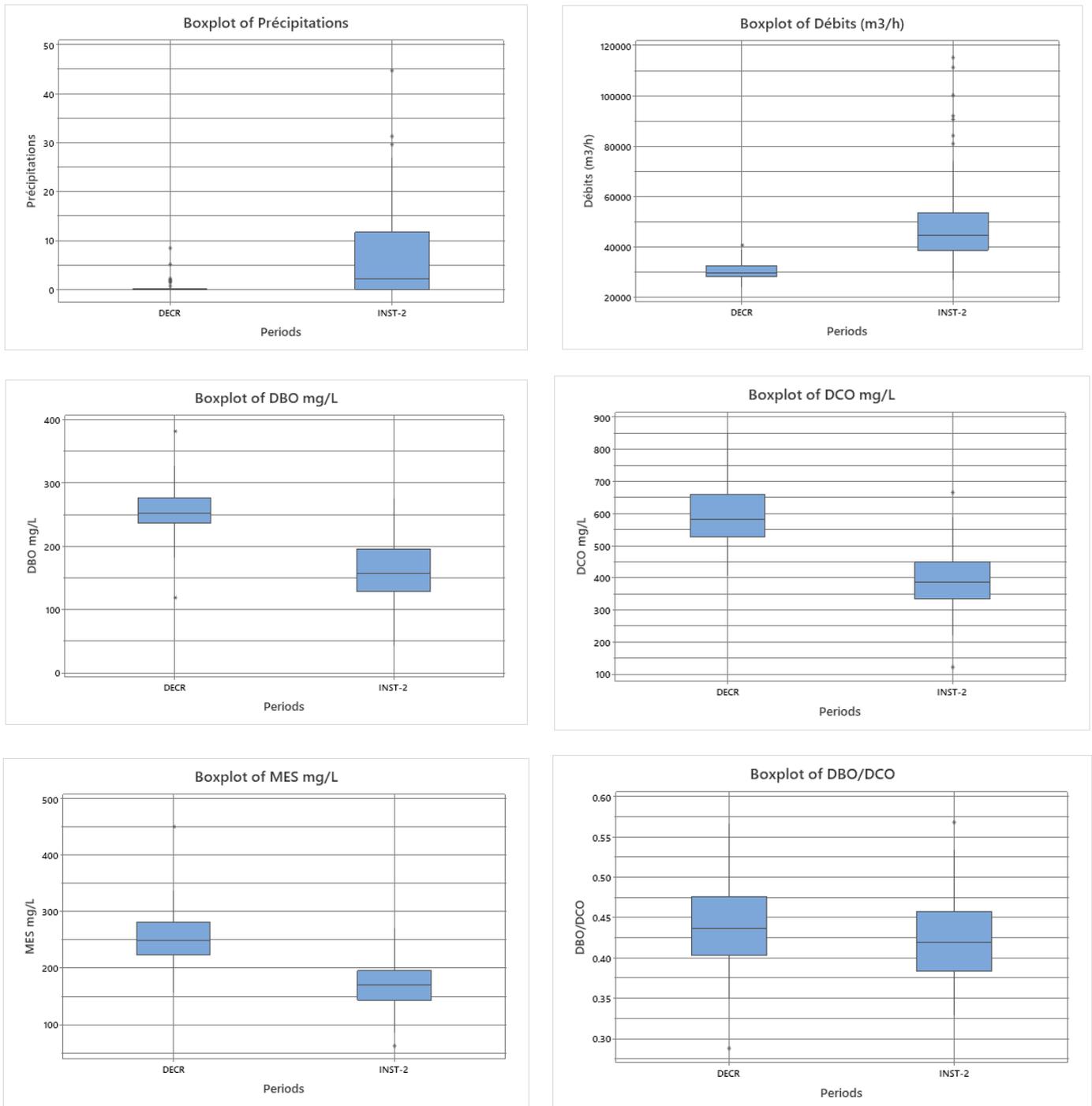


Figure II-15. Médianes et écarts interquartiles des descripteurs pour les périodes correspondant aux régimes pluies-débit choisis. DECR = périodes d'absence de précipitation ou de faibles précipitations ; INST-2 = périodes de forte instabilité.

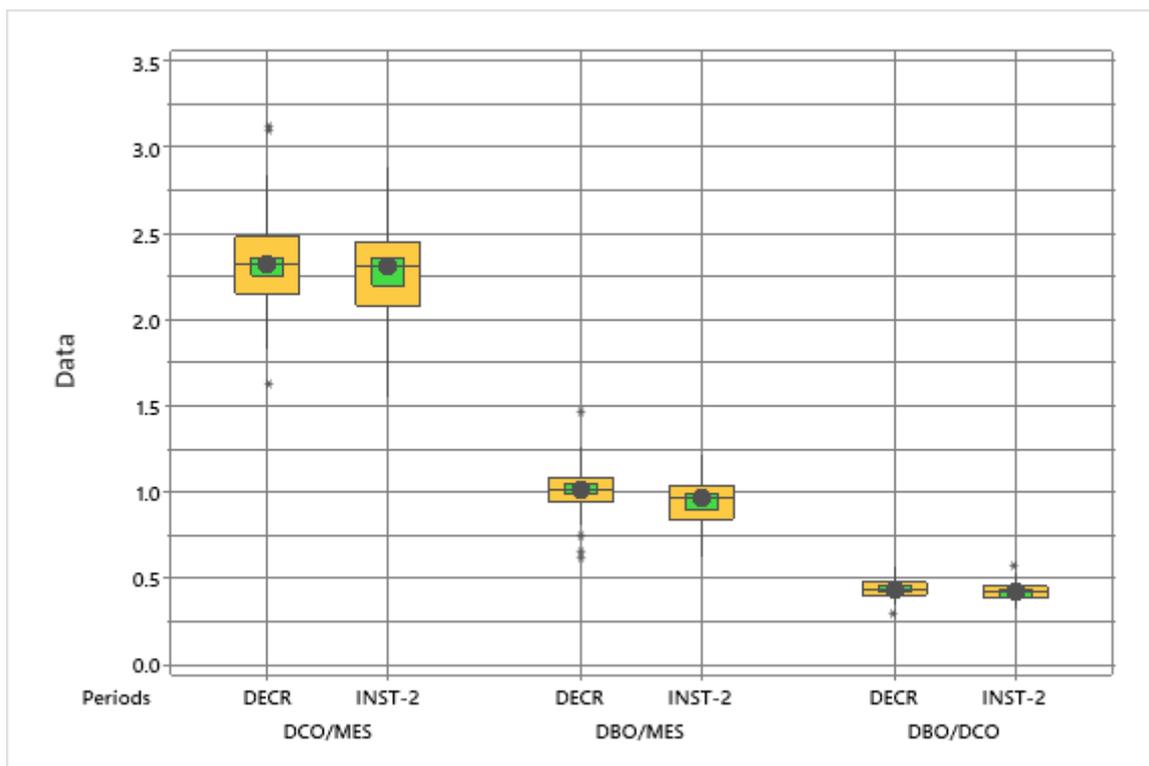


Figure II-16. Comparaison des rapports (médianes) entre les descripteurs de la charge des eaux entre les deux régimes pluie-débit (DECR, INST-2). Cadre vert = intervalle de confiance de la médiane ; cadre orange = écart interquartile.

La diminution de la médiane des descripteurs de la charge organique de l'eau d'entrée de l'UDEP (DCO, DBO) entre les deux régimes semble indiquer un effet de dilution lié à l'accroissement concomitant de la médiane des débits. La même observation peut être faite à propos des MES, à l'inverse de ce qui pouvait être attendu sachant que des processus d'érosion accompagnent généralement de fortes précipitations. On note également l'absence de différence significative entre les médianes des rapports entre les descripteurs de la charge des eaux (DCO/MES, DBO/MES, DBO/DCO, Figure II-16), ce qui semble indiquer un effet négligeable des charges additionnelles apportées par les précipitations sur la composition de la fraction organique des charges transportées.

Ces deux remarques semblent converger vers le constat que le caractère partiellement unitaire du réseau de collecte des eaux usées de la communauté d'agglomération Grand Chambéry, se traduirait essentiellement par un effet de dilution.

### II.1.3. Relations entre les descripteurs au sein de chacun des régimes hydriques précédemment définis

#### II.1.3.1. Périodes d'absence de précipitations ou de faibles précipitations.

Durant ces périodes, l'effet de dilution évoqué plus haut est observé avec une diminution du débit de l'eau à l'entrée de l'UDEP (Figure II-17) et l'augmentation concomitante de la concentration des descripteurs (Figure II-18).

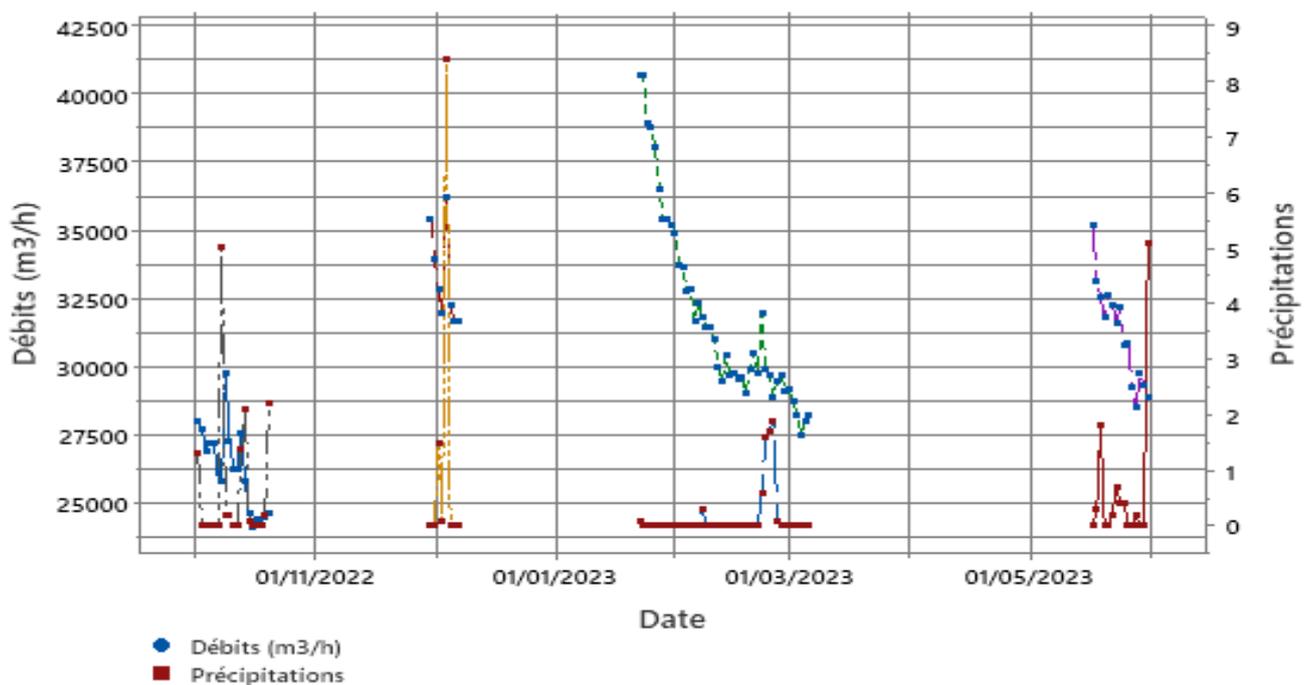


Figure II-17. Evolution des pluies et du débit en fonction du temps dans les 4 intervalles sélectionnés pour représenter les périodes d'absence de précipitation ou de faibles précipitations. Eau d'entrée de l'UDEP.

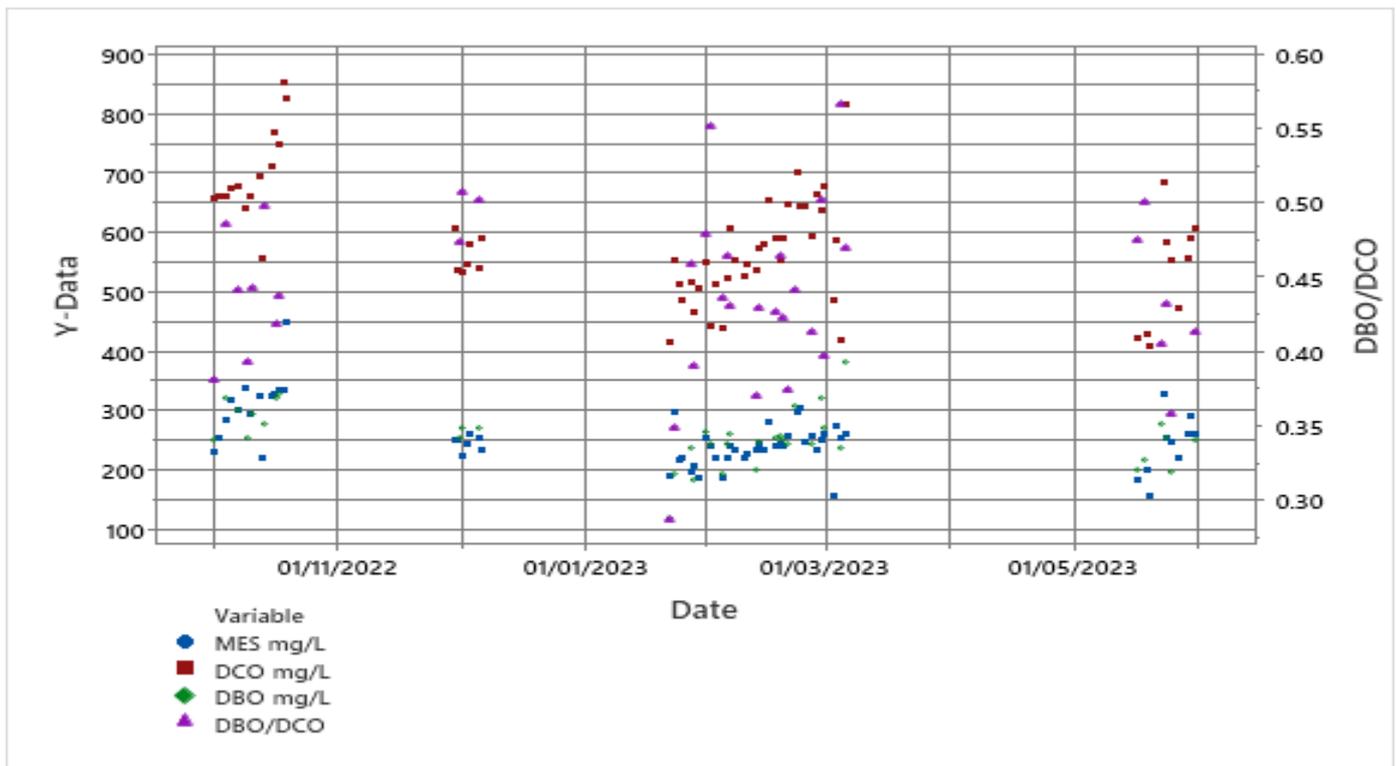


Figure II-18. Evolution des descripteurs en fonction du temps. Eau d'entrée de l'UDEP, périodes d'absence de précipitation ou de faibles précipitations

Durant ces périodes, tous les descripteurs sont significativement corrélés positivement entre eux et, de façon négative avec le débit, en accord avec les remarques précédentes (Tableau II-4). On note que la corrélation avec le débit est sensiblement la même pour les trois descripteurs. Il semblerait donc que, durant ces périodes, d'absence et de faibles précipitations, l'effet des apports d'eaux de ruissellement soit limité à celui d'un volume d'eau, faiblement chargé sur le plan des MES et des composés organiques, dont la diminution a pour conséquence de réduire la dilution des eaux usées, d'où l'augmentation des valeurs des concentrations. Cette interprétation doit bien sûr être relativisée par le fait que durant ces périodes, la charge des eaux usées subit, elle aussi, des variations propres, indépendantes des conditions météorologiques, comme le montre la matrice de la Figure II-19. Le Tableau II-4 fait également apparaître une valeur particulièrement élevée du coefficient rho entre MES et DCO et confirme l'absence de corrélation entre le débit et le rapport DBO/DCO remarquée précédemment.

Tableau II-4. Corrélations de rang (Spearman) entre le débit et les descripteurs des charges à l'entrée de la station durant les périodes sans précipitation.  $H_0$  = pas de corrélations entre les deux variables. P-value = probabilité d'obtenir un résultat au moins égal à celui obtenu.

Sample 1	Sample 2	N	Correlation	95% CI for $\rho$	P-Value
MES (mg/L)	Débits (m3/h)	66	-0.569	(-0.722, -0.363)	0.000
DBO (mg/L)	Débits (m3/h)	38	-0.595	(-0.780, -0.316)	0.000
DCO (mg/L)	Débits (m3/h)	66	-0.656	(-0.785, -0.473)	0.000
DBO/DCO	Débits (m3/h)	38	-0.030	(-0.347, 0.292)	0.858
DBO (mg/L)	MES (mg/L)	38	0.603	(0.325, 0.785)	0.000
DCO (mg/L)	MES (mg/L)	66	0.800	(0.672, 0.881)	0.000
DBO/DCO	MES (mg/L)	38	-0.146	(-0.446, 0.184)	0.382
DCO (mg/L)	DBO (mg/L)	38	0.758	(0.547, 0.878)	0.000
DBO/DCO	DBO (mg/L)	38	0.373	(0.050, 0.626)	0.021
DBO/DCO	DCO (mg/L)	38	-0.233	(-0.518, 0.098)	0.159

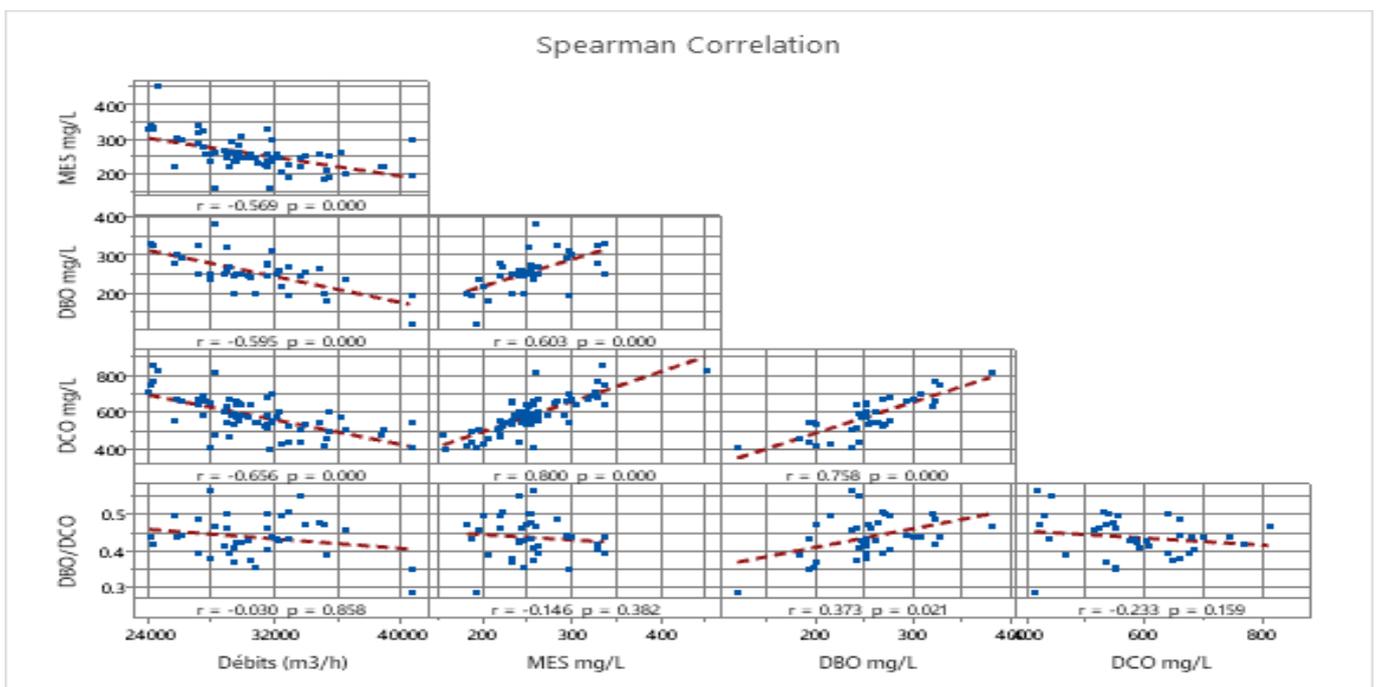


Figure II-19. Matrice de scattergrams croisant les valeurs du débit à l'entrée de la station et les descripteurs MES, DCO, DBO et DBO/DCO durant les périodes sans précipitation.  $r$  = coefficient rho ;  $p$  = probabilité de l'hypothèse  $H_0$ .

### II.1.3.2. Périodes de forte instabilité

L'alternance d'épisodes pluvieux de différentes amplitudes (Figure II-20) se traduit par une forte dispersion des charges organiques de l'eau (Figure II-21).

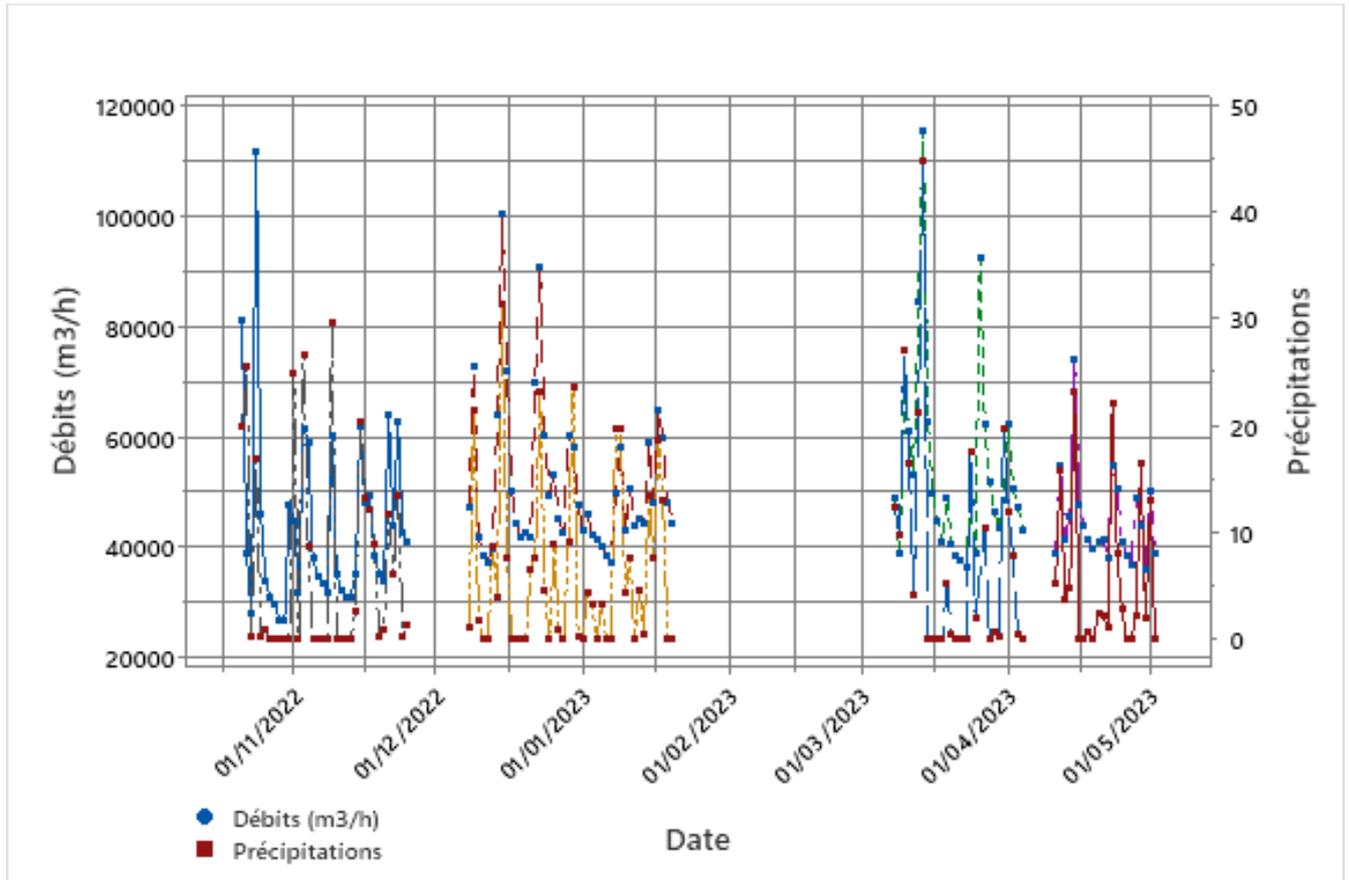


Figure II-20. Evolution des pluies et du débit en fonction du temps dans les 4 intervalles sélectionnés pour représenter les périodes de forte instabilité. Eau d'entrée de l'UDEP.

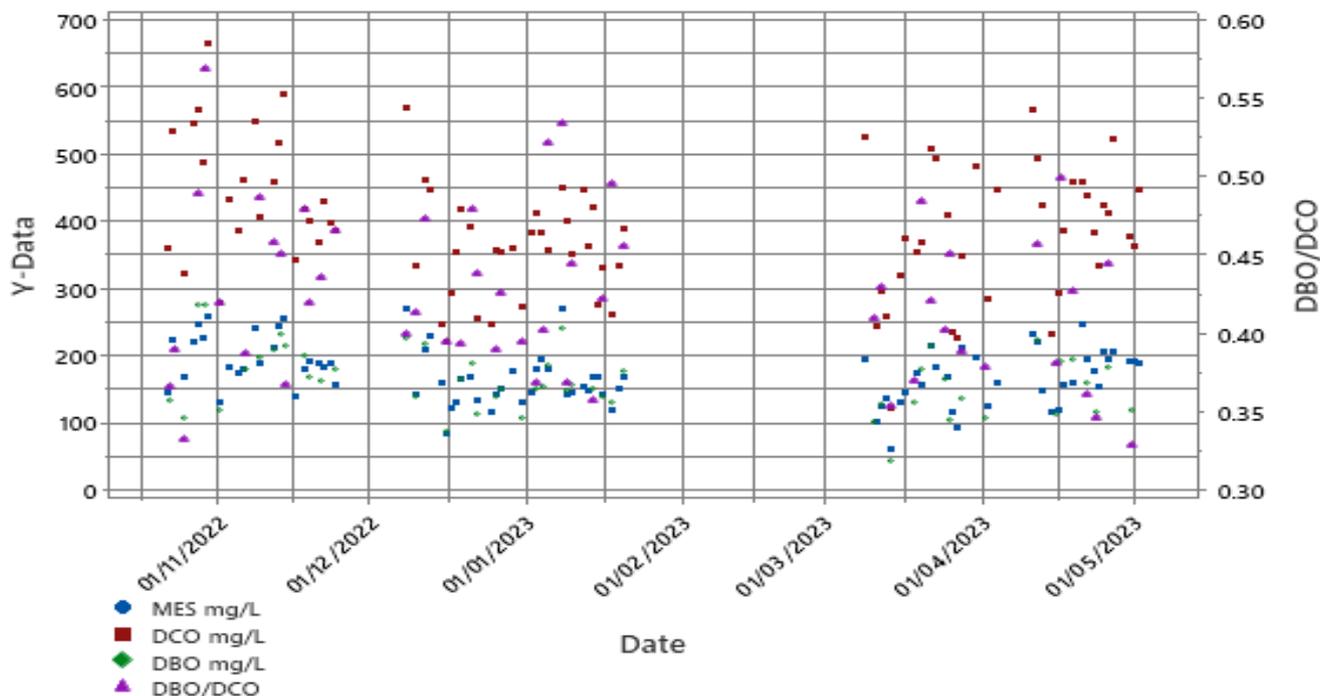


Figure II-21. Evolution des descripteurs en fonction du temps. Eau d'entrée de l'UDEP, périodes de forte instabilité.

Tous les descripteurs restent significativement corrélés entre eux et négativement corrélés au débit durant ces périodes d'instabilité et de fortes précipitations (Tableau II-5). Le résultat va dans le sens des remarques précédentes sur le fait que les eaux apportées durant ces épisodes de pluies, ont pour principal effet celui de diluer les charges des eaux usées.

Tableau II-5. Corrélations de rang (Spearman) entre le débit et les descripteurs des charges à l'entrée de la station durant les périodes de forte instabilité.  $p$  = probabilité de l'hypothèse  $H_0$ .

Sample 1	Sample 2	N	Correlation	95% CI for $\rho$	P-Value
MES (mg/L)	Débits (m <sup>3</sup> /h)	89	-0.603	(-0.729, -0.436)	0.000
DBO (mg/L)	Débits (m <sup>3</sup> /h)	53	-0.660	(-0.800, -0.451)	0.000
DCO (mg/L)	Débits (m <sup>3</sup> /h)	89	-0.724	(-0.819, -0.591)	0.000
DBO/DCO	Débits (m <sup>3</sup> /h)	53	-0.165	(-0.419, 0.112)	0.237
DBO (mg/L)	MES (mg/L)	53	0.812	(0.671, 0.896)	0.000
DCO (mg/L)	MES (mg/L)	89	0.844	(0.758, 0.902)	0.000
DBO/DCO	MES (mg/L)	53	0.186	(-0.091, 0.437)	0.182
DCO (mg/L)	DBO (mg/L)	53	0.902	(0.819, 0.948)	0.000
DBO/DCO	DBO (mg/L)	53	0.557	(0.319, 0.729)	0.000
DBO/DCO	DCO (mg/L)	53	0.189	(-0.088, 0.439)	0.175

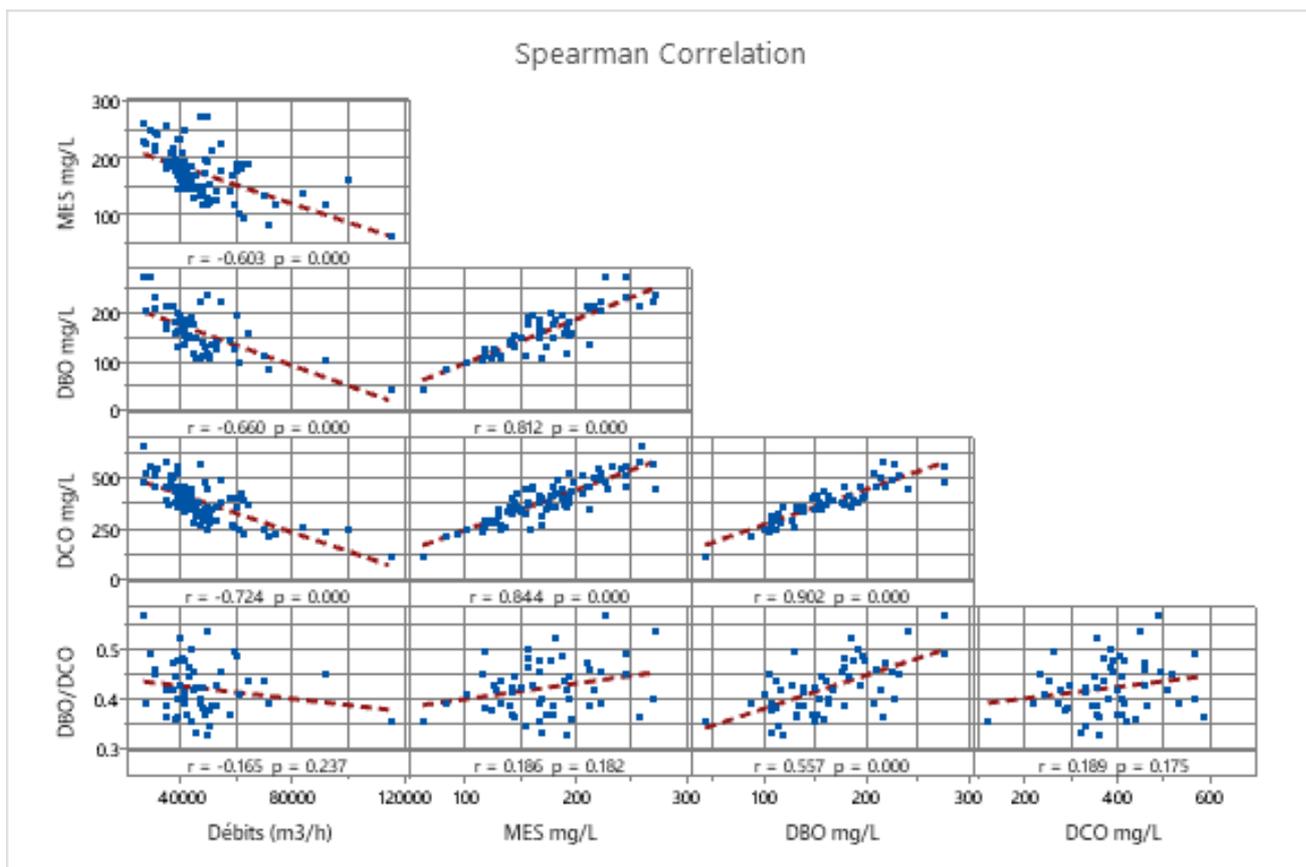


Figure II-22. Matrice de scattergrams croisant les valeurs du débit à l'entrée de la station et les descripteurs MES, DCO, DBO et DBO/DCO durant les périodes de forte instabilité.  $r$  = coefficient rho ;  $p$  = probabilité de l'hypothèse  $H_0$ .

#### II.1.4. Corrélations entre les précipitations, le débit et les charges entrantes

Les analyses présentées dans le chapitre précédent semblent indiquer que les événements pluvieux sont effectivement associés à une augmentation du débit des eaux à l'entrée de l'UDEP, mais sans en augmenter significativement la charge. Ce constat, en partie inattendu, peut être expliqué par le caractère suffisamment séparatif du réseau de collecte des eaux usées. Nous avons cependant souhaité prolonger notre recherche d'indices témoignant d'apports d'origine terrestre dans les eaux usées. Ces apports additionnels sont en effet susceptibles de contenir des composés réfractaires à la biodégradation tels que les acides humiques, qui peuvent avoir des conséquences sur les traitements appliqués aux eaux, mais aussi sur les analyses des charges virales basées sur des techniques moléculaires (Opel *et al.* 2010).

La poursuite de nos analyses, dans ce chapitre, vise donc à mettre en évidence ces apports en utilisant comme indicateurs, les relations entre les événements pluvieux et la concentration

des charges organiques de l'eau, d'une part, ou les valeurs relatives des 4 descripteurs choisis, les uns par rapport aux autres, d'autre part.

Les effets du facteur précipitations dépendent de ses trois composantes, amplitude, durée et fréquence. Pour en tenir compte, les variables dépendantes "débit" et "charges des eaux usées" ont été confrontées à des moyennes de hauteur de précipitations calculées à partir du jour des analyses et sur un nombre croissant de jours précédents (jusqu'à 5 jours). Ces moyennes et le nombre de jours auquel elles sont associées, constituent une forme d'intégration des trois composantes des précipitations, à partir desquelles nous avons recherché les corrélations avec le débit et les descripteurs des charges transportées. Seules les périodes incluses dans le groupe INST-2 ont été prises en compte pour les calculs. Les corrélations entre le débit à l'entrée de l'UDEP et les différents niveaux d'intégration des précipitations, sont toutes significatives (Tableau II.6), la plus grande étant observée avec les précipitations du jour de la mesure.

*Tableau II-6. Corrélation (rho de Spearman) entre le débit et différents calculs de moyenne des précipitations (Détail des calculs donné dans le texte). Période INST-2.  $P_i$  avec  $i$  correspondant au nombre de jours pris en compte dans le calcul des précipitations.*

Période	Précipitations	Débits (m3/h)	N	rho (Spearman)	95% CI for $\rho$	P-Value
INST-2	P1	Débits (m3/h)	130	0.635	(0.507, 0.735)	0.000
INST-2	P2	Débits (m3/h)	130	0.591	(0.455, 0.700)	0.000
INST-2	P3	Débits (m3/h)	130	0.547	(0.403, 0.664)	0.000
INST-2	P4	Débits (m3/h)	130	0.477	(0.324, 0.606)	0.000
INST-2	P5	Débits (m3/h)	130	0.362	(0.197, 0.507)	0.000
INST-2	P6	Débits (m3/h)	130	0.314	(0.146, 0.465)	0.000

Tous les coefficients sont significatifs, également, avec les descripteurs de la charge de l'eau, mais c'est, au contraire, pour les précipitations du jour de la mesure du débit que les valeurs du coefficient rho sont les plus faibles (Tableau II-7). Les corrélations les plus fortes s'établissent avec la moyenne des hauteurs de pluie des 4 jours précédents pour les MES, des 3 jours précédents, pour la DCO et des 2 jours précédents pour la DBO.

Tableau II-7. Corrélation (rho de Spearman) entre les descripteurs et différents calculs de moyenne des précipitations (Détail des calculs donné dans le texte). Période INST-2.

Précipitations	Descripteurs	N	rho (Spearman)	95% CI for $\rho$	P-Value
P1	MES mg/L	89	-0.20	(-0.396, 0.008)	0.057
P2	MES mg/L	89	-0.40	(-0.568, -0.202)	0.000
P3	MES mg/L	89	-0.54	(-0.678, -0.358)	0.000
P4	MES mg/L	89	-0.60	(-0.724, -0.429)	0.000
P5	MES mg/L	89	-0.56	(-0.698, -0.388)	0.000
P6	MES mg/L	89	-0.49	(-0.644, -0.307)	0.000
P1	DCO mg/L	89	-0.33	(-0.505, -0.122)	0.002
P2	DCO mg/L	89	-0.49	(-0.642, -0.305)	0.000
P3	DCO mg/L	89	-0.59	(-0.717, -0.416)	0.000
P4	DCO mg/L	89	-0.56	(-0.698, -0.388)	0.000
P5	DCO mg/L	89	-0.49	(-0.640, -0.302)	0.000
P6	DCO mg/L	89	-0.42	(-0.586, -0.226)	0.000
P1	DBO mg/L	53	-0.34	(-0.565, -0.070)	0.012
P2	DBO mg/L	53	-0.59	(-0.749, -0.355)	0.000
P3	DBO mg/L	53	-0.58	(-0.748, -0.353)	0.000
P4	DBO mg/L	53	-0.51	(-0.693, -0.258)	0.000
P5	DBO mg/L	53	-0.46	(-0.659, -0.205)	0.000
P6	DBO mg/L	53	-0.45	(-0.647, -0.187)	0.001

En d'autres termes, le débit est principalement contrôlé par les précipitations du jour, alors que les charges le sont par les moyennes des précipitations des jours précédents. Le constat apparaît irrationnel dans le cadre d'une vision mécanique des relations précipitations – débit – concentrations qui s'adresse aux éléments conservatifs de l'eau. Elle ne s'applique plus dans le cas des éléments dont la concentration est susceptible d'être affectée par différents mécanismes (biodégradation, réactions chimiques) au cours du cheminement de l'eau. C'est l'une des interprétations qui peuvent être évoquées pour répondre aux deux principales questions que posent les résultats du Tableau II-7 :

- La mesure qui représente les éléments les plus conservatifs des charges de l'eau devrait être celle des MES. La première question est alors celle de la raison pour laquelle ce descripteur établit la corrélation la plus grande avec la moyenne des précipitations des 4 jours précédents celui de son analyse. Nous l'interprétons comme étant la conséquence de la grande variabilité des deux grandeurs (événements pluvieux et processus de recrutement de matières), variabilité à laquelle la valeur des coefficients de corrélation et leur signification

sont très sensibles. Leur intégration sur plusieurs jours conduit à des valeurs moins "bruitées" au sens statistique, à partir desquelles des corrélations plus significatives peuvent être observées.

- La seconde question concerne les différences observées entre les trois descripteurs de la charge des eaux, qui nous semblent être liées à leur caractère plus ou moins conservatif : En étant associées à des valeurs intégrées de précipitations (intégration amplitude - temps), les moyennes des descripteurs représentent, chacune, le recrutement de quantités d'eau (d'origine atmosphérique) et de matières (d'origine terrestre) durant le laps de temps considéré. Les analyses faites à l'entrée de l'UDEP au jour 1, sont équivalentes à une photo qui serait prise des charges, au terme de ce laps de temps. Ces mesures sont en fait celles de la résultante des recrutements initiaux de matières, mais aussi des mécanismes (biodégradations, réactions chimiques) qui ont pu affecter les concentrations durant le transfert de l'eau. C'est le cas, en particulier, des matières organiques dissoutes biodégradables, mesurées par la DBO, dont les mesures faites à l'entrée de l'UDEP, représentent les quantités initialement recrutées, diminuées de la consommation faites par les bactéries au cours du transit de l'eau. Ainsi, le caractère biodégradable des composés analysés par la DBO ferait que leur concentration atteint plus vite que celles des deux autres descripteurs, le niveau de stabilité requis (une faible variabilité) pour conduire à une valeur plus grande du coefficient rho (le coefficient est inversement proportionnel au produit des écarts types des deux grandeurs dont la corrélation est cherchée). Les valeurs les plus grandes du coefficient sont associées aux moyennes de précipitations établies sur 4 j, 3 j et 2 j pour les MES, la DCO et la DBO, respectivement, c'est-à-dire dans l'ordre supposé d'une biodégradabilité croissante.

En raison des différences relativement faibles qui séparent les valeurs du coefficient, l'ensemble de ces interprétations doit évidemment être considéré comme une "1<sup>ère</sup> approche indicative".

La mise en évidence de ces relations entre les précipitations et les charges des eaux usées, n'apporte pas d'indication sur la possibilité qu'une partie d'entre elles ait une origine terrestre. C'est la recherche de corrélations entre les précipitations et les changements éventuels des proportions des trois descripteurs, les uns relativement aux autres, qui pourrait apporter cette information (Tableau II-8). Seules deux corrélations significatives sont observées, celle du rapport DBO/DCO avec les précipitations du jour de l'analyse et celle du rapport DCO/MES avec la moyenne des précipitations du jour de l'analyse et du jour précédent (P2). Le signe des coefficients et la Figure II-23 montre que l'augmentation des précipitations s'accompagne de la diminution de la proportion de composés organiques (DCO) par rapport aux MES et de celle des matières organiques biodégradables (DBO) par rapport à celles qui sont réfractaires (la DCO totalisant les deux catégories). Sachant que les eaux de lessivage des milieux terrestres

sont généralement chargées en MES, le sens des variations observées nous semble pouvoir être interprété comme des indices d'une entrée effective d'eaux de lessivage dans le réseau de collecte des eaux usées. Les composés inhibiteurs de PCR, dont ces eaux sont potentiellement chargées, viendraient donc s'ajouter à ceux apportés par les eaux usées proprement dites.

Tableau II-8. Coefficient de corrélations ( $\rho$  de Spearman) calculé entre les rapports des descripteurs de charge des eaux et différents calculs de moyenne des précipitations (Détail des calculs donné dans le texte). Période INST-2.

Moy. des précipitations	Descripteurs	N	$\rho$	95% CI for $\rho$	P-Value
P1	DBO/DCO	53	-0.161	(-0.415, 0.116)	0.250
P2	DBO/DCO	53	-0.291	(-0.524, -0.016)	0.035
P3	DBO/DCO	53	-0.194	(-0.443, 0.083)	0.164
P4	DBO/DCO	53	-0.196	(-0.445, 0.081)	0.159
P5	DBO/DCO	53	-0.239	(-0.481, 0.038)	0.085
P6	DBO/DCO	53	-0.313	(-0.542, -0.040)	0.023
P1	DCO/MES	89	-0.250	(-0.438, -0.040)	0.018
P2	DCO/MES	89	-0.164	(-0.361, 0.048)	0.126
P3	DCO/MES	89	-0.108	(-0.310, 0.103)	0.315
P4	DCO/MES	89	0.050	(-0.160, 0.256)	0.641
P5	DCO/MES	89	0.123	(-0.088, 0.324)	0.251
P6	DCO/MES	89	0.128	(-0.083, 0.329)	0.230
P1	DBO/MES	53	-0.153	(-0.408, 0.124)	0.275
P2	DBO/MES	53	-0.187	(-0.437, 0.090)	0.180
P3	DBO/MES	53	-0.082	(-0.345, 0.193)	0.558
P4	DBO/MES	53	-0.009	(-0.278, 0.262)	0.950
P5	DBO/MES	53	-0.005	(-0.275, 0.266)	0.971
P6	DBO/MES	53	-0.069	(-0.334, 0.205)	0.621

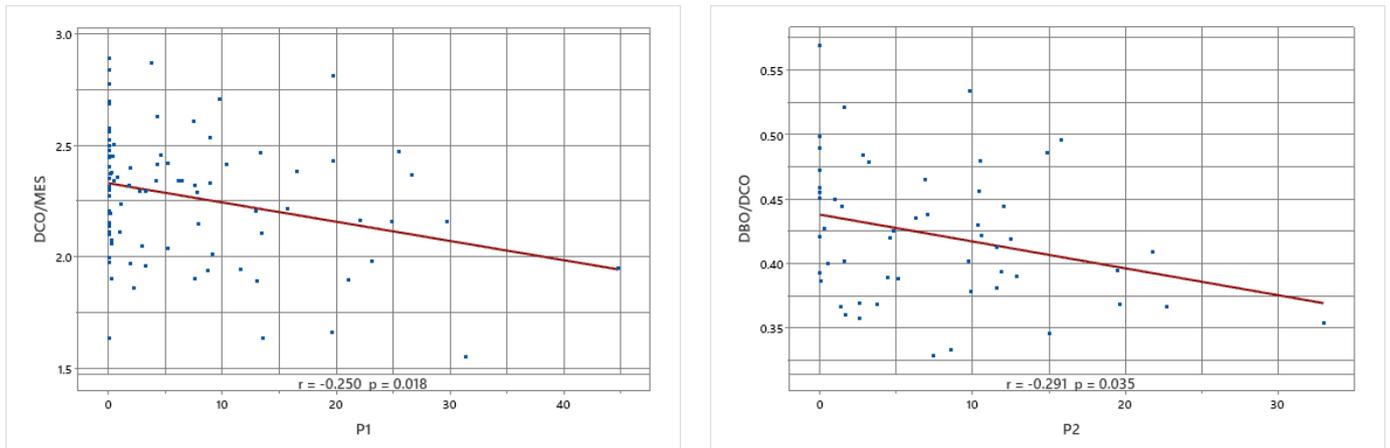


Figure II-23. Variations du rapport DCO/MES en fonction des précipitations du jour d'analyse et du rapport DBO/DCO en fonction de la moyenne des précipitations du jour d'analyse et du jour précédent. Période INST-2.  $r$  = coefficient de Spearman.

## II.2. Evolution des charges en VEH des eaux usées dans leur transit au sein de l'UDEP

### II.2.1. Ordres de grandeurs et variabilité des charges virales dans les eaux d'entrée

Les charges en VEH ont été analysées à 17 reprises durant la période d'étude, entre le 22 septembre 2022 et le 15 mai 2023. La situation de ces dates d'analyse dans la période couverte par les données qui nous avaient été fournies par l'UDEP, est représentée dans la Figure II-24.

Les charges de l'eau d'entrée sont marquées par le contraste entre, d'une part, les deux groupes de norovirus dont les concentrations sont du même ordre de grandeur et peu dispersées et d'autre part, les adénovirus dont les concentrations sont de l'ordre de 5 fois plus fortes et très dispersées (Tableau II-9 et Figure II-25).

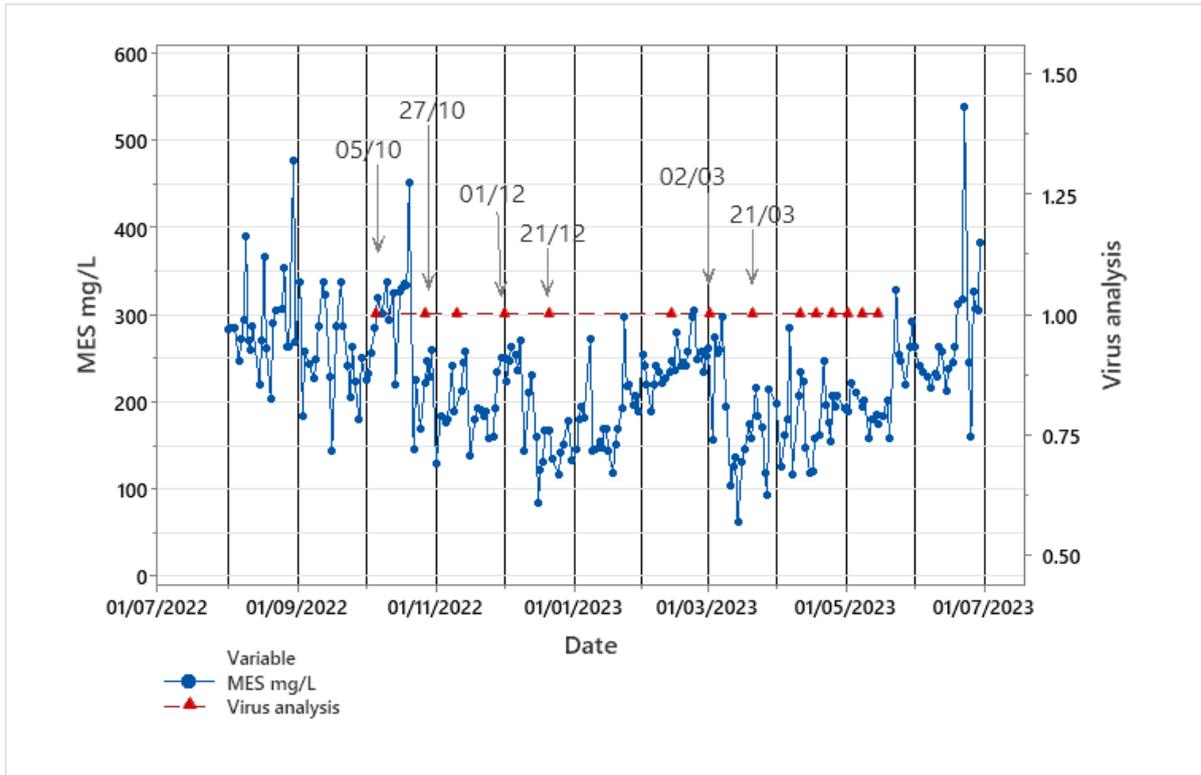


Figure II-24. Situation des analyses de norovirus vis-à-vis des variations des concentrations en MES durant la période d'étude.

Tableau II-9. Statistiques descriptives des charges virales aux trois points d'échantillonnage. Les concentrations virales sont calculées sur des triplicats d'échantillons et duplicats de RT-qPCR. Les valeurs sont exprimées en copies de génome/L.

Variable	Point d'échantillonnage	N	Q1	Median	Q3	IQR
<b>NoV GI</b>	Entrée	17	2.72E+06	4.20E+06	9.81E+06	7.09E+06
	Amont bio	17	1.40E+06	2.70E+06	4.66E+06	3.26E+06
	Sortie	15	6.28E+05	1.76E+06	3.44E+06	2.81E+06
<b>NoV GII</b>	Entrée	15	2.99E+06	4.22E+06	5.16E+06	2.17E+06
	Amont bio	17	8.50E+05	1.69E+06	3.41E+06	2.56E+06
	Sortie	15	7.17E+05	1.77E+06	3.15E+06	2.43E+06
<b>AdV</b>	Entrée	17	1.02E+07	2.28E+07	6.03E+07	5.01E+07
	Amont bio	17	7.95E+06	1.46E+07	2.67E+07	1.88E+07
	Sortie	15	4.58E+06	1.10E+07	2.69E+07	2.23E+07

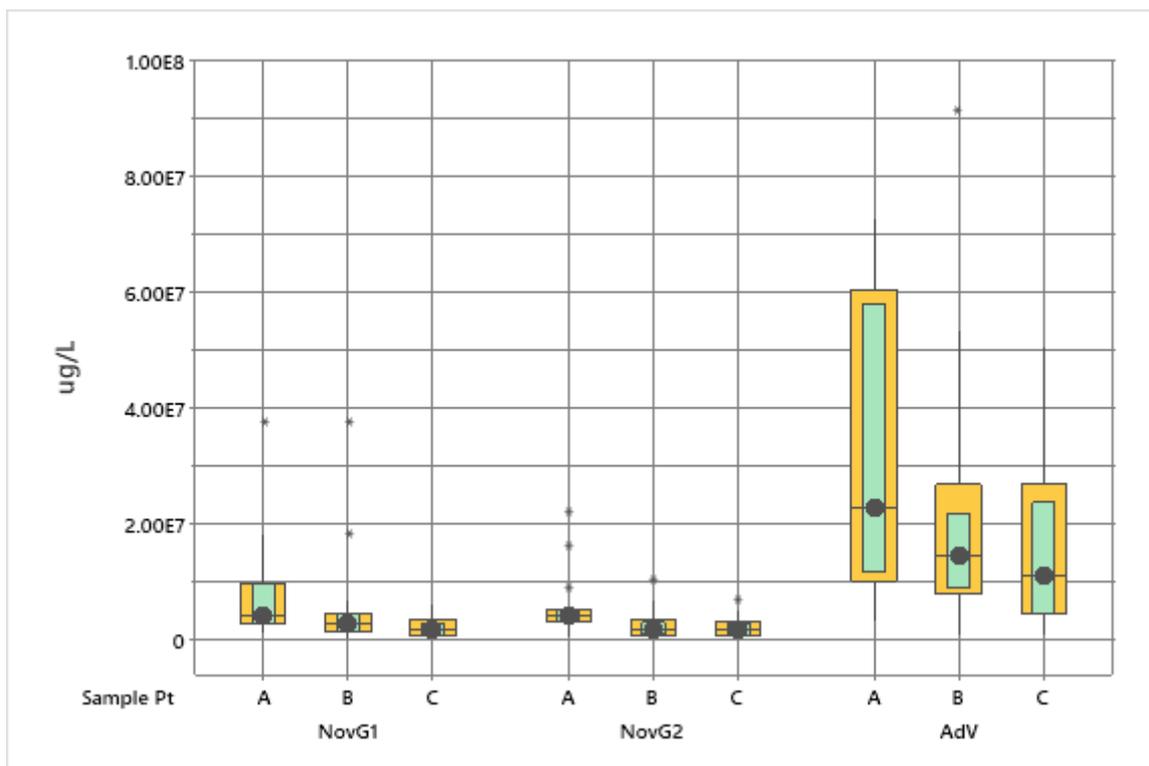


Figure II-25. Comparaison des concentrations virales (médianes en unité génome/L) aux trois points d'échantillonnage (A : entrée de la station, B : amont des biofiltres, C : sortie de la station). Cadre vert intervalle de confiance de la médiane, cadre orange : écart interquartile.

## II.2.2. Relations avec les charges physiques et chimiques des eaux usées à l'entrée de l'UDEP

L'approche utilisée précédemment pour la recherche de relations entre les précipitations et les charges de l'eau a été reproduite ici. Pour chacun des descripteurs, ce sont donc la valeur du jour de l'analyse et les moyennes calculées sur un nombre croissant de jours précédents (jusqu'à 6 jours) qui ont été confrontées aux concentrations des virus, pour le calcul du coefficient de corrélation rho de Spearman.

L'analyse des résultats donnés dans le Tableau II-10 doivent être faite en tenant compte de la faible robustesse de calculs de corrélation réalisés ainsi, sur une matrice de 17 observations, mais aussi des incertitudes importantes qui affectent les mesures de concentration de virus par RT-qPCR. Dans ce sens, seul le fait que la plupart des corrélations significatives impliquent les concentrations de NoV GI, nous semble justifier une interprétation. Pour les 3 descripteurs (MES, DCO, DBO), les valeurs les plus élevées des coefficients sont associées aux moyennes calculées sur 6 jours (incluant le jour de l'analyse). Il apparaît aussi que le coefficient le plus

élevé s'établit avec les MES, suggérant une relation particulière entre les NoV GI et les particules en suspension. Plusieurs des essais exposés dans les autres parties de notre travail conduisent au même constat.

Tableau II-10. Coefficient de corrélation (rho de Spearman) entre les concentrations virales et les moyennes des descripteurs de la charge de l'eau usée calculées pour un nombre croissant de jours précédant le jour de l'analyse. Seuls ont été conservés les coefficients significatifs au seuil  $\alpha = 0.05$ .

NoV GI	MES D1	MES D2	MES D3	MES D4	MES D5	MES D6	
	rho	0.65	0.60	0.69	0.67	0.78	
	p	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	
	DBO D1	DBO D2	DBO D3	DBO D4	DBO D5	DBO D6	
	rho			0.50	0.51	0.59	
	p			0.05	0.04	0.01	
	DCO D1	DCO D2	DCO D3	DCO D4	DCO D5	DCO D6	
	rho	0.57	0.55	0.59	0.58	0.69	
	p	0.02	0.02	0.01	0.02	0.00	
	NoV GII	MES D1	MES D2	MES D3	MES D4	MES D5	MES D6
		rho					
		p					
DBO D1		DBO D2	DBO D3	DBO D4	DBO D5	DBO D6	
rho		0.83		0.53			
p		0.04		0.05			
DCO D1		DCO D2	DCO D3	DCO D4	DCO D5	DCO D6	
rho							
p							
AdV		MES D1	MES D2	MES D3	MES D4	MES D5	MES D6
		rho					
		p					
	DBO D1	DBO D2	DBO D3	DBO D4	DBO D5	DBO D6	
	rho				0.48		
	p				0.05		
	DCO D1	DCO D2	DCO D3	DCO D4	DCO D5	DCO D6	
	rho						
	p						

### II.2.3. Effets des traitements sur les charges virales

Le contraste entre les virus est beaucoup moins marqué en termes d'abattement des concentrations, de part et d'autre des deux types de traitements, qu'il ne l'est en termes de concentration (Tableau II-11).

Les valeurs les plus grandes sont associées au traitement primaire, physico-chimique, en particulier pour le NoV GII. Le traitement secondaire, biologique, semble ne pas avoir d'effet sur ce virus alors qu'il apporte un complément de l'ordre de 30 % à l'élimination des deux autres virus. Les effets de l'ensemble des traitements (différences entrée-sortie) mènent à des valeurs très proches les unes des autres, de l'ordre de 58 % pour les norovirus et de 52 % pour les adénovirus, soit une réduction de 0.4 et 0.3  $\log_{10}$  respectivement. Ces valeurs rejoignent celles de quelques auteurs (*Victoria et al. 2010*, *Schmitz et al. 2016*, *Tandukar et al. 2021*), mais restent relativement faibles par rapport à celles retrouvées dans une majorité d'études, évaluant la réduction globale à environ 2  $\log_{10}$  (*Hata et al. 2013*, *Kitajima et al. 2014*, *Lizasoain et al. 2018*, *Prado et al. 2019*). Les causes de cette faible rétention par l'UDEP sont très certainement multifactorielles (type de réseaux collecteurs et caractéristiques des eaux usées, traitements mis en place dans la station, avec absence de traitement tertiaire de désinfection notamment), comme énoncé en début de chapitre.

Pour rappel, les pourcentages correspondant pour les charges abiotiques et pour la même période d'observation, étaient de l'ordre de 93 %, 88 % et 94 %, respectivement, pour les MES, la DCO et la DBO. Les virus ne semblent donc pas être pris en charge par les traitements dans une mesure équivalente à celle des autres formes de matière organique, tout au moins à travers les représentations qu'en donnent les analyses qui en ont été faites (DCO, DBO, MES). Il est pourtant probable qu'ils se répartissent entre ces différentes formes, y compris les formes dissoutes qui, dans la pratique, sont celles récupérées dans les filtrats < 0.45  $\mu\text{m}$ . Diverses raisons peuvent être évoquées pour expliquer le fait qu'ils soient moins bien éliminés des eaux usées :

- En échappant pour partie aux activités exo enzymatiques des bactéries, et à celles des phagosomes des protistes ;
- En n'étant pas systématiquement associés aux particules et aux exo polymères des biofilms (adsorption, liaison antigène-anticorps) et donc en restant à l'état de particule libre, en suspension ;
- A l'inverse en étant plus particulièrement associés aux particules en suspension du surnageant des décantations secondaires.

Tableau II-11. Abattements des virus (pourcentage relatif à la valeur amont et  $\log_{10}$  réduction) au niveau de chacune des deux étapes de traitement et entre l'entrée et la sortie de l'UDEP. Les valeurs représentent les moyennes des 17 mesures.

	NoV GI		Nov GII		AdV	
	%	Log <sub>10</sub>	%	Log <sub>10</sub>	%	Log <sub>10</sub>
<b>Traitement primaire</b>	35.8	0.2	59.9	0.4	35.8	0.2
<b>Traitement secondaire</b>	34.7	0.2	-4.6	0.0	24.9	0.1
<b>Traitement total</b>	58.1	0.4	58.1	0.4	51.8	0.3

### II.3. Ordre de grandeur et variabilité des processus d'inhibition de l'analyse PCR

L'analyse des charges virales dans des eaux usées est susceptible d'être affectée par des composés qui interfèrent avec les réactions sur lesquelles sont basées les techniques moléculaires. Le contrôle de l'importance de ces effets, a été réalisé en parallèle de nos analyses des eaux de l'UDEP, par spiking d'une suspension de norovirus murin (suspension dans une solution de NaCl 0.1M), dans l'échantillon analysé (Figure II-26). Le facteur d'inhibition a été calculé selon l'expression suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times (1 - (C_{\text{échantillon}}/C_{\text{référence}}))$$

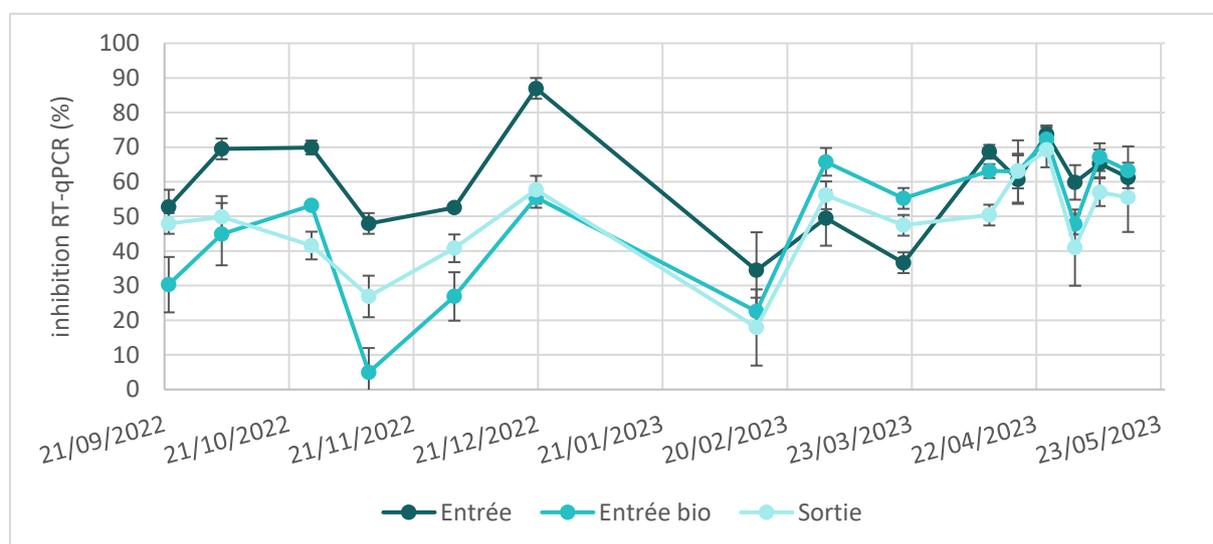


Figure II-26. Taux d'inhibition des analyses RT-qPCR mesurés dans les 3 types d'échantillons (n=15, 3 réplicats par conditions, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Pour chaque échantillon analysé, la différence entre le Cq du contrôle et celui de l'échantillon spiké était inférieure à 2, valeur à partir de laquelle on considère l'échantillon comme présentant des inhibiteurs de qPCR (Staley *et al.* 2012, Ahmed *et al.* 2018).

### II.3.1. Relation avec les précipitations du jour de l'échantillonnage et des jours précédents

Comme indiqué précédemment (II.1.4), en période de pluies, les réseaux partiellement séparatifs de collecte des eaux usées, sont susceptibles de recevoir des eaux de ruissellement chargées de composés inhibiteurs de PCR (acides humiques, métaux lourds) qui viennent s'ajouter à ceux que peut déjà contenir les eaux usées proprement dites (Choe *et al.* 2002, Klimaszuk *et al.* 2015).

C'est donc avec les précipitations du jour de l'analyse et en amont, avec leurs moyennes sur un nombre de jour croissant, que des corrélations ont été cherchées. Les résultats des calculs n'apportent pas la démonstration d'un effet manifeste de ces apports sur les taux d'inhibitions (Tableau II-12) malgré le fait que deux des coefficients (associés aux précipitations du jour d'analyse et à la moyenne calculée sur les 5 jours précédents) soient significatifs. La Figure II-27 montre, en effet, que les valeurs les plus grandes de l'inhibition ne sont pas systématiquement associées à celles des précipitations.

Tableau II-12. Corrélation (*rho* de Spearman) entre le pourcentage d'inhibition et les précipitations du jour de l'échantillonnage (Rain-1) et les moyennes de celles d'un nombre croissant de jours précédents (Rain-x). Les valeurs d'inhibition correspondent aux analyses de l'eau d'entrée de l'UDEP.

Sample 1	Sample 2	N	Correlation	95% CI for $\rho$	P-Value
Rain -1	Inhib	15	0.657	(0.163, 0.888)	0.008
Rain -2	Inhib	15	0.331	(-0.233, 0.728)	0.228
Rain -3	Inhib	15	0.204	(-0.350, 0.652)	0.467
Rain -4	Inhib	15	0.301	(-0.262, 0.711)	0.276
Rain -5	Inhib	15	0.392	(-0.171, 0.762)	0.149
Rain -6	Inhib	15	0.583	(0.054, 0.856)	0.023

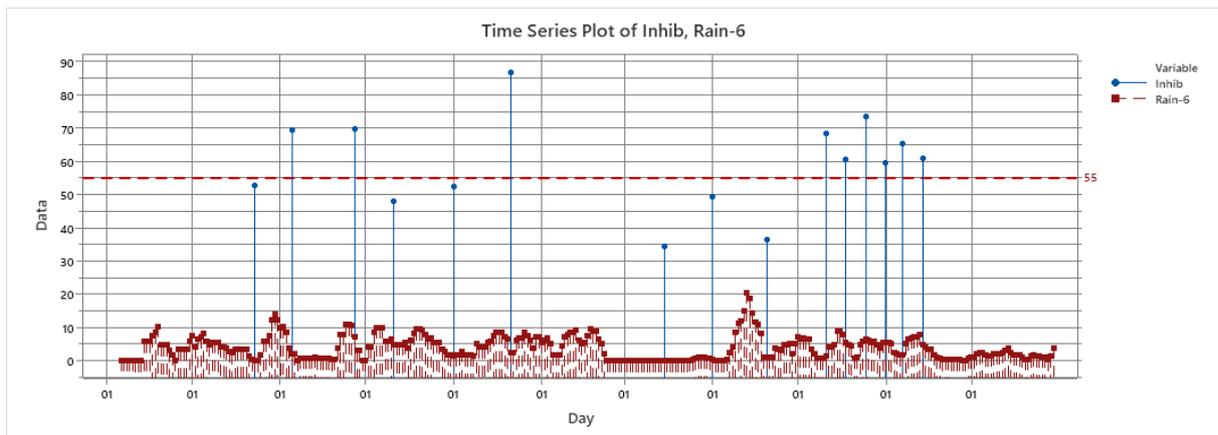


Figure II-27. Evolution du taux d'inhibition de l'analyse PCR en regard de celle des précipitations (moyennes du jour d'analyse et des 5 jours précédents) durant la période d'étude.

### II.3.2. Relations avec les descripteurs abiotiques de l'eau d'entrée de l'UDEP

Les résultats précédents pourraient être expliqués par le fait que les calculs sont basés sur les précipitations en tant que représentations indirectes des apports de lessivage. Leur répétition avec les composantes abiotiques de l'eau (MES, DCO, DBO), n'a cependant pas fait apparaître de corrélation significative, aussi bien avec les valeurs du jour des analyses, qu'avec les moyennes calculées sur les jours précédents.

Nous en déduisons que, pour la période considérée, les apports de composés inhibiteurs de PCR par les eaux de lessivage ont été négligeables par rapport à ceux déjà contenus dans les eaux usées proprement dites.

## II.4. Conclusions du chapitre II

Ce chapitre avait pour objectif de présenter quelques éléments (précipitations, débits, charges des eaux usées) du contexte dans lequel notre étude des mécanismes de l'abattement des charges en VEH a été conduite, à travers leurs variations durant la période d'étude.

Pour rappel, la base de données analysée couvre 11 mois du fonctionnement de l'UDEP, d'août 2022 à juin 2023. Elle a été constituée à partir des analyses réglementaires de la station (334 dates d'analyses des MES, de la DCO, de la DBO et du débit à l'entrée de la station), auxquelles ont été ajoutées des données météorologiques (précipitations, température atmosphérique) et, à 17 reprises, celles de la concentration des eaux usées en VEH (NoV GI, NoV GII et AdV).

Durant cette période, l'efficacité de l'UDEP Grand Chambéry, en termes d'abattelements de charge, a été de l'ordre de 93 % pour la DBO et les MES et de 88 % pour la DCO. L'analyse des données apporte plusieurs indications qui confirment le caractère partiellement séparatif du réseau collecteur des eaux usées de la communauté de communes Grand Chambéry. C'est le cas des grandes fluctuations de la concentration en MES observées durant les épisodes de haut débit.

Les charges additionnelles apportées par les précipitations, semblent cependant n'avoir qu'un effet négligeable sur la composition de la fraction organique des charges transportées. Globalement, le caractère partiellement séparatif du réseau de collecte des eaux usées, se traduirait essentiellement par un effet de dilution. Durant les périodes sans précipitation (et de faible pluviosité), les données font clairement apparaître de tels processus avec la concomitance de l'augmentation de la charge des eaux usées et de la diminution des débits. Le calcul de corrélations entre le débit des eaux à l'entrée de l'établissement et différents niveaux d'intégration des précipitations, montre qu'il est principalement déterminé par les précipitations du jour de la mesure. Il n'en est pas de même avec les descripteurs de la charge de l'eau, pour lesquels les corrélations les plus fortes s'établissent avec la moyenne des hauteurs de pluie des 4 jours précédents pour les MES, des 3 jours précédents, pour la DCO et des 2 jours précédents pour la DBO.

En d'autres termes, le débit est principalement contrôlé par les précipitations du jour, alors que les charges le sont par les moyennes des précipitations des jours précédents. Cette discordance semble être liée au caractère plus ou moins conservatif (/ biodégradable) des descripteurs étudiés. En effet, la relation mécanique entre pluie, débit et concentrations ne s'applique pas aux éléments dont la concentration est susceptible d'être affectée par des mécanismes, tels que la biodégradation ou par des réactions chimiques, au cours du cheminement de l'eau. Ainsi, l'évolution de composés biodégradables durant le transit des eaux usées, ne dépend pas uniquement de processus d'advection et de diffusion.

L'analyse de ces relations entre précipitations et charges des eaux usées n'a pas permis de mettre en évidence le fait qu'une partie d'entre elles ait une origine terrestre. Les données apportent plusieurs indices de l'entrée effective d'eaux de lessivage dans le réseau de collecte des eaux usées mais aucune indication qu'elle aient eu un effet significatif sur la concentration de composés inhibiteurs de PCR.

Concernant les charges virales, un contraste marqué est apparu entre, d'une part, les deux groupes de norovirus (NoV GI et NoV GII) dont les concentrations sont du même ordre de grandeur et peu dispersées et, d'autre part, les adénovirus dont les concentrations sont de l'ordre de 5 fois plus fortes et très dispersées.

Ces charges semblent n'avoir que peu de relations avec les descripteurs abiotiques des eaux usées, un constat qui doit être relativisé par le petit nombre d'observations (17) à partir desquelles notre recherche de corrélation a été faite. En effet, un certain nombre d'études semblent indiquer que les virus attachés à des supports constituent la forme dominante par rapport aux virus libres en suspension ([da Silva et al. 2008](#), [Sima et al. 2011](#), [Chaudhry et al. 2015](#), [Maurya et al. 2020](#), [Yamada et al. 2020](#)), mais c'est aussi un constat qui a parfois été contredit ([Verbyla et al. 2015](#)). Le plus grand nombre de relations significatives est apparu avec le NoV GI, pour lequel le coefficient le plus élevé s'est établi avec les MES. Ce résultat suggère l'existence de relations particulières entre les NoV GI et les particules en suspension, un constat que nous avons été amenés à faire à la suite de plusieurs des résultats d'expériences exposés plus loin dans ce travail.

Le contraste entre les virus est beaucoup moins marqué en termes d'abattelements qu'en termes de concentrations, de part et d'autre des deux types de traitements (primaire et secondaire). Leurs effets cumulés (différences entrée-sortie de la STEP) se traduisent par des valeurs relativement très proches, de l'ordre de 58 % pour les norovirus et de 52 % pour les adénovirus.



# Chapitre III

Incidences des traitements physiques et chimiques sur les charges en virus entériques humains

## Chapitre III – Incidences des traitements physiques et chimiques sur les charges en virus entériques humains

A cette étape des traitements primaires, dans le prolongement des dispositifs de dégrillage, dessablage et déshuilage, les eaux usées reçoivent une dose de coagulants dont les charges positives contribuent à la neutralisation des charges négatives d'une partie des matières en suspension. Ainsi neutralisées les particules ont la possibilité de s'agglomérer pour former des micro-agrégats. Les eaux reçoivent également un flocculant qui induit le regroupement de ces particules en floccs dont la sédimentation est facilitée par la structure particulière d'un bassin de décantation lamellaire. Les solides sédimentés ou « boues primaires » sont collectés au fond du bassin et envoyés vers des dispositifs où ils sont concentrés et en partie déshydratés avant d'être éliminés par calcination dans les fours des ordures ménagères. Les coagulants et flocculants utilisés à l'UDEP Grand Chambéry, sont pour une part des polyacrylamides fournis par SNF (Andrézieux Bouthéon), une entreprise de chimie spécialisée dans la production de ces polymères hydrosolubles. Le chlorure ferrique est également utilisé en tant que coagulant.

Le sujet de l'évolution des charges virales en VEH à cette étape des traitements pouvait être abordé sous de nombreux aspects. Nous l'avons traité à travers les questions suivantes :

- avec quelle efficacité les polymères participent-ils à la rétention des charges virales (en termes de concentration et de diversité)
- quels sont les effets des polymères sur les virus autochtones par comparaison aux virus ajoutés (virus spikés probablement restés à l'état libre, non encore fixés sur des supports).
- quelles sont les variations des charges virales résiduelles dans le surnageant de décantation selon le flocculant utilisé. En d'autres termes : importance et diversité des charges virales transmises par les traitements primaires vers le traitement secondaire (réacteur biologique).
- quels sont les effets des polymères sur la "viabilité" (infectiosité) des virus (expériences de spiking avec des modèles de substitution des norovirus, ici des bactériophages dont la culture est maîtrisée,)

Les essais ont porté sur les produits effectivement utilisés à l'UDEP, mais aussi, dans le cadre d'une collaboration avec SNF, sur plusieurs autres types de polymères qu'ils nous ont fournis. Le jar-tester qu'ils avaient mis à notre disposition n'était pas conçu pour l'analyse de floccs aussi fragiles et d'aussi faible densité que ceux obtenus dans nos conditions expérimentales. En conséquence, nous avons conçu et fait réaliser de nouvelles enceintes à fond pyramidal ouvert pour la récolte des boues (Figure III-1). Un dispositif permettant de mesurer en continu la

clarification de l'échantillon au cours du traitement a également été développé (mesure d'atténuation d'un signal lumineux au passage de l'échantillon).



Figure III-1. Version modifiée du Jar-tester (gauche) et dispositif de suivi de la turbidimétrie (droite)

### III.1. Choix des polymères

Deux coagulants, le FL4440 (base polyDADMAC) et le FL2949 (base polyamine), ainsi que quatre floculants, l'AN934 VHM (polyacrylamide anionique), et les FO4490 VHM, FO4190 VHM, et PSD640 TBD (polyacrylamides cationiques) ont été proposés par SNF pour ces essais, en lien avec leur diversité (structure, charge). Le chlorure ferrique  $\text{FeCl}_3$ , a également été inclus dans la liste des coagulants testés. Leurs formules respectives sont représentées dans la Figure III-2. Le Tableau III-1 présente les combinaisons de polymères testées, sur la base de leurs caractéristiques physiques et chimiques.

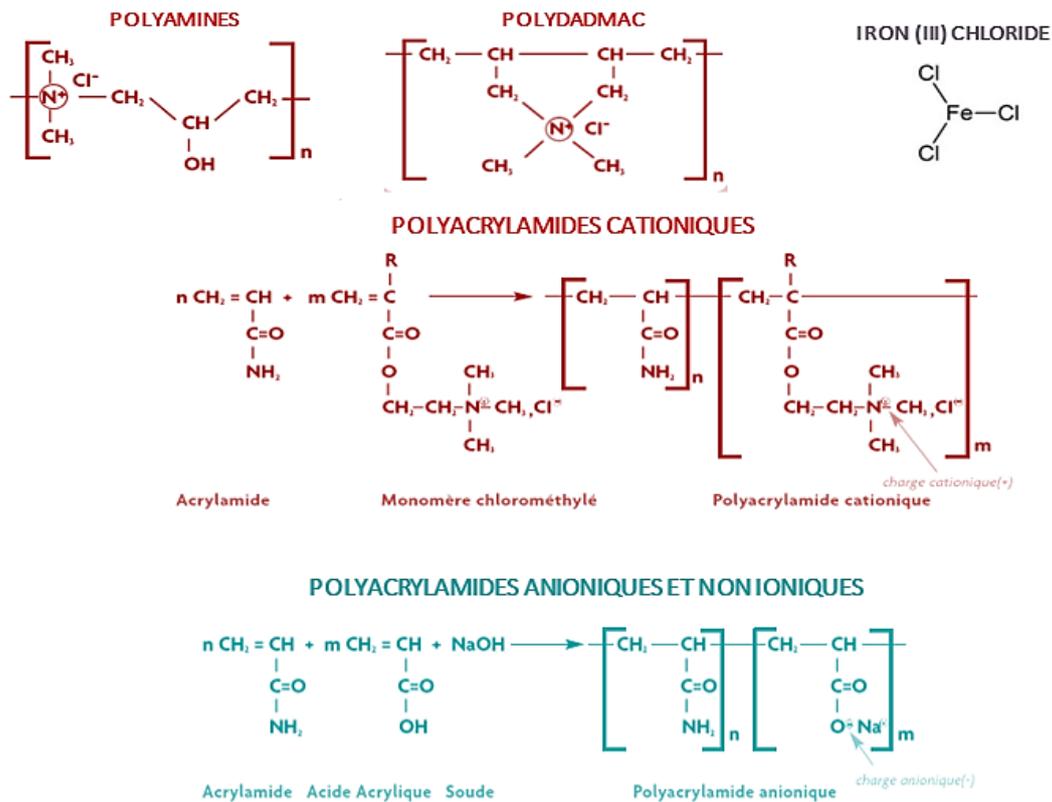


Figure III-2. Formules des polymères utilisés dans les essais

Tableau III-1. Caractéristiques et combinaisons des polymères utilisés dans cette étude. Les combinaisons testées sont indiquées par le sigle «✓». Les polymères anioniques sont surlignés en bleu, les cationiques en rouge.

		Coagulant			
		FL2949 (cationique 100% - ramifié)	FL4440 (cationique 100% - linéaire)	FeCl <sub>3</sub>	Aucun
<b>Floculant</b>	PSD640 (cationique 60% - hautement ramifié)	Combinaisons n'entraînant pas de floculation			✓
	FO4490 (cationique 40% - linéaire)				✓
	FO4190 (cationique 10% - linéaire)				✓
	AN934 (anionique 30% - linéaire)	✓	✓	✓	N'entraîne pas de floculation

## III.2. Descripteurs étudiés

Les mesures de concentration, de diversité et de viabilité des virus, autochtones ou spikés, ont été faites simultanément sur les floccs et l'eau surnageante.

Afin de faciliter la lisibilité des résultats et leur comparaison, les quantités de virus mesurées dans chacune des fractions étudiées sont exprimées en pourcentages, 100 % représentant la totalité des virus présents dans l'échantillon de départ (eau usée spikée ou suspension virale). Dans la plupart des essais, cependant, la somme des virus mesurés dans les fractions analysées s'est révélée être inférieure à la quantité de virus présents dans l'échantillon initial, non traité par les polymères. Cette fraction de virus "disparus" a été calculée par soustraction des quantités retrouvées dans les surnageants et les floccs, à celles de l'échantillon initial.

A titre informatif, les concentrations effectives de VEH, ainsi que des principaux descripteurs des eaux usées utilisées durant la période d'étude sur l'effet des polymères (demande chimique en oxygène (DCO), demande biologique en oxygène (DBO), turbidité, matières en suspension (MES) et pH) sont présentés dans le Tableau III-2.

Tableau III-2. Médianes des valeurs des principaux descripteurs analysés dans les eaux usées.

Descripteur	Eau usée brute (eau usée brute spikée)
<b>MNV (copies génome/L)</b>	0 ( $1.7 \pm 1.4^{E07}$ )
<b>MS2 (copies génome /L)</b>	$3.7 \pm 1.7^{E03}$ ( $6.4 \pm 5.2^{E09}$ )
<b>NoV GI (copies génome /L)</b>	$1.8 \pm 0.9^{E05}$
<b>AdV (copies génome /L)</b>	$2.5 \pm 1.5^{E07}$
<b>DBO-5 (mg/L)</b>	$180 \pm 99$
<b>DCO-ST (mg/L)</b>	$531 \pm 193$
<b>MES (mg/L)</b>	$210 \pm 100$
<b>pH</b>	$7.6 \pm 0.8$
<b>Turbidité avant traitement aux polymères</b>	$606 \pm 81$
<b>Turbidité après traitement aux polymères</b>	$816 \pm 38$

### III.3. Mise en place du protocole expérimental

Un résumé du protocole analytique "standard", décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes », est présenté dans la Figure III-3.

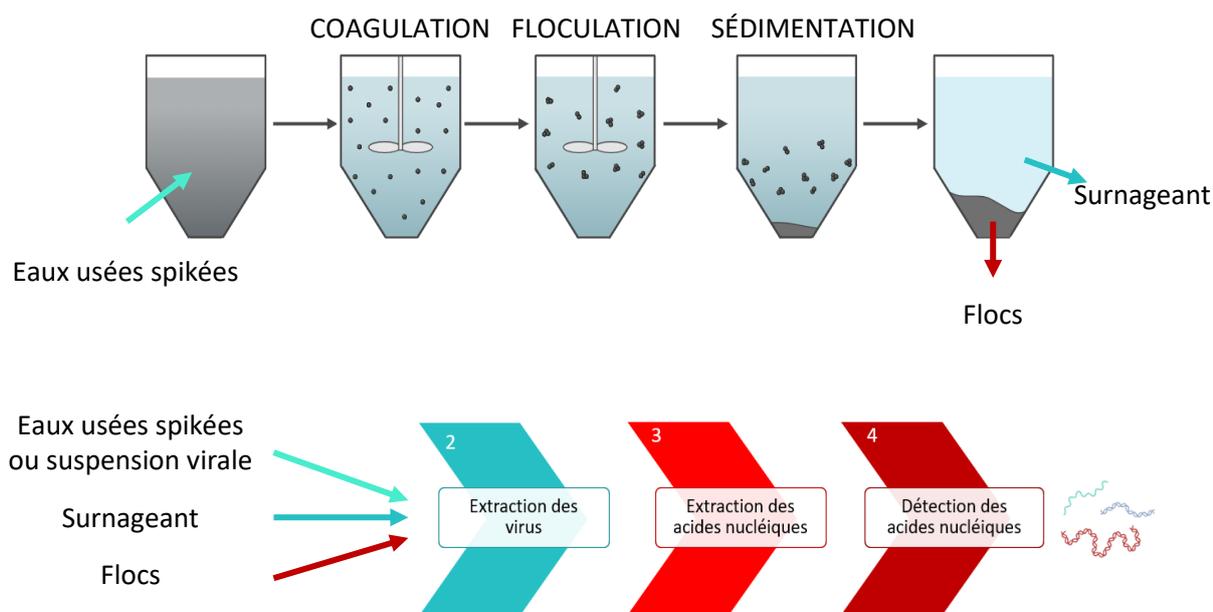


Figure III-3. Protocole analytique des expériences sur l'effet des polymères sur la rétention des virus

En amont de cette étude, il a fallu déterminer, pour chaque polymère, les concentrations "opérationnelles" adaptées aux eaux usées utilisées, c'est-à-dire celles pour lesquelles la formation et la décantation des floccs étaient optimales. De ces essais préliminaires, il ressort que :

- Les flocculants cationiques devaient être utilisés seuls, à une concentration de 0.4 mg/L pour les polymères linéaires et 4 mg/L pour les polymères ramifiés. Comme attendu, leur combinaison avec des coagulants cationiques n'entraînait pas de floculation.
- Les concentrations optimales s'établissaient à 30mg/L pour les coagulants cationiques et à 0.8 mg/L pour le flocculant anionique. Une étude de la concentration optimale de  $FeCl_3$  est présentée plus loin dans ce chapitre (§ III.4.2 et III.6.1). L'utilisation de flocculant anionique devait obligatoirement être précédée d'un ajout de coagulant (cationique ou minéral) pour qu'une floculation se produise.

La standardisation du protocole d'essai nécessitait également que soit fixé le temps au bout duquel la sédimentation devait être considérée comme terminée. Les essais réalisés dans ce but, ont mis en œuvre le dispositif de suivi (au pas de temps de la seconde) de la turbidité. Ils ont porté sur plusieurs échantillons d'eau et différentes combinaisons de polymères.

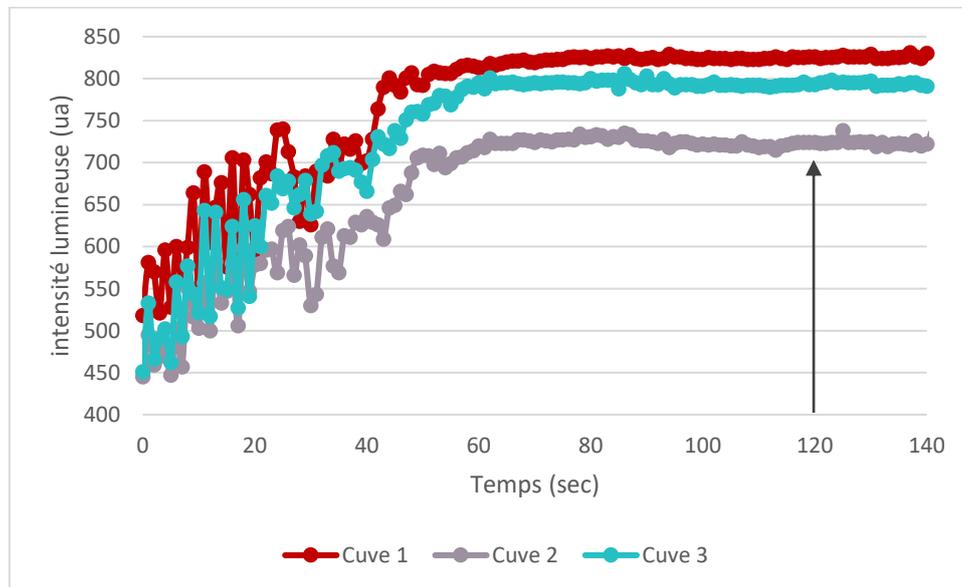


Figure III-4. Estimation d'une durée standard de décantation par mesure de la turbidité de l'eau à mi-hauteur des jar testers. Ici après floculation au FO4490. L'intensité lumineuse est exprimée en unité arbitraire (ua). La flèche marque la durée de décantation choisie pour toutes les expériences présentées dans ce chapitre.

Un exemple du suivi de la turbidité après traitement d'une eau usée par un polymère (FO4490) est présenté en Figure III-4. Pour les 3 cuves du jar tester, la phase de plateau était atteinte après 60 secondes. Les essais impliquant d'autres (combinaisons de) polymères ayant donné des résultats similaires, l'étape de sédimentation a prudemment été fixée à 2 minutes pour toutes les expérimentations.

### III.4. Effet des polymères sur des suspensions virales

Avant d'aborder l'incidence des polymères sur les charges virales des eaux usées, une évaluation de l'efficacité de nos techniques d'extraction et d'analyse des virus en présence de ces polymères a été réalisée. Une première série d'expériences a été faite dans ce sens sur des MNV mis en suspension dans des solutions de NaCl 0.1M.

### III.4.1. Effet des polymères sur une suspension virale de MNV

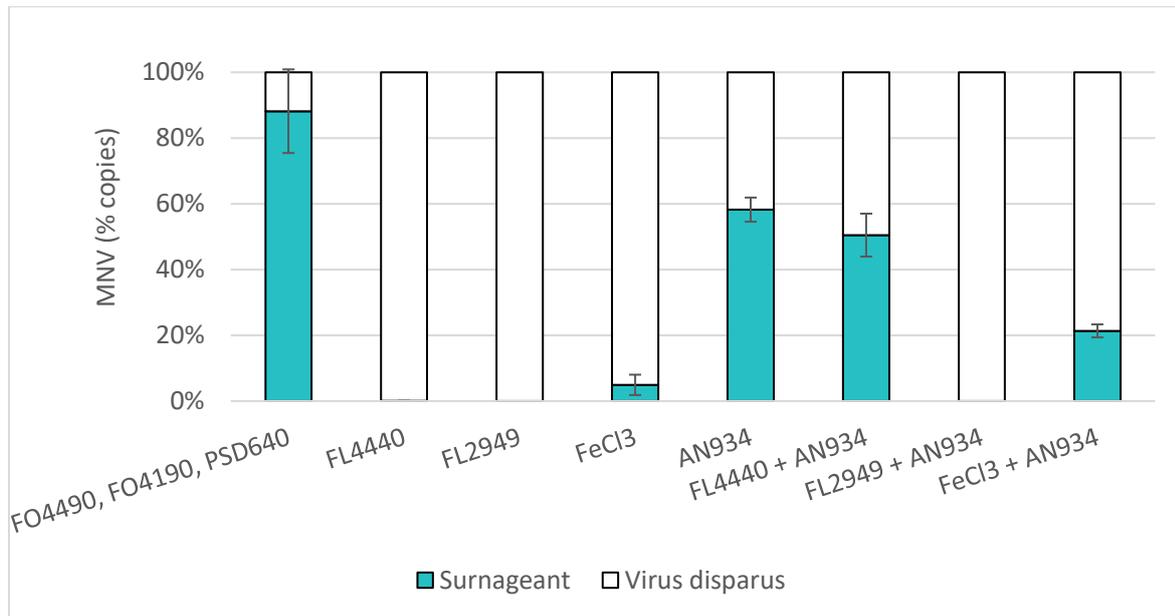


Figure III-5. Effet des polymères sur l'analyse par RT-qPCR de MNV en suspension dans NaCl 0.1M. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Il n'a pas été étonnant de ne voir aucun culot de sédimentation apparaître dans ces essais, compte tenu de la masse que pouvaient représenter les virus. Cela n'exclut pas la possibilité qu'il s'en soit formé un, mais sans qu'il soit possible d'en faire l'analyse à la recherche de virus.

De façon générale, les flocculants cationiques semblent n'avoir eu que peu d'interférence sur l'analyse moléculaire, avec  $88 \pm 13$  % des virus retrouvés dans le surnageant après ajout du polymère.

En revanche, l'addition de flocculant anionique AN934 a eu un effet non négligeable sur la quantification de MNV, avec seulement  $58 \pm 4$ % de virus spikés retrouvés après traitement. Cette perte était d'autant plus marquée lorsque le flocculant était en combinaison avec les coagulants FL4440 ou FeCl<sub>3</sub>, abaissant le taux de récupération des MNV à  $50 \pm 7$  % et  $21 \pm 2$  % respectivement.

La présence des coagulants seuls a été associée aux plus faibles taux de récupération, avec seulement  $0.04\% \pm 0\%$  de virus retrouvés dans le surnageant pour le FL4440 et  $5 \pm 3\%$  pour le FeCl<sub>3</sub>. Plus étonnant encore, la présence du coagulant FL2949 s'est traduite par une absence totale de détection des MNV par RT-qPCR, que ce soit seul ou en combinaison avec le flocculant anionique AN934. Cela a également été confirmé avec des échantillons d'eau usée. Les propriétés chimiques du polymère sont très certainement en cause mais à ce jour, nous n'avons pas trouvé d'explication à cette inhibition. Ce coagulant a donc été éliminé des

expérimentations impliquant une analyse moléculaire, mais a été conservé dans le chapitre III.7 au sujet de son effet sur l'infectivité virale.

Comme l'indique la Figure III-5, une partie des virus n'a plus été détectée par les analyses, en particulier lors de l'ajout de coagulant (organique ou minéral) et/ou de floculant anionique. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- Interaction des polymères avec les particules virales libres, en les englobant dans une « coque » polymérique qui les rend inaccessibles au tampon de lyse ;
- Altération des composants du tampon de lyse eux-mêmes ;
- Piégeage des acides nucléiques, qui ont été libérés par le tampon de lyse dans des « filets » polymériques ;
- Modification de la géométrie et de la structure des chaînes nucléotidiques
- Altération des billes de silice (billes grâce auxquelles se fait la récupération des acides nucléiques dans l'échantillon lysé) limitant leur efficacité de récupération des acides nucléiques ;
- Piégeage partiel ou total des billes dans des « filets » polymériques ;
- Altération directe des réactions de PCR, dans le cas où une partie des polymères a pu être transportée, via les billes de silice, vers les tubes où se font les amplifications.

Des essais de modification du protocole expérimental, incluant notamment une étape de filtration à 0.22 µm, dans le but de concentrer les virus et ainsi optimiser les ratios des volumes échantillon/tampon de lyse, ont par ailleurs été conduits, sans que cela ne permette de retrouver les quantités initialement spikées après traitement.

#### III.4.2. Effet du FeCl<sub>3</sub> sur l'analyse des MNV par RT-qPCR

Le sulfate d'aluminium, le sulfate ferrique, le polychlorure d'aluminium et le chlorure ferrique sont parmi les coagulants les plus utilisés dans le traitement des eaux usées. Le chlorure ferrique étant utilisé dans à l'UDEP Grand Chambéry, nous avons choisi de l'inclure aux essais, au même titre que les polymères fournis par SNF.

Afin d'évaluer son impact sur l'analyse moléculaire des virus, des concentrations, allant de 12.5 mg/L à 200 mg/L ont été introduites dans des suspensions calibrées de MNV. Les proportions de virus retrouvées dans les surnageants sont présentées dans la Figure III-6, ainsi que les mesures de pH qui ont été effectuées en parallèle.

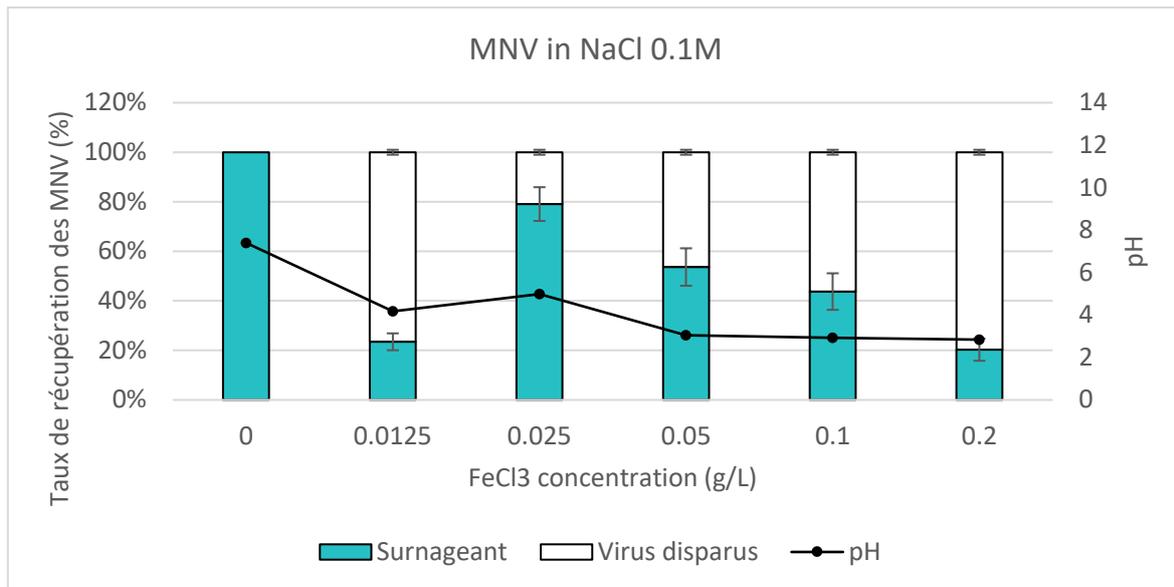


Figure III-6. Comparaison de différentes concentrations en  $FeCl_3$  pour leurs effets sur l'analyse virale par RT-qPCR. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Le taux de récupération atteint près de 79 % à 0.025 g/L, avant de diminuer graduellement pour les trois concentrations suivantes de  $FeCl_3$ . Ainsi, près de 80 % des virus n'apparaissent plus dans l'analyse en présence de 0.2 g/L de  $FeCl_3$ . La récupération des virus par RT-qPCR est également fortement impactée à 0.0125 g/L de  $FeCl_3$ , avec seulement 23 % de virus retrouvés. La proportion de virus "disparus" semble être corrélée pour partie, à une diminution du pH, dans le cas d'une suspension virale. Il semblerait donc que la concentration en  $FeCl_3$  la plus adaptée pour la quantification des MNV par RT-qPCR se situe aux alentours de 0.025 g/L, pour laquelle la récupération est de  $79 \pm 7\%$ . Cependant, une étude complémentaire devrait être réalisée afin de valider l'efficacité de cette concentration sur la récupération des virus autochtones dans les eaux usées (§ III.6.1). Si le pH est le principal facteur explicatif de cette diminution, l'augmentation de concentration du  $FeCl_3$  devrait avoir moins d'impact dans le cas des eaux usées par le fait ces eaux sont plus tamponnées qu'une simple solution de NaCl 0.1M.

### III.5. Essais d'optimisation du protocole expérimental

#### III.5.1. Essai d'optimisation de la quantification des VEH par cumul des floccs (boues) obtenus après floculation d'une eau usée

Les valeurs obtenues à la suite des 1ères analyses de VEH dans les boues issues de la floculation d'une eau usée ont été particulièrement faibles, voire nulles. Nous avons alors fait

l'hypothèse que le cumul des boues de plusieurs floculations successives d'échantillons de la même eau usée (la capacité de chacun des compartiments du jar tester était de 500 mL), rendrait plus accessible à l'analyse la quantité de virus ainsi augmentée. Le protocole d'extraction a donc été adapté au traitement d'un plus grand volume de floccs, malgré les inconvénients conséquents, de l'augmentation du volume de tampon de lyse, et de celui des billes de silice (pour la récupération des acides nucléiques).

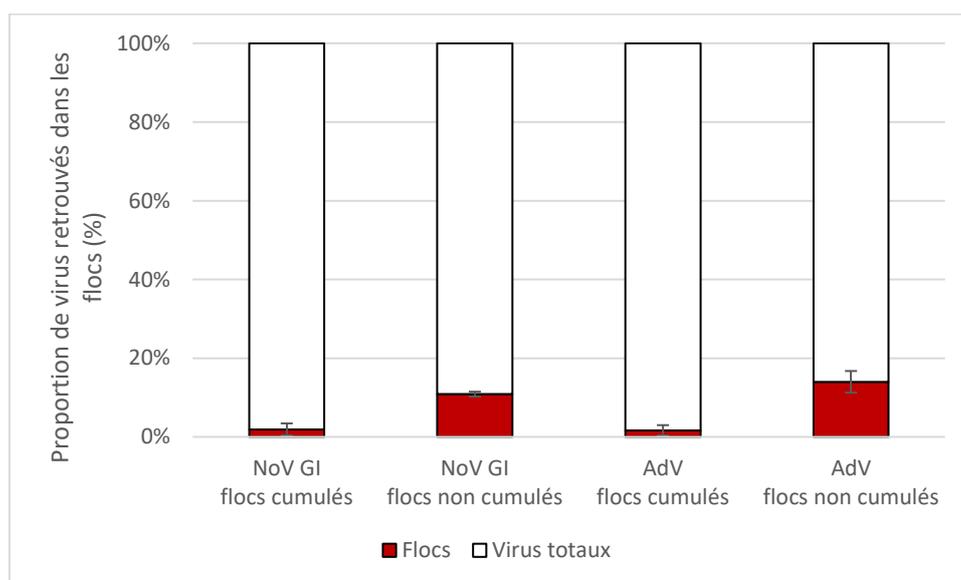


Figure III-7. Comparaison des proportions des virus retrouvés dans les floccs après traitement de l'eau usées au flocculant FO4490. Les floccs cumulés sont obtenus à partir de 2L d'eaux usées. Les floccs non cumulés sont obtenus à partir de 500 mL. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 répliquats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Les floccs de plusieurs échantillons de boues, correspondant à 2L d'eaux usées traités avec le flocculant FO4490, ont ainsi été réunis pour en extraire les VEH (NoV GI et AdV) et les acides nucléiques correspondants. Le résultat de l'analyse par RT-qPCR de ces extraits, rapporté à la quantité de virus initialement présents dans l'eau usée non traitée, a donné une valeur inférieure à 2%, plus petite que la valeur obtenue avec un seul échantillon de floccs (12 et 16% pour les NoV GI et les AdV respectivement) pour 0.5L d'eaux usées traitées (Figure III-7). L'une des principales raisons de l'obtention de valeurs inférieures à celles attendues, dans le domaine des analyses qPCR, est l'intervention de mécanismes inhibiteurs dont peuvent être responsables un grand nombre de composés de différente nature, organique et minérale. L'hypothèse la plus probable concernant ce résultat est qu'à l'augmentation de la quantité de boues, et par conséquent de tous leurs constituants, correspond aussi celle d'inhibiteurs de RT-qPCR. Cet essai a donc plutôt fait la démonstration de l'effet négatif que peuvent avoir ces composés dans l'évaluation des charges virales des eaux usées. Le résultat laisse supposer, par ailleurs, que ces composés atteignent les réactions d'amplification après avoir été extraits des

boues et concentrés, comme les acides nucléiques, par le procédé d'extraction basé sur les billes de silice. Nous avons testé deux des techniques préconisées pour réduire l'impact de ces inhibiteurs :

- La première reposant sur l'utilisation de colonnes « supprimeurs d'inhibiteurs de PCR » (Zymo research). Les résultats (non présentés) n'ont pas été concluants, les quantités de virus retrouvées après passage sur ces colonnes ayant été inférieures à celles obtenues sans traitement préalable des extraits d'acides nucléiques
- La deuxième méthode consiste à diluer l'extrait d'acide nucléique avant quantification, afin de passer sous le seuil critique de charges en inhibiteurs. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le paragraphe qui suit.

### III.5.2. Essai d'optimisation de la quantification des VEH par dilution des extraits de floccs (boues)

De nombreux auteurs ont fait la démonstration de l'intérêt d'une dilution de l'échantillon, voire de l'extrait d'acide nucléique pour réduire l'effet des inhibiteurs de PCR (da Silva *et al.* 2008, Gibson *et al.* 2012). D'autres auteurs mettent en garde contre le risque de surestimation et de faux négatifs dû à une dilution inadaptée (Wang *et al.* 2017, Bott *et al.* 2023).

Comme dans les essais de cumul des floccs, les boues obtenues après flocculation au FO4490 d'une eau usée ont été analysées pour évaluer par RT-qPCR les charges de trois virus, (NoV GI, AdV et MNV). Ici, par contre, trois types d'extraits d'acides nucléiques ont été analysés : non dilués, dilués au 1/2 et dilués au 1/10. Les résultats donnés dans la Figure III-8 sont exprimés en pourcentages relativement à la quantité de virus analysée dans les extraits de floccs non dilués.

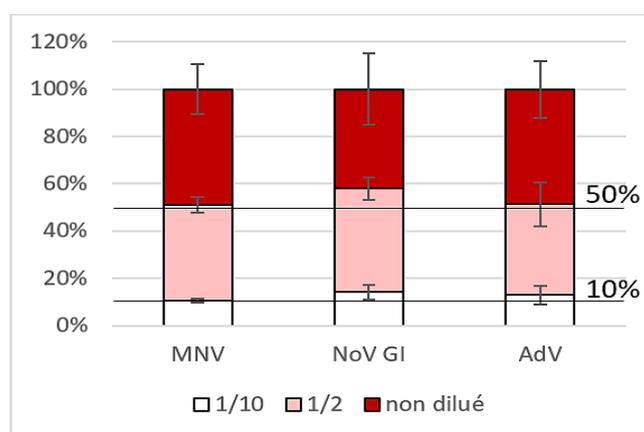


Figure III-8. Effet de la dilution au 1/2 et 1/10 des extraits d'acides nucléiques de floccs sur la quantification des MNV, NoV GI et AdV par RT-qPCR. Valeur de référence (100%) = extrait non dilué. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicat par conditions, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Les pourcentages de virus mesurés dans les extraits de floccs, dilués au demi et au dixième, restent dans les valeurs attendues quel que soit le virus étudié (Figure III-8, Tableau III-3). Si une inhibition est présente dans l'échantillon, celle-ci n'est pas révélée par la technique de dilution mise en place.

Tableau III-3. Pourcentages de virus mesurés dans les échantillons dilués de boues, exprimés par référence aux quantités de virus dans l'extrait non dilué.

Dilutions	NoV GI	AdV	MNV
<b>1/2</b>	58 ± 5%	52 ± 9%	51 ± 3%
<b>1/10</b>	14 ± 3%	12 ± 4%	11 ± 1%

Par ailleurs, des essais non présentés ici, effectués sur des échantillons d'eau usée espacés dans le temps, nous ont apporté la confirmation de l'irrégularité du bénéfice de ces dilutions dans la correction des effets des composés inhibiteurs de qPCR. En conséquence, cette étape du protocole opératoire n'a pas été retenue pour la suite du travail.

### III.5.3. Influence de l'âge de la solution de flocculant (FO4490) sur la rétention des VEH

Ce point devait être abordé en raison, du caractère contradictoire des informations que nous avons collectées à ce sujet :

- 1) Celle du fabricant (SNF), qui recommande la préparation extemporanée des solutions de polymère, en particulier dans le cas des flocculants cationiques. Ils considèrent en effet qu'ils subissent une hydrolyse rapide 24h après qu'ils aient été mis en solution. Le délai est estimé à 36h pour les flocculants anioniques.
- 2) Celle d'Owen *et al.* (2002), qui font la démonstration d'une meilleure efficacité de la floculation avec une solution préparée 72h avant l'expérience (en utilisant un flocculant non ionique, cependant).

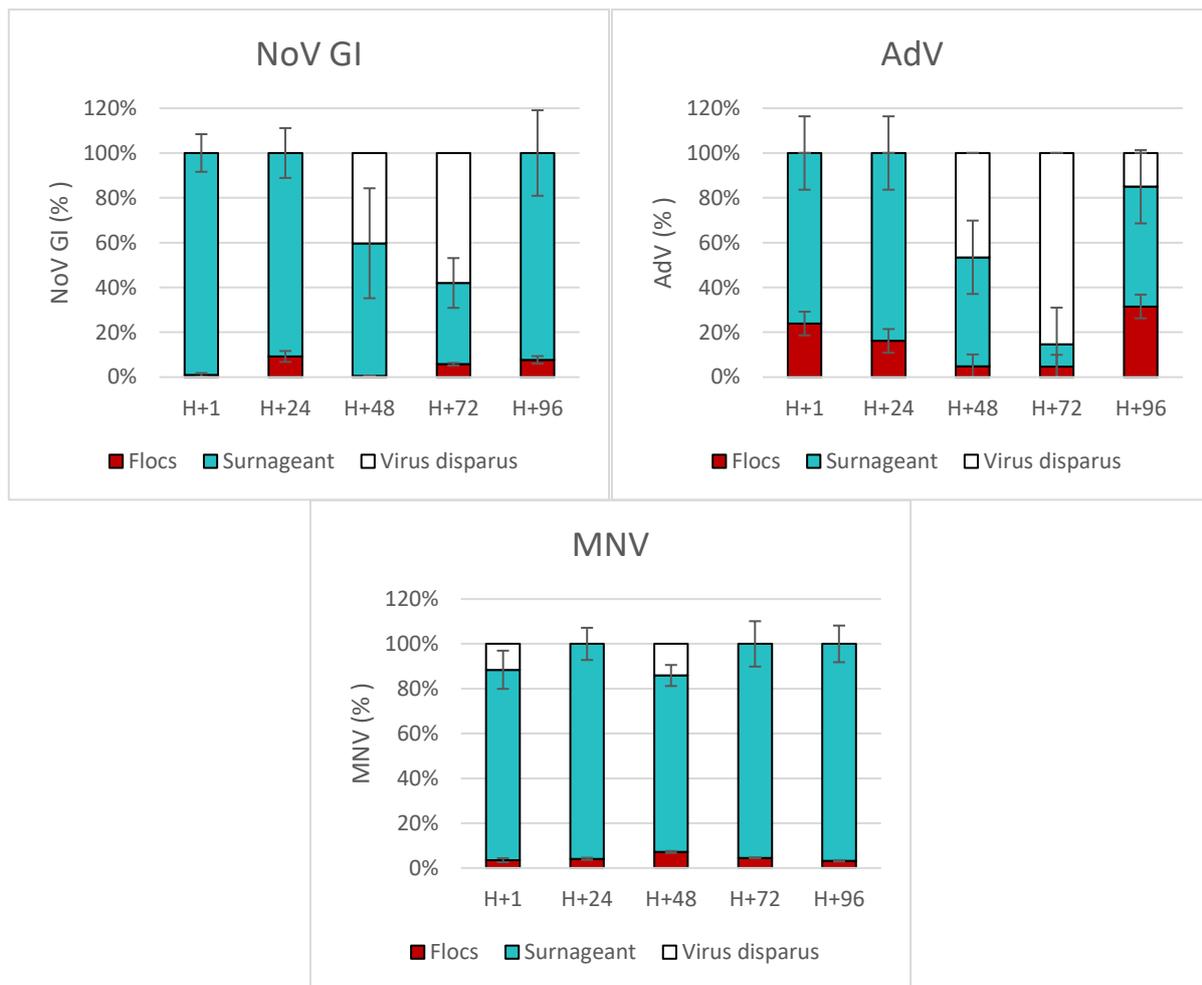


Figure III-9. Influence de l'âge de la solution de polymère sur la floculation des virus en eaux usées. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

En raison d'un accès limité au laboratoire au 3<sup>ème</sup> jour de l'expérience, une partie de l'analyse des échantillons « H+72 » n'a pas pu être effectuée le jour même. Le choix a été fait de suspendre le protocole après l'étape de lyse, les échantillons étant alors conservés à 4°C pendant 16h, avant la reprise de l'analyse. Selon les indications du fabricant des réactifs utilisés pour l'extraction, les échantillons peuvent être conservés dans ce tampon de lyse jusqu'à 24h à 4°C, sans que cela n'ait d'incidence, en aval, sur l'analyse moléculaire.

Si cela semble avoir été le cas pour les MNV, cette interruption dans le déroulement du protocole semble en revanche avoir eu un impact significatif sur l'analyse des virus autochtones (NoV GI ou AdV), avec respectivement 60 et 85% de virus "disparus" pour ces échantillon H+72.

Une autre interprétation pourrait être de considérer que l'augmentation de l'âge de la solution de polymère a bien influencé négativement la récupération et la quantification des

virus autochtones à partir de H+48. La réduction des pourcentages de virus "disparus" à 0 et 18% dans les échantillons H+96h, semble exclure cette hypothèse.

Il est également possible qu'une partie des NoV GI et AdV, aient été plus fragilisés que les MNV fraîchement spikés, par leur séjour dans ces eaux, microbiologiquement très actives.

Concernant les floccs, les proportions ont atteint des valeurs plus grandes avec les AdV ( $16 \pm 11\%$ ) qu'avec les Norovirus ( $5 \pm 4\%$  pour les NoV GI et  $4 \pm 1\%$  pour les MNV). Ce résultat a pu être lié à la différence de taille entre les AdV (environ 80 nm) et les NoV (environ 30 nm), à la nature des particules auxquels ils étaient attachés, si tant est qu'elles étaient différentes, ou encore, à la différence entre leurs points isoélectriques vis-à-vis des phénomènes d'adsorption (4.5 pour les AdV, 5.9 pour les NoV GI).

Quel que soit l'âge de la solution de polymère, la part de virus retrouvés dans le surnageant ( $94 \pm 2\%$ ) a été bien supérieure dans le cas des MNV que dans celui des NoV GI et des AdV ( $47 \pm 5\%$  et  $48 \pm 28\%$  respectivement). Cela pourrait s'expliquer par le caractère de particules « libres » des MNV, qui, du fait de leur introduction récente dans le milieu, contrairement aux virus autochtones, ont pu être moins susceptibles d'être accrochés aux autres particules des eaux usées. La majorité des MNV auraient ainsi pu échapper à la floculation et rester dans le surnageant. Ce constat soulève une nouvelle question, qui est celle de l'importance de l'âge du spiking des MNV dans l'échantillon à analyser, et de sa pertinence en tant que contrôle d'extraction des VEH. Cette question fait l'objet du paragraphe III.5.4.

Pour conclure, aucune amélioration notable de la récupération des virus dans les floccs ou de la quantification des virus dans nos échantillons n'a été mise en évidence en liaison avec l'augmentation de l'âge de la solution de polymère. Les expérimentations ont donc été poursuivies avec des solutions préparées extemporanément, selon les recommandations de SNF.

#### III.5.4. Influence de l'âge du spiking sur l'évaluation de la récupération des virus

Comme vu dans le chapitre précédent, la quasi-totalité des MNV introduits dans l'échantillon en tant que contrôle interne de l'analyse de VEH ont été retrouvés dans le surnageant, ce qui ne semble pas être systématiquement le cas des virus autochtones NoV GI et AdV. L'hypothèse la plus probable serait que les virus spikés n'auraient pas le temps d'interagir avec les particules en suspension dans l'eau, et que leur petite taille leur permet d'échapper au moins en partie à un recrutement par la floculation. La question posée serait donc celle du caractère critique du délai entre le moment auquel les MNV sont ajoutés dans l'échantillon et celui du début des essais dans l'évaluation de la performance du protocole de récupération des virus.

Si l'hypothèse est exacte, l'ajout de MNV dans l'échantillon plusieurs heures, voire plusieurs jours avant l'analyse, permettrait de favoriser l'accrochage des virus spikés aux particules, et de s'approcher au plus près des conditions réelles des VEH dans les eaux usées.

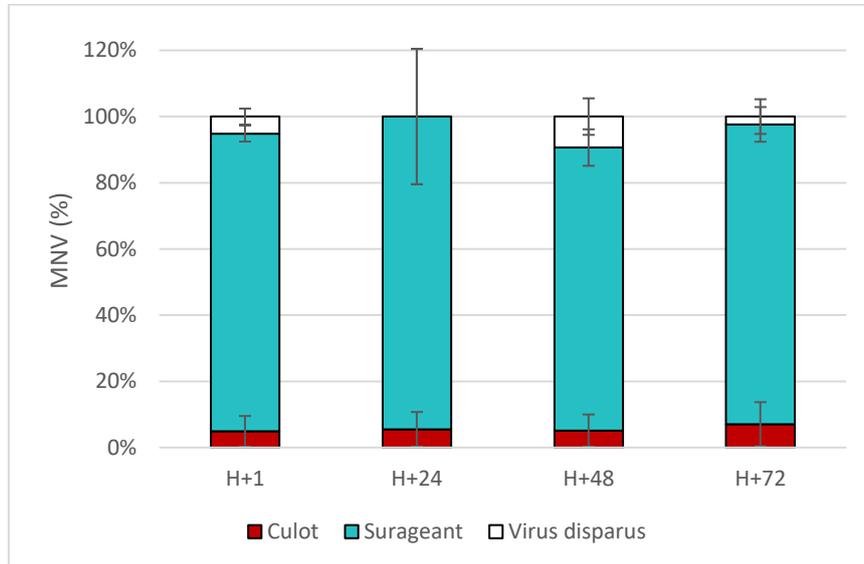


Figure III-10. Influence de l'âge du spiking sur la récupération des MNV dans les différentes fractions. L'eau usée a été spikée avec une suspension calibrée de MNV, entre 1 et 72h avant le début de l'expérience, sous agitation, et stockée à 4°C jusqu'à l'analyse. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Dans cette expérience, les échantillons d'eaux usées ont donc été spikés avec une suspension calibrée de MNV 1h, 24h, 48h ou 72h avant l'ajout de polymère (FO4490), puis stockés à 4°C et à l'obscurité. Les intervalles entre les temps d'incubation choisis devaient être assez grands pour accroître la probabilité de rencontre entre les virus et les autres particules et permettre ainsi aux phénomènes d'accrochage de se produire. Ils devaient également respecter la durée maximale de « stockage » des échantillons avant analyse (4 jours).

La Figure III-10 montre, de façon inattendue, qu'aucun changement des proportions de virus retrouvés dans les flocs ( $5 \pm 5\%$ ) ou le surnageant ( $90 \pm 10\%$ ) ne s'est produite en liaison avec l'ancienneté du spiking. Ces résultats suggèrent deux possibilités :

- le caractère « libre » ou « accroché » des MNV pourrait ne pas avoir d'incidence sur la capacité des polymères à éliminer les virus dans les boues primaires
- les conditions d'incubation n'auraient pas permis aux virus spikés de s'adsorber suffisamment sur les matières en suspension

La deuxième hypothèse semble la plus probable, d'autant plus qu'elle peut être rapprochée du choix des conditions expérimentales. En effet, les dates de spiking choisies ont impliqué

une incubation plus ou moins longue des échantillons à 4°C, afin de limiter leur évolution due aux activités chimiques et microbiologiques. Or, la température est un facteur important dans les phénomènes d'adsorption (Gerba 1984). Une incubation des eaux usées à des températures compatibles avec l'activité des bactéries mésophiles (10 – 45°C) devrait en principe favoriser la vitesse d'intégration des virus spikés aux biofilms et aux particules en suspension (agitation à toutes les échelles), ce qui serait souhaitable pour mimer le comportement des virus autochtones.

Compte tenu des résultats, il a été donc décidé de ne pas ménager de délai particulier entre le moment du spiking et le début des expériences.

### III.6. Effet des polymères sur les charges virales dans les eaux usées

A la suite de la mise au point du protocole d'analyse et des essais préliminaires sur de simples suspensions virales, ce chapitre vient relater ceux dans lesquels des échantillons d'eau usée ont été traités par différents polymères, isolément ou en combinaison, qu'il s'agisse des polymères utilisés en routine à l'UDEP Grand Chambéry ou de ceux, expérimentaux, qui nous avaient été proposés par SNF.

Les essais décrits dans ce chapitre ont évidemment été réalisés à différentes dates. Dans la grande majorité des cas, l'eau usée utilisée a été prélevée le jour même ou au maximum dans les deux jours précédents et dans ce cas, stockée à l'obscurité, à 4°C. Les prélèvements, de l'ordre d'une dizaine de litres, ont tous été effectués en début de matinée (entre 8:30 et 9:00), à l'entrée du décanteur lamellaire (en aval donc, des dispositifs de dégrillage, dessablage et dégraissage) et en amont du point d'injection des polymères.

### III.6.1. Effet de la concentration en $\text{FeCl}_3$ en tant que coagulant combiné au AN934, (floculant) sur la rétention des VEH dans les eaux usées

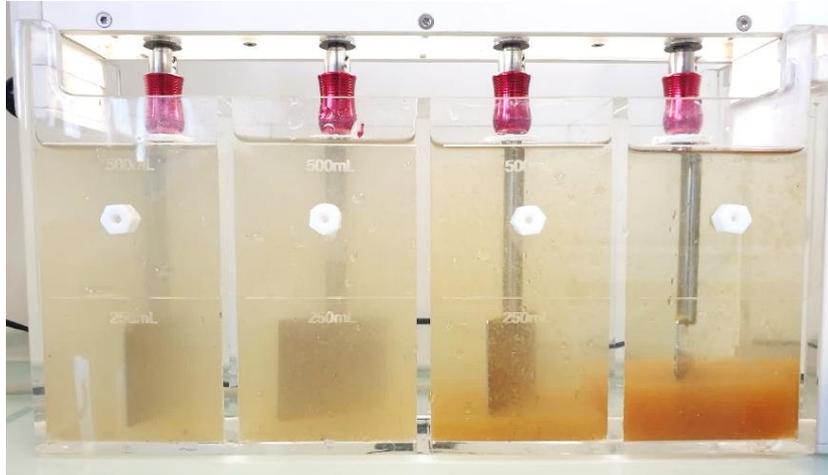


Figure III-11. Eaux usées traitées par différentes concentrations de  $\text{FeCl}_3$  après 2 minutes de sédimentation (de gauche à droite : 0.025 - 0.05 - 0.1 - 0.2 g/L)

Tableau III-4. Variations du pH des suspensions virales (MNV en  $\text{NaCl}$  0.1M) et des eaux usées en fonction de la concentration de  $\text{FeCl}_3$ .

[ $\text{FeCl}_3$ ] (g/L)	pH suspension virale	pH eaux usées
0	7.4	8.1
0.0125	4.2	7.9
0.025	5.0	7.8
0.05	3.0	7.8
0.1	2.9	7.4
0.2	2.8	7.1

Une simple observation visuelle montrait que l'efficacité de la floculation était accrue par l'augmentation de la concentration de  $\text{FeCl}_3$  (Figure III-11), simultanément à une acidification du milieu (Tableau III-4).

Les résultats suivants sont ceux de trois expériences conduites sur 3 échantillons d'eau différents.

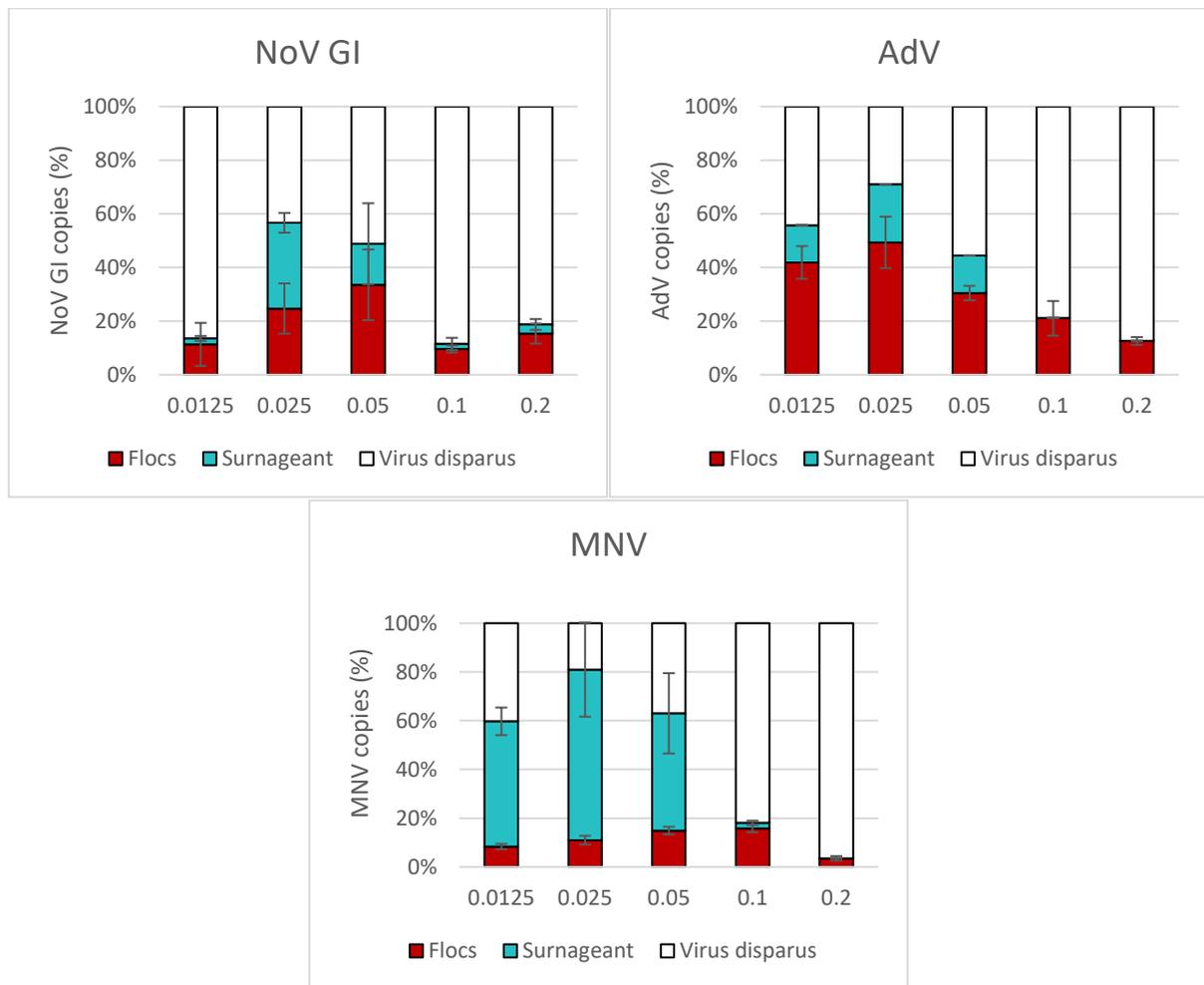


Figure III-12. Incidence de la concentration en  $FeCl_3$  (g/L) sur les charges virales des eaux usées. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Les résultats font apparaître des similitudes ou des différences entre les virus selon le compartiment considéré.

L'évolution des pourcentages de virus récupérés dans les surnageants en fonction de l'augmentation de la concentration en  $FeCl_3$  a été similaire pour tous les virus : elle est marquée par un seuil, situé entre 0.05 et 0.1 g/L, à partir duquel aucun virus n'est plus détecté. Le changement semble s'être effectué au profit du compartiment des virus disparus et non de celui des flocs. Les MNV ont, peut-être, fait exception à ce sujet car ce sont les seuls virus pour lesquels le pourcentage augmente dans les flocs, entre les concentrations de 0.05 et 0.1 g/L. Ces résultats suggèrent une interférence du  $FeCl_3$  sur les processus analytiques de la RT-qPCR.

L'ordre de grandeur des valeurs fait apparaître une différence entre MNV et virus autochtones qui pourrait être imputée au fait que les MNV, ajoutés en début d'expérience, restent pour une grande part, à l'état de particules « libres » alors que les virus autochtones, dans leur majorité, seraient associés aux différentes autres particules en suspension de l'eau usée.

L'évolution des pourcentages de virus récupérés dans les floccs apparaît discriminatrice du groupe NoV GI – MNV vis-à-vis de celui des AdVs pour le seuil de la concentration de  $\text{FeCl}_3$  jusqu'au niveau duquel une augmentation des valeurs est observée : le seuil est plus tardif dans le 1<sup>er</sup> groupe que dans le second. Cet accroissement des valeurs avec la concentration en  $\text{FeCl}_3$  est à rapprocher de l'observation visuelle, faite précédemment, d'une plus grande importance de la floculation. La décroissance des valeurs au-delà des seuils évoqués est probablement liée à l'effet du  $\text{FeCl}_3$  sur les processus analytiques, comme l'ont montré nos essais réalisés sur les suspensions virales de MNV (§ III.4.2).

Les différences observées entre le groupe NoV GI-MNV et celui des AdVs sont probablement liées pour une part, aux tailles respectives de des particules (environ 70 nm de diamètre pour les AdV, contre environ 30 nm de diamètre pour les NoV/MNV), mais aussi à leurs charges de surface ( $pI_{\text{AdV}} = 4.5$  et  $pI_{\text{NoV}} = 5.9$ ).

### III.6.2. Effet des polymères organiques sur la rétention des VEH dans les eaux usées

Les essais décrits dans ce chapitre avaient pour objectif d'évaluer les effets de l'ajout, dans des eaux usées, de polymères floculants de différents types, anioniques et cationiques, utilisés seuls ou en combinaison avec un coagulant sur les charges de trois virus.

Les résultats ont été analysés pour leur intérêt vis-à-vis de l'élimination des virus des eaux usées, et/ou de l'altération de leur infectiosité, ou encore de la possibilité d'une spécificité de cette élimination touchant un type particulier de virus

L'analyse des effets spécifiques des caractéristiques chimiques et physiques propres à chacun des polymères relevait de connaissances au-delà de notre domaine de compétence et n'entrait donc pas dans nos objectifs.

Comme indiqué précédemment (§ III.1), les tests ont porté sur trois floculants utilisés seuls et deux combinaisons d'un floculant avec un coagulant.

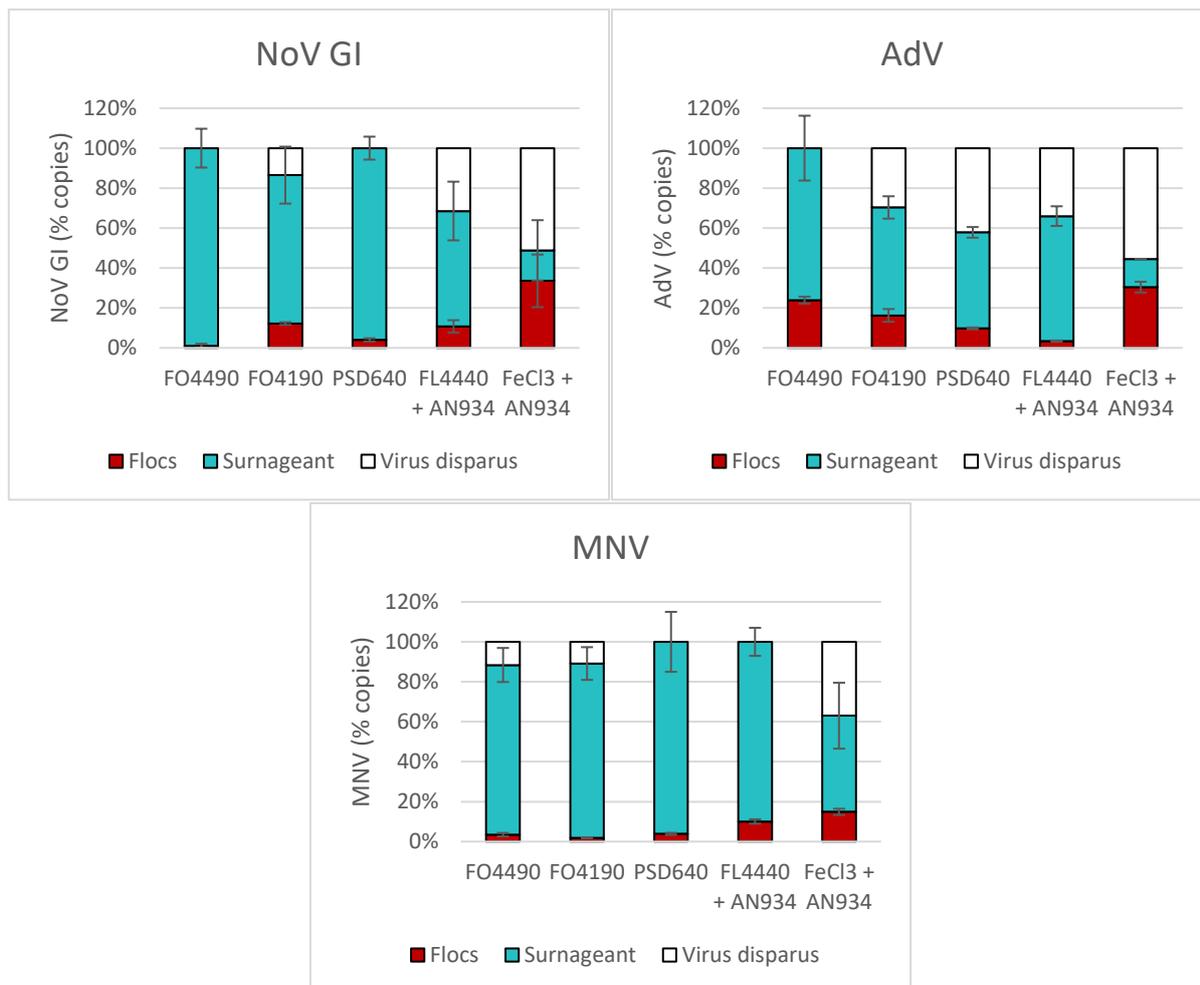


Figure III-13. Effet des polymères sur les charges virales en eaux usées. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 répliquats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

L'un des principaux résultats mis en évidence par la Figure III-13, est l'importance des pourcentages de virus retrouvés dans les surnageants par rapport à leurs équivalents pour les flocs, dans la majorité des cas où le traitement implique les polymères organiques. Les taux les plus significatifs d'élimination des virus résultant d'un piégeage dans les flocs, ne sont rencontrés qu'avec la combinaison de coagulant  $\text{FeCl}_3$  et de floculant AN934 (jusqu'à  $30\% \pm 10\%$  pour l'AdV,  $34 \pm 9\%$  pour le NoV GI et  $16\% \pm 2\%$  pour le MNV).

Les AdV semblent être plus concernés par cette voie d'élimination dans les flocs avec des valeurs (10 à 24%) un peu plus grandes que celles relatives aux NoV GI (4 - 12%) et aux MNV (2 - 4%). Là encore les raisons pourraient en être la différence de taille entre les virus et/ou les valeurs de leurs points isoélectriques (4.5 pour les AdV, 5.9 pour les NoV GI)

La faible rétention des MNV dans les flocs, par comparaison aux virus autochtones, va dans le sens de l'hypothèse de leur relative indépendance vis-à-vis des autres particules en

suspension, du fait du caractère récent de leur introduction dans le milieu. Les résultats du traitement par la combinaison FL4440-AN934 en sont un exemple, avec les valeurs de 10 % de MNV dans les floes et de 90 % dans le surnageant. Ils ne sont cependant pas en accord avec ceux obtenus pour la même combinaison de polymères, avec les suspensions du virus dans NaCl 0.1 M (§ III.4.1), qui faisaient apparaître la "disparition" de 50 % des virus. On peut suspecter ici un effet protecteur de la matrice « eaux usées », limitant la disparition des virus au cours de l'analyse.

Dans leur ensemble les résultats ne font pas apparaître de relation manifeste entre le type de traitement et l'importance du compartiment "virus disparus". Ses valeurs sont cependant plus importantes dans le cas des AdV (à l'exception de la floculation avec le FO4490) que dans celui de NoV GI et MNV, ce qui est cohérent avec les essais réalisés sur les suspensions virales dans NaCl 0.1 M (§ III.4.1).

### III.7. Effet des polymères sur l'infectivité virale

L'effet des polymères sur l'infectivité des virus a été étudié, ici, à la fois sur des suspensions virales "de laboratoire" (MNV en suspension dans des solutions de NaCl 0.1 M) et des eaux usées spikées.

Selon de précédentes expériences réalisées au sein du laboratoire, les macrophage murins RAW 264.7, cellules cibles des MNV, sont relativement sensibles aux eaux usées. Leur utilisation dans les expériences d'infectivité virale n'aurait pas permis de distinguer un effet des polymères de celui qu'aurait pu induire la matrice « eaux usées ». Le bactériophage MS2 a donc été choisi comme virus modèle des VEH et la bactérie *E. coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 700891™) comme cellule hôte.

Avant d'analyser l'effet des polymères sur l'infectivité des MS2, ce sont leurs effets sur leur quantification et sur celle de MNV qui ont été testés et comparés (Figure III-14). Le dopage des eaux usées brute par une suspension de MS2 a été volontairement surdosé afin de masquer les résultats liés aux virus autochtones dont le caractère infectieux peut déjà avoir été modifié par leur séjour dans l'environnement.

A travers cette expérience, nous avons souhaité poursuivre la comparaison des comportements de ces deux virus modèles vis-à-vis des traitements qui leur sont appliqués.

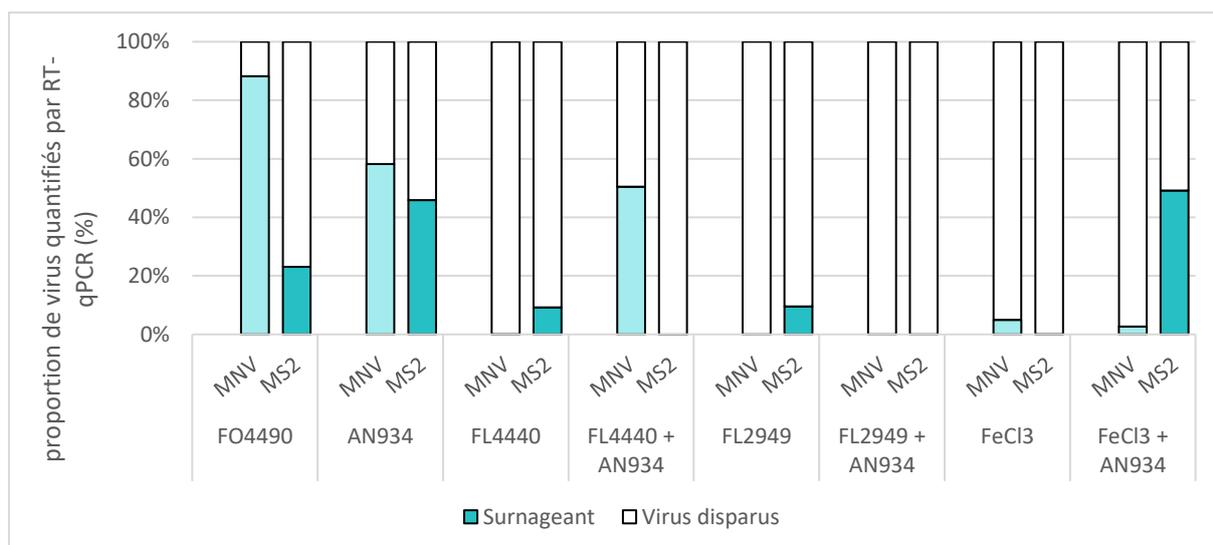


Figure III-14. Comparaison des effets des polymères sur les charges (mesurées par RT-qPCR) en MNV et MS2 en suspension dans NaCl 0.1M, Les résultats sont exprimés en pourcentage par référence aux concentrations mesurées en l'absence de polymère. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Le 1<sup>er</sup> constat est celui d'une plus grande sensibilité de MS2 à la présence des polymères que MNV. Dans le cas du floculant cationique FO4490, par exemple, 78% de MS2, ne sont plus apparents dans l'analyse alors que la valeur n'est que de 12% pour MNV. Ces valeurs sont respectivement de 99 % et 50 % dans le cas de la combinaison du floculant anionique AN934 avec le coagulant cationique FL4440. Dans le cas de la combinaison du coagulant anionique avec le floculant FL2949, aucun virus n'est plus détecté. La combinaison AN934 - FeCl<sub>3</sub> est la seule pour laquelle la perte de MS2 (50% de virus disparus) est inférieure à celle de MNV (79%).

Les bactériophages MS2 et les norovirus murins MNV ont sensiblement la même taille et des structures comparables (capside icosaédrique d'environ 30 nm de diamètre). Les différences observées seraient donc plutôt associées aux propriétés spécifiques de leur protéines de surface (hydrophobicité, charge de surface).

### III.7.1. Effet des polymères sur l'infectivité du bactériophage MS2 en suspension NaCl 0.1M

Les effets des polymères sur l'infectivité des MS2 en suspension sont présentés dans la Figure III-15.

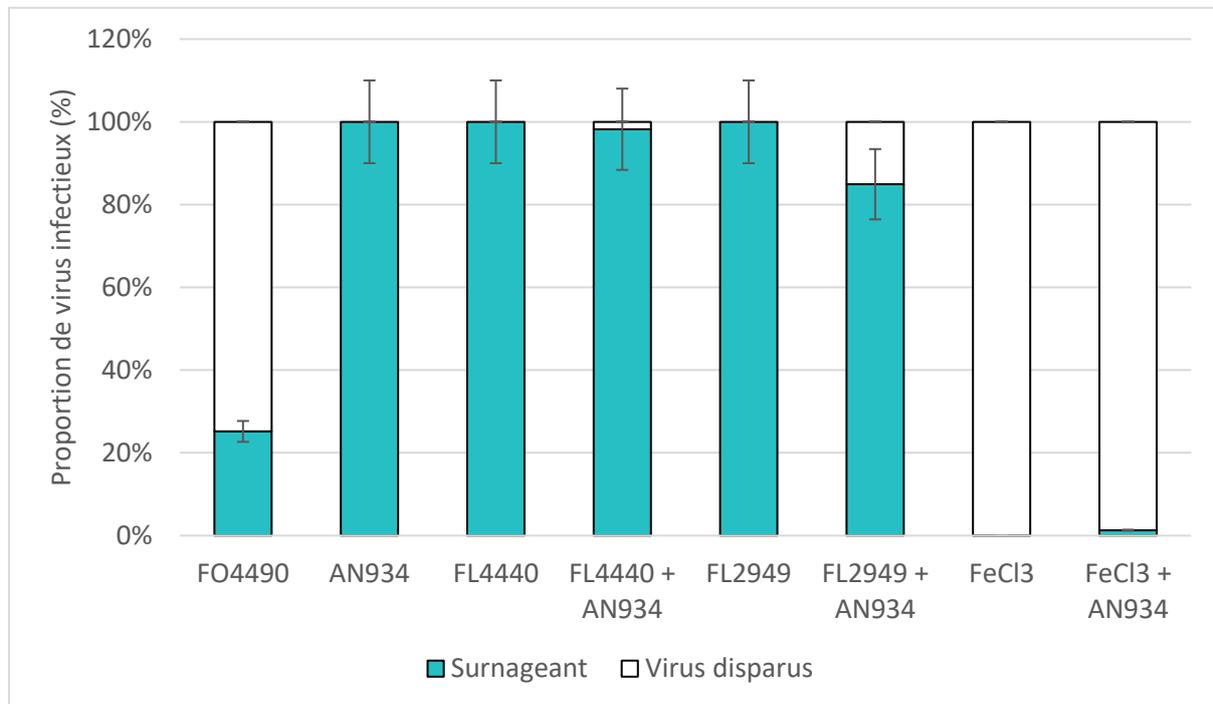


Figure III-15. Effets des polymères, seuls ou en combinaison, sur l'infectivité des MS2 en suspension NaCl 0.1M. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition).

Le caractère infectieux du virus ne semble pas avoir été affecté par la plupart des traitements.

Le floculant cationique FO4490 (40% de cationicité) et surtout la combinaison  $\text{FeCl}_3$ +AN934 (3% de virus encore infectieux) font exception. Dans cette dernière, l'effet délétère serait dû au  $\text{FeCl}_3$  puisque l'AN934 seul apparaît ne pas avoir d'effet sur l'infectivité, tandis que le  $\text{FeCl}_3$  inhibe totalement l'infectivité des MS2.

L'acidification du pH par la solution de  $\text{FeCl}_3$  a également pu jouer, pour partie, dans cette inhibition, comme suggéré précédemment (§ III.6.1).

Dans cette expérience les virus sont libres, en suspension dans une solution de NaCl 0.1M. Les polymères interagissent donc directement avec les capsides virales. Dans le cas du FO4490, notre hypothèse est que le caractère cationique du floculant aurait favorisé son interaction avec les capsides virales, chargé négativement à pH neutre. Les MS2 seraient alors englobés

dans une coque polymérique de FO4490, notamment au niveau de sa protéine de maturation impliquée dans l'infection des cellules hôtes, empêchant leur interaction avec leur cellules hôtes. Les coagulants cationiques FL2949 et FL4440 entreraient également en interaction avec le virus sans masquer totalement la protéine de maturation pour autant.

### III.7.2. Effet des polymères sur l'infectivité du MS2 en eaux usées

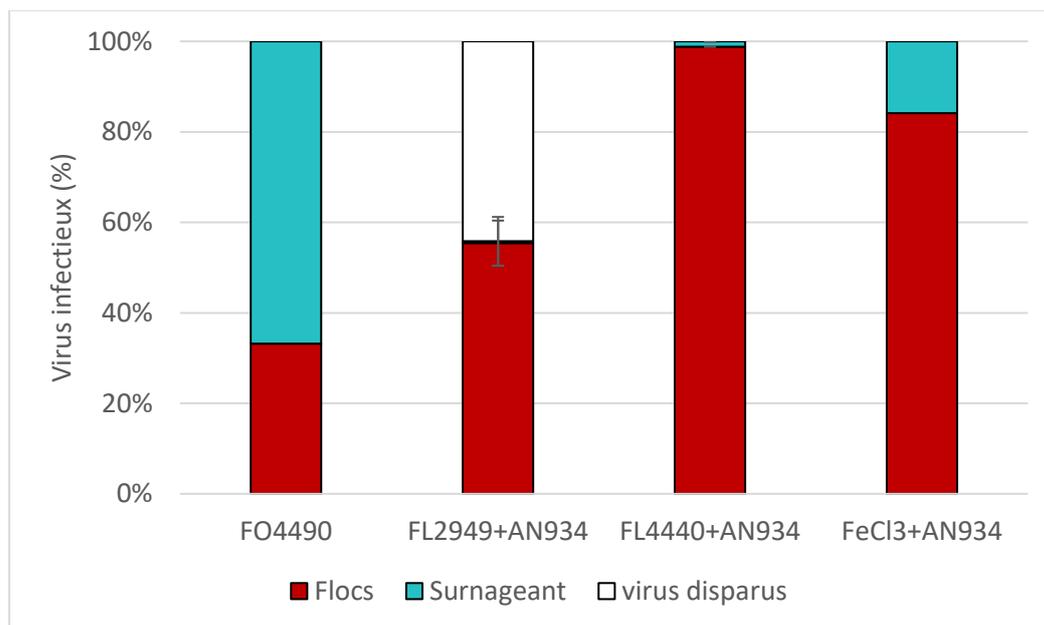


Figure III-16. Comparaison des effets des polymères sur l'infectivité des MS2 en eaux usées spikées. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition).

A l'exception du traitement au FO4490 (33%), la plus grande partie des virus infectieux est retrouvée dans les flocs. Seule la combinaison FL2949 + AN934 a pour conséquence la disparition d'une partie des virus infectieux. Cette combinaison semble donc à la fois affecter les analyses des acides nucléiques et les analyses basées sur les virus entiers (§ III.6.2).

Le traitement des eaux usées par les polymères, seuls ou en combinaison, semble donc avoir un effet négligeable sur l'infectivité du MS2 et, par extension, des VEH s'il en est un bon modèle.

### III.8. Approche NGS de l'évolution de la diversité de VEH à travers les principales étapes de traitements de la station d'épuration

Par définition, les virus entériques humains se répliquent dans les cellules humaines, principalement au niveau du tractus gastrointestinal. Des modifications du code génétique peuvent survenir lors d'une infection, induisant l'apparition de variants parmi les virus néo-formés, si ces mutations n'affectent pas significativement la structure ou la capacité infectieuse du virus.

Dans cette partie du travail, nous faisons l'hypothèse que le polymorphisme des mutants, en particulier lorsqu'il touche les structures de surface des capsides, pourrait modifier leur sensibilité aux traitements subis par l'eau usée. Il pourrait en résulter un effet filtre, mutants-sélectif, plus particulièrement au niveau de ce traitement primaire qui fait appel à des polymères, et donc un changement local de la diversité des charges virales.

Les processus de précipitation et de floculation induits par les polymères, mettent en jeu, notamment, la stéréochimie des protéines de la capside et leur polarité. Nous faisons l'hypothèse que ces caractéristiques jouent un rôle dans le recrutement qui est fait des particules virales par les polymères et en conséquence, que certaines "formes génétiques" de la même espèce de virus seraient mieux retenues que d'autres à ce niveau des traitements.

Certains auteurs se sont intéressés cette question, en se limitant à l'évolution entre l'entrée et la sortie de STEP. Aux Pays-Bas, [van der Berg \*et al.\* \(2005\)](#) ont par exemple étudié la diversité de certains variants NoV GI et NoV GII dans deux STEPs utilisant des traitements aux boues activées et bassin d'aération. Dans une étude plus récente, [Mabasa \*et al.\* \(2022\)](#) ont également mesuré les changements de diversité intragroupe des NoV GI et NoV GII dans des eaux usées brutes et après traitement aux boues activées et chloration. [Fong \*et al.\* \(2010\)](#) ont quant à eux comparé les sérotypes d'AdV prédominants entre eaux brutes et eaux traitées (effluent primaire). Leurs résultats font apparaître des différences entre les deux types d'eaux étudiés pour une même période.

Notre approche a été de faire appel à une technique NGS pour la recherche de modifications de la fréquence de variants génétiques des virus entériques humains, de part et d'autre de chacun des deux traitements, primaire et secondaire. Un changement de diversité plus important entre le point d'entrée de la station (entrée STEP) et le point situé en aval du décanteur primaire (entrée Biofiltres), qu'entre ce point et le point aval des réacteurs biologiques (sortie STEP) serait donc une 1<sup>ère</sup> indication de la validité de l'hypothèse.

La démonstration impliquait l'absence d'autres causes de changements génétiques dans la station. Les VEH ne pouvant pas se répliquer dans les eaux usées, il aurait pu s'agir de processus d'oxydation forts (ozonisation, blanchiment) ou de l'utilisation d'agents mutagènes (rayonnements ionisants, agents alkylants), mais aucun n'est implémenté à l'UDEP Grand Chambéry.

Tableau III-5. Indice de diversité (Shannon) calculé à partir du nombre de reads obtenus au niveau des trois points d'échantillonnage (n=5).

Point d'échantillonnage	Indice de diversité (Shannon)
<b>Entrée station</b>	1.8
<b>Entrée biofiltres</b>	2.1
<b>Sortie station</b>	2.1

Sous réserve des conséquences aux problèmes rencontrés lors de la mise en place du projet (MM.4.3.2), les résultats montrent que la diversité des AdV s'accroît entre le point d'entrée et le point aval du traitement primaire (Tableau III-5), et, plus particulièrement, qu'elle ne change pas de part et d'autre des biofiltres.

Ce résultat pourrait donc être une 1<sup>ère</sup> indication de la réalité d'un effet filtre espèce-dépendant du traitement primaire sur les représentants des adénovirus. De nouveaux essais doivent cependant être mis en place

### III.9. Conclusions du chapitre III

Dans ce chapitre, notre but était d'utiliser les différences des polymères dans leurs structures chimiques et dans les "types" de floccs qu'ils pouvaient générer, en tant qu'élément de compréhension des processus de rétention des virus. C'est dans un second temps et dans une série expérimentale ultérieure, qu'une comparaison d'efficacité pourra être faite avec les autres variantes de traitement primaire.

Les essais montrent que certains polymères peuvent affecter profondément l'analyse des charges virales par RT-qPCR, et en conséquence la pertinence des suivis de charges virales dans les conditions où ils sont mis en œuvre.

Des expériences complémentaires devraient être envisagées pour affiner la compréhension des mécanismes à travers lesquels ils agissent, afin d'apporter des modifications nécessaires aux protocoles opératoires : prétraitements du tampon de lyse, des billes de silices et/ou des réactifs de RT-qPCR, par exemple.

Les résultats montrent également que la combinaison de polymères la plus efficace pour la rétention des VEH étudiés est le coagulant  $\text{FeCl}_3$  (50  $\text{mg.L}^{-1}$ ) associé au flocculant anionique AN934 (4  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Cette combinaison est celle utilisée par la STEP Grand Chambéry, à des concentrations cependant bien inférieures. Ce choix est probablement lié au souci d'optimiser le rapport coûts/bénéfices et de répondre aux normes associées au traitement des eaux usées. Les résultats de rétention des NoV GI et AdV dans les floccs (30-34%) sont tout de même cohérents avec les taux d'abattelements du traitement primaire de l'UDEP calculés dans le chapitre II.

Malgré une efficacité supérieure de cette combinaison, par rapport aux autres polymères testés, un très grand nombre de virus resterait en suspension dans le surnageant des eaux usées traitées. Cela signifie qu'une part non négligeable de VEH serait injectée dans les réacteurs biologiques, l'étage suivant de la STEP.

Les expériences portant sur la mesure de l'infectivité du bactériophage MS2, choisi comme virus modèle, semble également montrer qu'une part de ces virus garderait son potentiel infectieux.

# Chapitre IV

Incidences du traitement biologique sur les charges en virus entériques humains

## Chapitre IV - Incidences du traitement biologique sur les charges en virus entériques humains

Le traitement secondaire de la STEP Grand Chambéry repose sur la filtration de l'eau par de la pouzzolane colonisée par des biofilms. Ces biofiltres (en anglais *trickling filter*, *trickling biofilter*, *biofilter*, *biological filter* ou *biological trickling filter*) sont distribués dans 5 cuves de 360 m<sup>3</sup>. Cette étape des traitements comporte deux périodes, répétées toutes les 13 h :

- 1) La filtration de l'eau à traiter, période durant laquelle les biofilms utilisent la charge organique entrante pour développer leur propre biomasse.
- 2) Le lavage par injection d'eau dite industrielle, dans le but de détasser la pouzzolane et d'éliminer une partie de la biomasse. L'eau de lavage passe ensuite dans un décanteur lamellaire au niveau duquel sont récupérées des boues dites biologiques. L'eau surnageante rejoint le canal de sortie de la STEP et plus loin, le Rhône.

L'ensemble des expériences présentée dans ce chapitre a été réalisé en laboratoire et non directement sur place, pour les raisons suivantes :

- Contraintes administratives : les conditions de travail sur site étant limitées par les contraintes réglementaires (réglementation du travail, contraintes horaires du site, sécurité de l'expérimentateur et des collaborateurs, raison éthique, à propos du spiking notamment).
- Problèmes liés au changement de l'échelle à laquelle les expérimentations en virologie auraient été conduites (du point de vue de l'échantillonnage et du spiking, par exemple) dans le passage du laboratoire aux installations de l'UDEP.

Pour ces raisons, il a été choisi d'approcher l'étude des biofiltres à l'aide de pilotes de laboratoire composés de tubes de plexiglass de 5 cm de diamètre et 50 cm de haut, remplis de pouzzolane colonisée par des biofilms, prélevée au sein même des biofiltres de l'UDEP

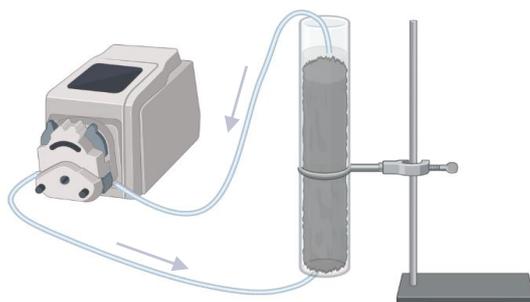


Figure IV-1. Représentation schématique d'un pilote de biofiltre

Grand Chambéry (Figure IV-1). Ces pilotes étaient protégés de la lumière afin d'éviter le développement d'organismes photosynthétiques. La circulation d'eaux usées, en circuit ouvert ou fermé, était assurée par une pompe péristaltique multi-têtes. Trois pilotes ont ainsi été installés, pour que chaque expérience puisse être réalisée en triplicat.

Le Tableau IV-1 présente les paramètres du traitement biologique associés aux biofiltres de l'UDEP et aux pilotes de laboratoire développés pour cette étude.

*Tableau IV-1. Comparatif des caractéristiques des biofiltres de l'UDEP Grand Chambéry et des pilotes de laboratoire*

	Biofiltres UDEP	Pilotes
<b>Débit/cuve</b>	326 m <sup>3</sup> /h	6.6 <sup>E</sup> -03 m <sup>3</sup> /h
<b>Temps de transit</b>	24 min	Variable selon l'expérience
<b>Hauteur utile</b>	3.2 m	0.042 m
<b>Volume utile</b>	3.6 <sup>E</sup> 02 m <sup>3</sup>	7.5 <sup>E</sup> -04 m <sup>3</sup> (cuve + tubes)
<b>Volume pouzzolane</b>	2.3 <sup>E</sup> 02 m <sup>3</sup>	4.0 <sup>E</sup> -04 m <sup>3</sup>
<b>Volume d'eau interstitielle</b>	1.3 <sup>E</sup> 02 m <sup>3</sup>	3.5 <sup>E</sup> -04 m <sup>3</sup> (cuve + tubes)

Les contributions relatives des acteurs de la rétention des virus présents dans ce type de réacteur biologique sont encore mal connues. Les principaux mécanismes mis en jeu devraient être les suivants (Figure IV-2) :

- Mécanismes physiques et chimiques
  - Effet filtre du matériau, lui-même (pouzzolane) et en liaison avec le colmatage progressif des interstices du fait, notamment du développement des biofilms
  - Fixation (dont attractions électrochimiques) sur tous les supports. Il peut notamment s'agir d'adsorption sur des supports minéraux ou d'accrochages de différentes natures, sur des molécules organiques (telles que des anticorps).
  
- Mécanismes biologiques
  - Production d'exoenzymes par les bactéries (protéases, nucléases, ...)
  - Prédation par phagocytose, filtration, ingestion directe (protistes, rotifères, notamment)

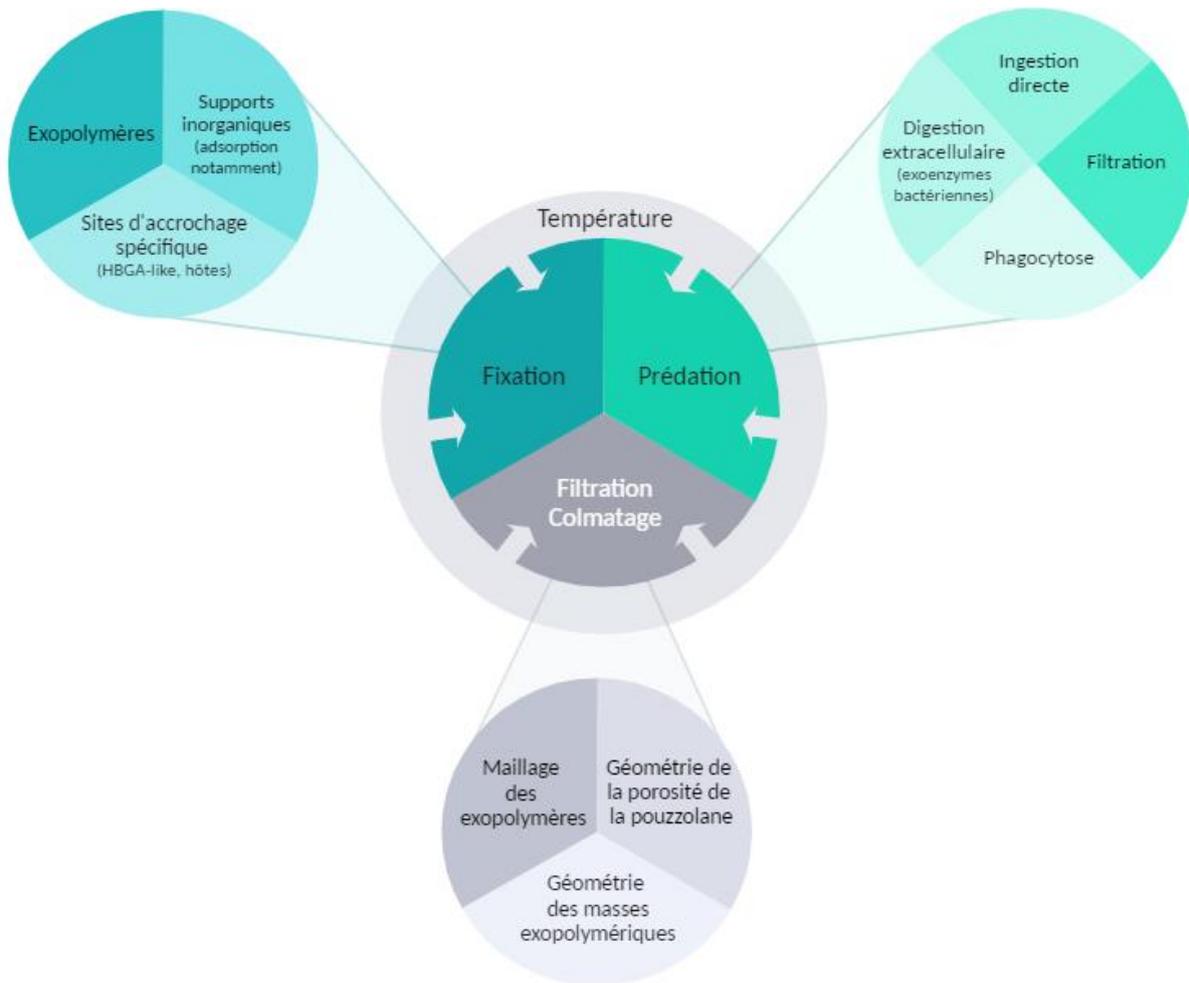


Figure IV-2. Principaux facteurs potentiellement impliqués dans la rétention des virus dans les biofiltres de l'UDEP Grand Chambéry

L'évolution dans le temps de ces mécanismes et de leurs interactions, laisse prévoir une certaine variabilité de l'efficacité avec laquelle les virus sont retenus dans ces réacteurs.

De nombreux facteurs peuvent en être responsables et notamment :

- Le colmatage des lits et ses conséquences sur le débit et donc sur les apports trophiques, en particulier, l'oxygène. Outre l'établissement d'un gradient amont aval, le colmatage est générateur de chemins préférentiels et plus globalement d'une distribution contagieuse des population microbiennes.
- Les changements du rapport prédateurs-proies (abondances relatives des rotifères, éventuellement, d'autres métazoaires, des protistes et des bactéries), liés aux variations de la composition et de la forme (dissoute / particulaire) des apports en matières organiques et, secondairement, au colmatage.

## IV.1. Comparaison de biofilms de maturité différente pour leur charge en VEH et leur capacité de rétention de virus spikés

Avant d'essayer d'identifier et de comprendre les mécanismes responsables de l'abattement des charges virales des eaux de percolation par des expériences en laboratoire, nous nous sommes adressés à différents types de biofilms prélevés sur le site de l'UDEP Grand Chambéry pour les comparer du point de vue de leurs charges en VEH autochtones et de leurs capacités de rétention de virus spikés.

La comparaison concerne deux types de biofilms :

- des biofilms récupérés lors d'une opération de détassage ("biofilms jeunes" dans ce qui suit), au terme donc de la période de 13h qui sépare cycliquement ces opérations
- des biofilms prélevés dans le canal de sortie de l'établissement, dont l'âge correspond à la fréquence avec laquelle ce canal est curé, soit environ un mois ("biofilms matures").

Dans cette expérience, 50 mL de biofilms, correspondant à  $1.77 \pm 0.02$  g (poids sec) ont été spikés au MNV puis analysés selon le protocole défini dans le Chapitre I.

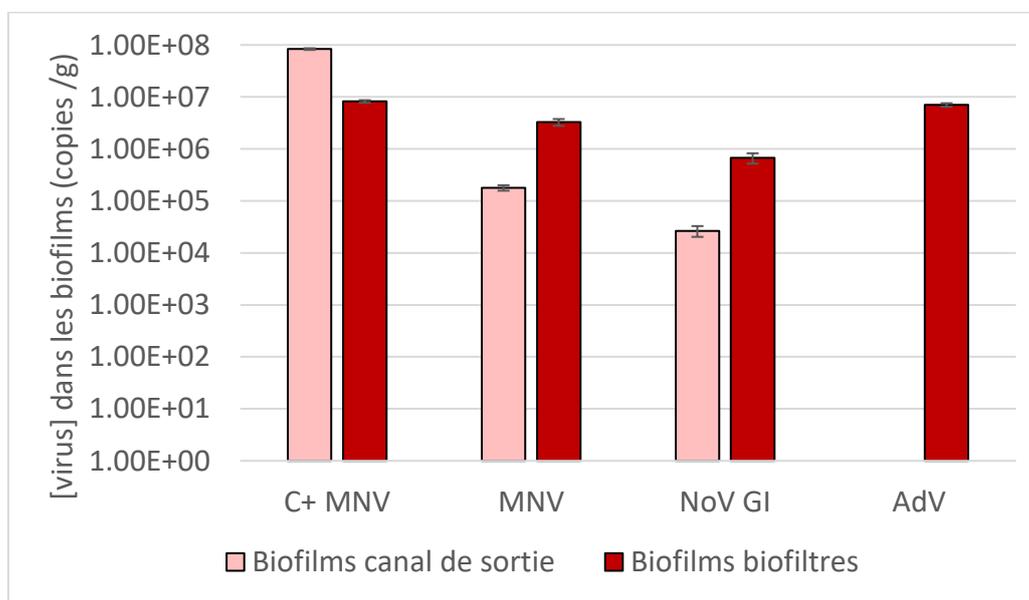


Figure IV-3. Quantités de VEH mesurées dans les biofilms "jeunes" (issus des biofiltres) et dans des biofilms "matures" du canal de sortie de la STEP. Le C+ correspond à un poids équivalent d'eau ultrapure stérile spikée au MNV. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Comme le montre la Figure IV-3, la concentration des AdV dans les biofilms matures est restée sous la limite de détection de la RT-qPCR. Une digital PCR, plus sensible que la qPCR, a permis de corroborer cette observation, avec seulement 5E01 copies/g détectées. La quantification des autres virus par dPCR a donné des valeurs similaires à celles obtenues par qPCR. Le rapport AdV/NoV GI dans les biofilms matures s'avère donc extrêmement faible (0.02). Par comparaison, il atteint 10.4 dans les biofilms jeunes et 1.8 en moyenne dans les eaux de sortie, à la même période. Ce constat suggère l'existence de processus actifs de destruction des AdV et de rétention des NoV, liés au degré de maturité des biofilms.

## IV.2. Efficacité des pilotes dans l'abattement des charges virales autochtones et spikées

Le fait qu'un abattement effectif des charges en VEH est obtenu entre l'amont et l'aval des réacteurs biologiques de l'UDEP Grand Chambéry a été décrit dans le Chapitre II.

Notre objectif, ici, était de mettre en évidence, à l'échelle de nos pilotes de laboratoire, la réalité d'un abattement des charges en VEH et l'effet de quelques-uns des paramètres qui étaient susceptibles de le contrôler. Deux expériences ont été réalisées dans ce but, organisées selon les schémas donnés dans la Figure IV-4.

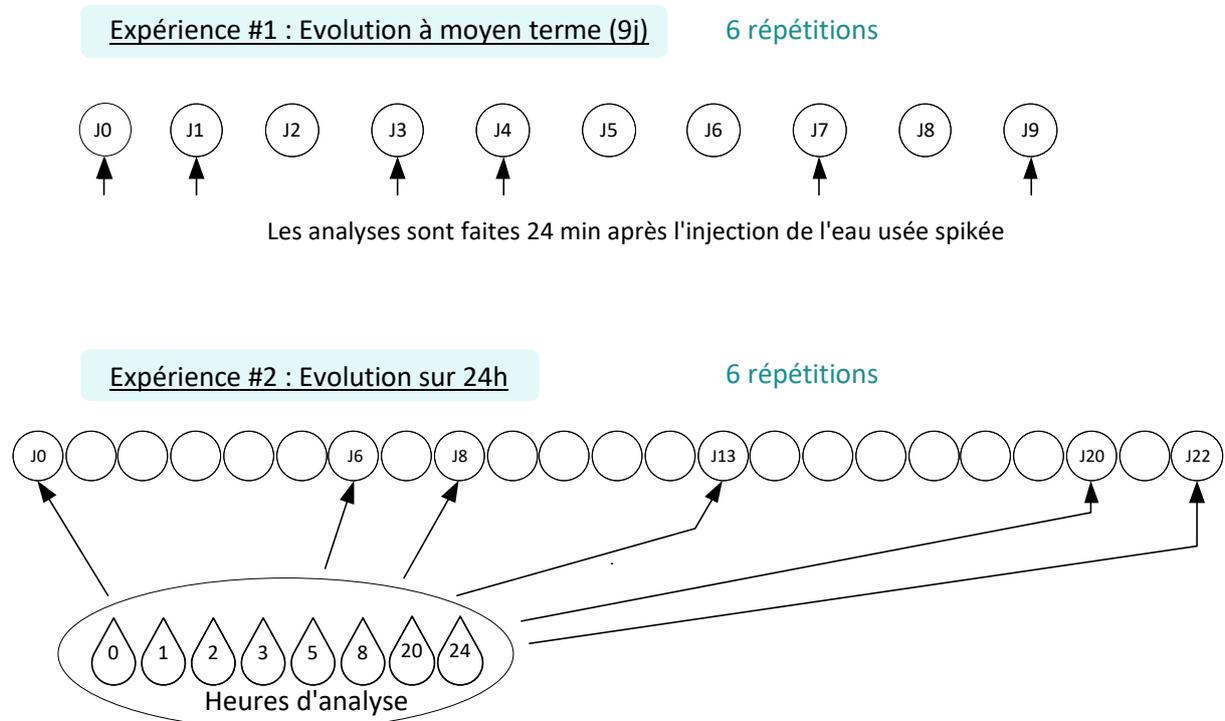


Figure IV-4. Organisation des deux expériences du suivi de l'évolution des abattements viraux.

#### IV.2.1. Evolution à moyen terme (9 jours) de la capacité de rétention des charges virales.

Dans cette expériences le débit de la pompe (500 mL/min) était réglé pour reproduire au plus près la vitesse de passage de l'eau dans les bioréacteurs de la STEP (8 m/h) et respecter son temps de transit (24 minutes).

Le déroulement des opérations à chacun des jours d'analyse était le suivant (Figure IV-5) :

- Vidange des pilotes, suivi immédiatement d'un remplissage par l'eau usée spikée préalablement préparée
- Mise en route de la pompe, chacun des pilotes étant alors en circuit fermé.
- Après 24 minutes de fonctionnement, mesure de la concentration de l'eau en virus (NoV GI, AdV et MNV). La mesure était aussi faite sur l'eau avant qu'elle ait été en contact avec les biofilms (marquée J0 dans les figures).
- Vidange des pilotes, remplissage par l'eau usée de la phase d'entretien des pilotes entre les jours d'analyse et remise en route de la pompe.

##### ***Paramètres de réglage des pilotes***

*Débit : 500 mL/min*

*Temps de transit : 24 min*

*Mesures : charges virales (RT-qPCR)*

*Température : ambiante (21 ± 1°C)*

Les analyses ont été réalisées à 6 reprises : J0 (mise en route des biofiltres), J1, J3, J4, J7 et J9.

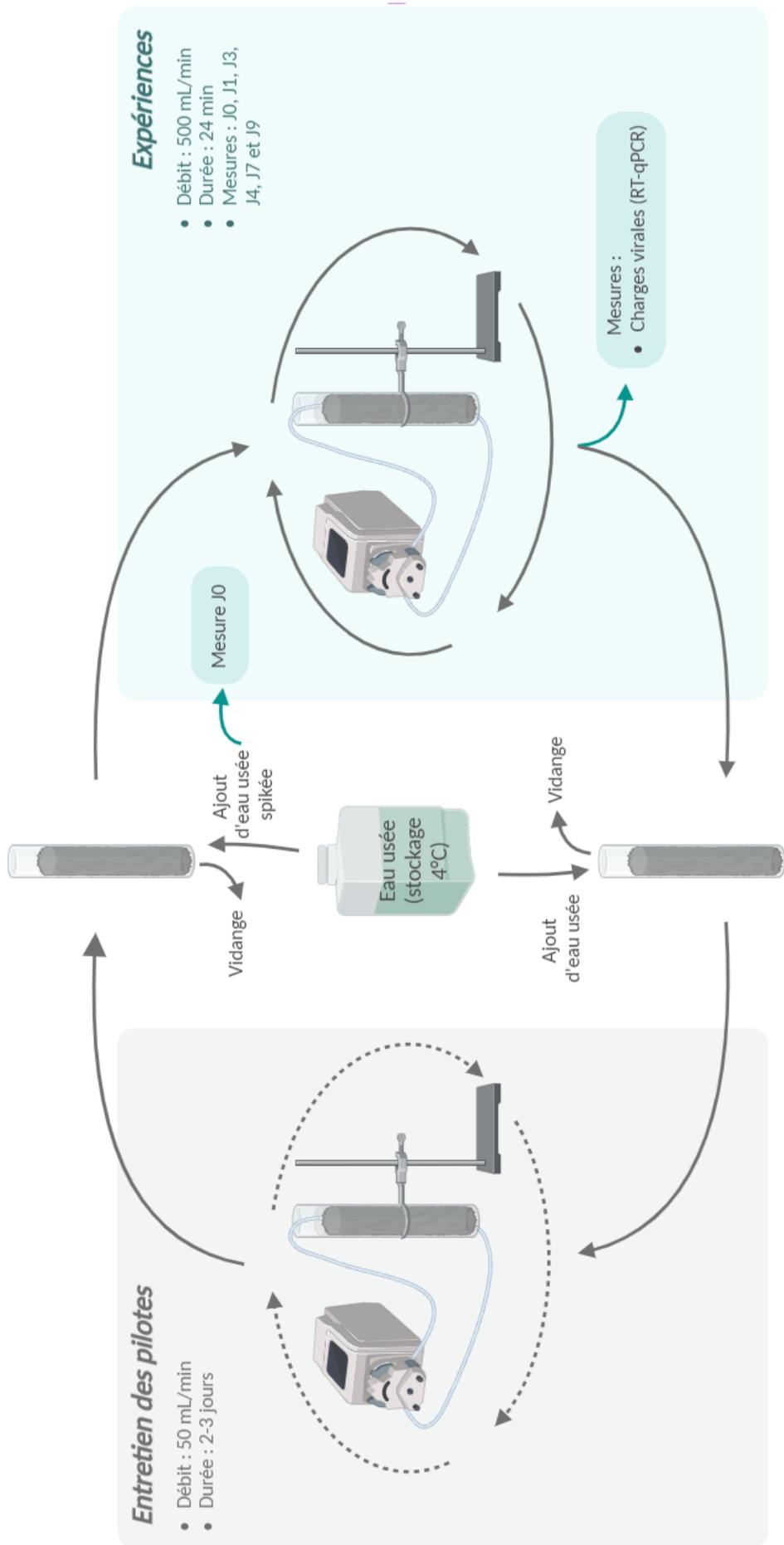


Figure IV-5. Design expérimental des expériences sur l'effet de l'âge des biofilms sur la rétention des charges virales.

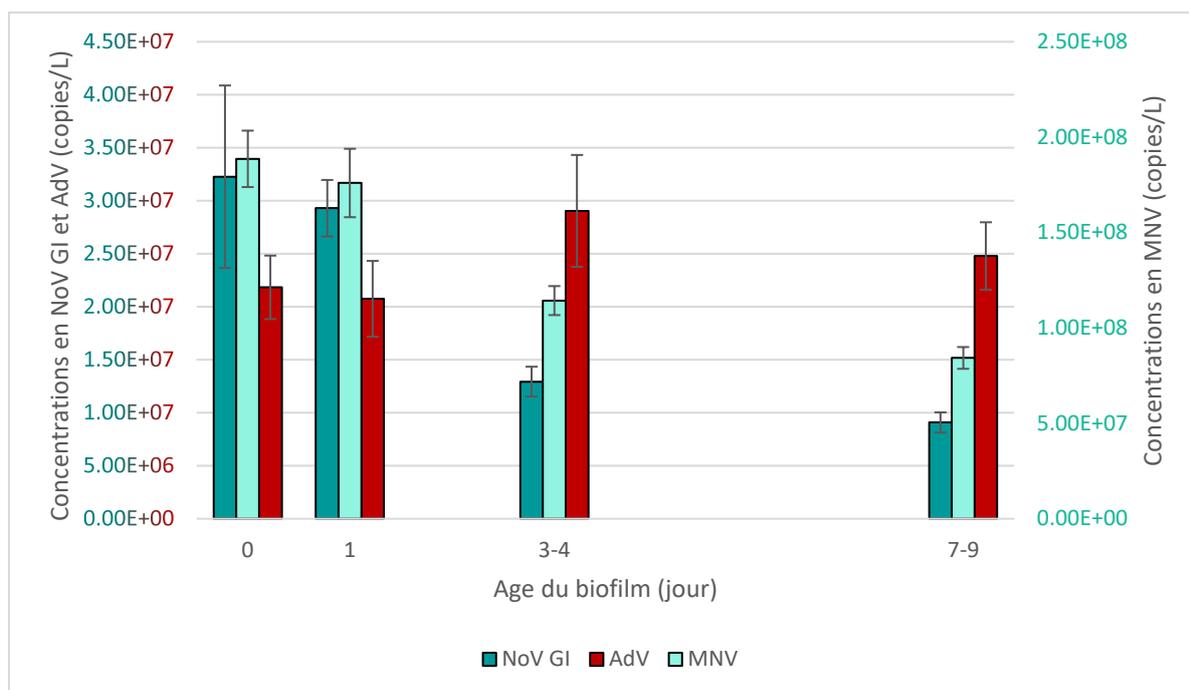


Figure IV-6. Incidence de l'âge des biofilms sur les charges virales en NoV GI, AdV et MNV restantes dans l'eau de percolation. Les mesures des jours 3-4 et 7-9 ont été regroupées pour obtenir une vision d'ensemble des évènements. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (minimum 3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Les résultats font apparaître un accroissement de la capacité des réacteurs à réduire les charges virales des NoV GI et des MNV avec l'âge de leurs biofilms (Figure IV-6).

Ils apportent aussi deux informations inattendues. Celle de la diminution comparable des concentrations de l'eau de percolation en NoV GI et en MNV, avec l'âge des biofilms, contrairement à ce qui pouvait être attendu en considérant que les virus autochtones devaient être préférentiellement associés à des particules et que les MNV devaient plutôt être restés à l'état de particules libres. Cela n'est donc pas le cas et il faut en déduire que, dans cette expérience, les MNV ont rapidement été associés à d'autres particules. La rétention des norovirus augmente progressivement avec l'âge des biofilms, passant de 7 et 9% (MNV et NoV GI, respectivement) au jour 1, à 39 et 60% aux jours 3-4, pour finir par atteindre 55 et 72% après une semaine de croissance des biofilms.

La seconde information inattendue est celle de l'absence d'évolution significative de la rétention des AdV durant la même période, alors que leur taille, plus importante, laisse supposer qu'ils soient plus susceptibles d'être retenus que les norovirus.

Le fait que la rétention des AdV n'ait pas changé alors que celle des norovirus s'est accrue durant les 9 j, nous amène à douter d'une réelle évolution de la capacité filtrante des colonnes de pouzzolane et à soupçonner l'existence de spécificités dans les mécanismes de rétention des norovirus. Plutôt que de faciliter leur passage entre les éléments qui

participent au colmatage, la petite taille des Norovirus, faciliterait leur rencontre avec les structures et/ou composés sur lesquels ils seraient susceptibles d'être retenus (adsorption, réactions antigène anticorps, chélation). Cette explication suppose aussi un développement (une multiplication) de ces structures et/ou composés au cours des 9 jours d'observation de notre expérience.

Dans ce sens, les HBGA humains pourraient jouer un rôle. Il s'agit de glycanes, présents à la surface de cellules de l'épithélium intestinal, qui semblent jouer un rôle important dans la liaison des norovirus à leurs cibles. Plusieurs études ont révélé la présence d'HBGA-like exprimés à la surface de bactéries entériques (isolées à partir des fèces d'un individu sain), et soulignent leur importance dans la rétention des NoV ([Miura et al. 2013](#), [Amarasiri et al. 2016](#)). Leur présence dans les eaux usées est donc tout à fait plausible. La similarité des HBGA-like bactériens avec les récepteurs humains pourrait donc en faire des sites d'accrochage spécifiques privilégiés pour les norovirus. A ce titre, ils pourraient donc être intégrés à la liste des facteurs de rétention des virus dans les réacteurs biologiques. Il n'a pas encore été trouvé de récepteurs de ce type, spécifiques aux adénovirus, dans les eaux usées.

La vitesse avec laquelle la rétention des virus a évolué durant notre expérience suggère qu'une partie des mécanismes mis en jeu se sont développés en liaison avec des processus biologiques, probablement, ici, en lien avec les changements qui ont affecté les biofilms. Il est difficile d'être plus précis quant à la nature de ces changements car si les conditions dans lesquelles les réacteurs étaient maintenus entre les jours d'analyse (renouvellement en batch de l'eau des pilotes et au mieux, au pas de temps de 24h) n'étaient pas optimales pour le développement des biofilms, elles ne devaient pas, pour autant, leur être trop défavorables.

Comme indiqué précédemment, à l'UDEP Grand Chambéry, un détassage du remplissage des réacteurs biologiques est effectué toutes les 13 h. Cette période, relativement courte, a pour effet de maintenir les biofilms au niveau des stades "juvéniles" de leur développement, favorables à une forte activité exo-enzymatique et donc à la consommation des composés organiques, notamment dissous, de l'eau. L'apport de nos résultats à ces considérations est qu'ils semblent indiquer qu'à l'inverse, une maturité plus grande des biofilms serait favorable aux mécanismes de rétention des Norovirus. Ils indiquent aussi que la rétention des Adénovirus ne serait pas concernée par ces remarques.

## IV.2.2. Evolution à court terme (24h) de la capacité de rétention des charges virales

Cette seconde expérience avait pour objectif de suivre l'évolution de la capacité de rétention des virus à une échelle de temps de l'ordre de grandeur de celle de la période qui sépare deux détassages.

Dans la pratique, en raison de contraintes analytiques, et de celles liées au travail dans l'entreprise, il n'a pas été possible de concentrer l'expérience sur les 13 h correspondant à la périodicité des détassages à l'UDEP Grand Chambéry. Notre expérience du suivi de l'évolution de la capacité de rétention des virus des pilotes a été conduite sur 24h (Figure IV-7). Elle a été répétée 6 fois sur une période de 22 jours. Les résultats présentés sont donc les médianes de 6 valeurs. Le fait qu'une eau usée différente ait été utilisée à chaque fois, explique pour partie l'irrégularité des évolutions observées mais donne aussi de la robustesse aux interprétations qui en sont données.

L'analyse des norovirus et des adénovirus a été complétée ici, par celle des bactériophages MS2 à partir desquels des modifications éventuelles de l'intégrité des structures virales ont pu être évaluées.

L'expérience a également été orientée vers l'exploration de deux des facteurs potentiellement explicatifs de l'abatement des charges virales :

- L'activité de deux groupes d'enzymes "généralistes", les hydrolases et les phosphatases, impliquées dans la dégradation des matières organiques et couramment utilisées en hydrobiologie pour évaluer l'activité microbienne exo-enzymatique des eaux et des sédiments.
- Le colmatage des réacteurs avec le suivi de l'évolution du temps de transit de l'eau de percolation, réalisé à la fin de chaque analyse de 24h.

Après leur vidange, les circuits fermés des réacteurs ont été remplis par de l'eau usée spikée et la pompe remise en route, réglée pour un débit de 110 mL/min. Les analyses ont été faites à 8 reprises durant les 24 h qui ont suivi, sur des échantillons prélevés à la sortie des réacteurs.

### *Paramètres de réglage des pilotes*

*Débit : 110 mL/min*

*Temps de transit : 24 h*

*Mesures : charges virales  
(RT-qPCR), activités  
enzymatiques, infectivité,  
débit*

*Température : ambiante  
(21 ± 1°C)*

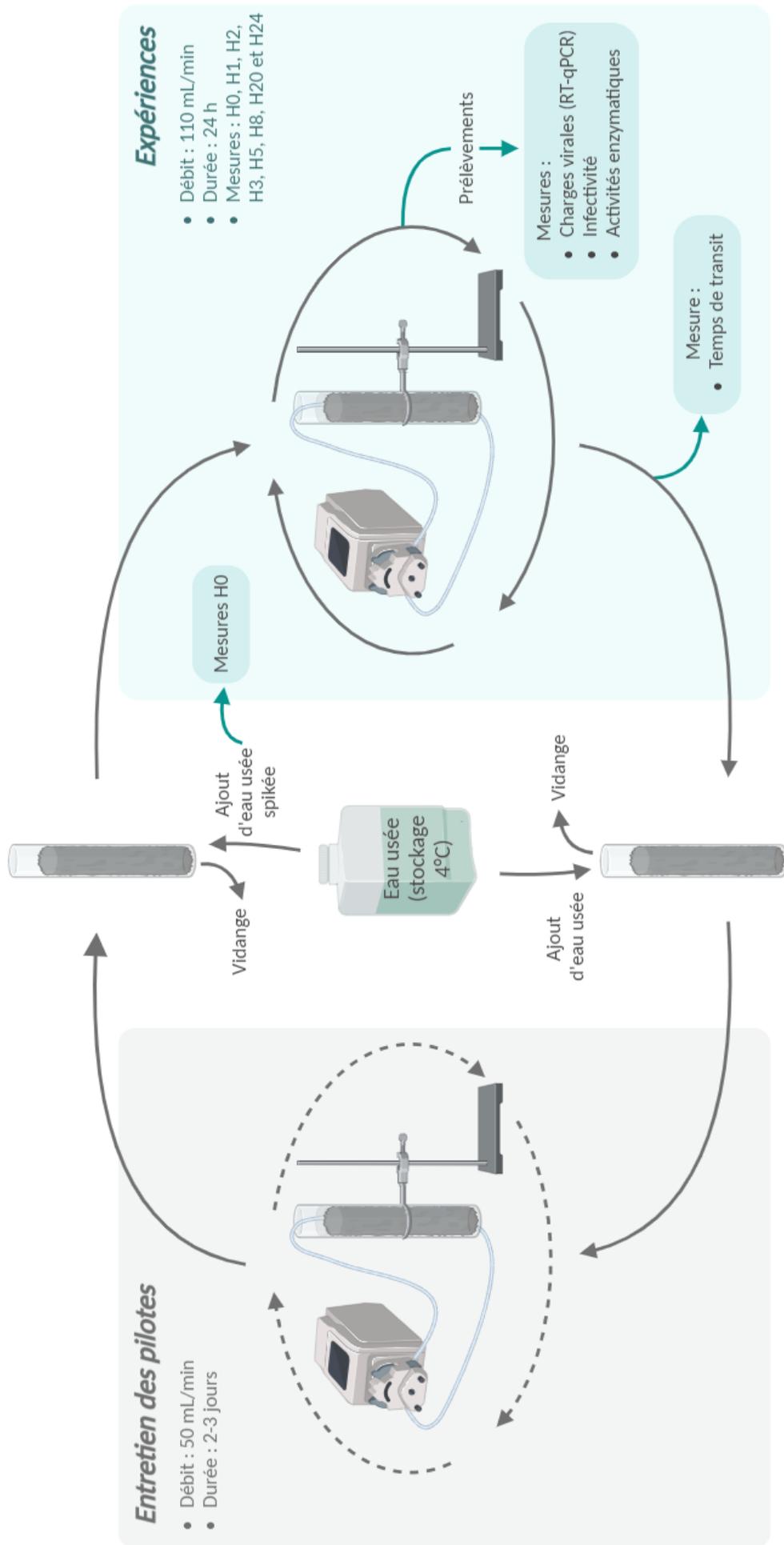


Figure IV-7. Design expérimental des expériences sur l'effet de la croissance du biofilm sur la rétention des virus

#### IV.2.2.1. Evolution des charges virales durant les 24h d'expérience

Les analyses font apparaître une diminution au cours du temps de la concentration des virus dans l'eau circulante. Cette évolution est représentée en termes de disparition des charges virales (rétention et/ou dégradation) dans la Figure IV-8.

Compte tenu des différences de concentration inévitables entre les réacteurs, les valeurs des charges virales ont été standardisées par les concentrations initiales des virus dans l'eau spikées, avant son introduction dans les réacteurs. Elles sont donc exprimées en pourcentage.

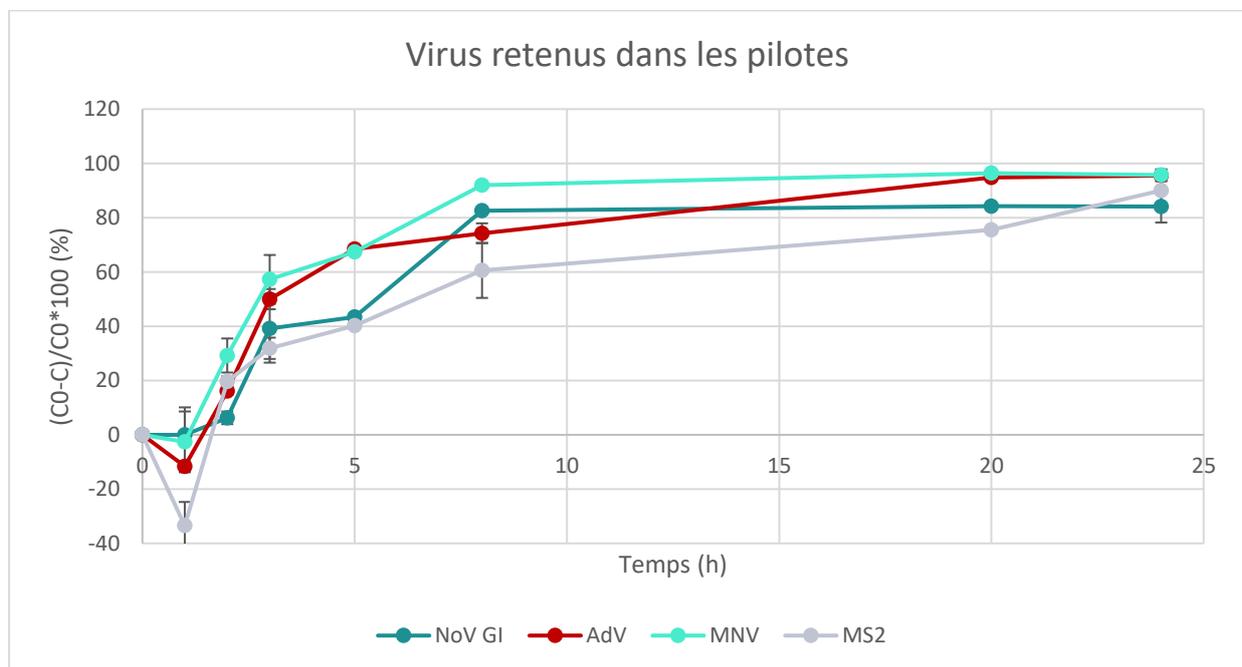


Figure IV-8. Evolution en fonction du temps de la réduction des charges virales dans l'eau de percolation des réacteurs. Les valeurs correspondent au rapport  $(C_0 - C) \times 100 / C_0$  où  $C_0$  = concentration initiale du virus dans l'eau spikées, avant son introduction dans les réacteurs,  $C$  = concentration virale dans l'eau de percolation à l'heure du prélèvement. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian ( $n=6$ , avec 3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Les valeurs négatives obtenues à H1, correspondent aux bouleversements hydrodynamiques qu'ont subi les biofilms à la suite de la vidange des réacteurs, puis de leur remplissage par l'eau spikée. Une partie des zones superficielles des formes érigées des biofilms a alors été entraînée dans le flux d'eau, favorisant le relargage des virus qui leur étaient associés.

Deux remarques peuvent être faites à ce sujet. La 1<sup>ère</sup> sur le fait que les virus autochtones ne sont pas, tous les deux, concernés par le phénomène. Il n'apparaît pas de NoV GI "additionnels" dans l'eau circulante, ce qui pourrait être rapproché des remarques faites au sujet des résultats de l'expérience précédente, sur l'existence possible de spécificités dans les mécanismes de rétention des norovirus. Ces mécanismes seraient globalement plus puissants que ceux qui affectent les adénovirus.

La 2<sup>nd</sup>e remarque concerne les virus spikés (MNV et MS2) et le fait qu'il n'apparaît de virus "additionnels" que pour le bactériophage (+ 33 %). Notre interprétation implique des essais intermédiaires réalisés pour la mise au point de l'expérience (essais non présentés ici). Le remplissage des pilotes n'ayant pas été changé entretemps, nous pouvons supposer qu'une partie des MS2 retenus au cours de ces essais, a trouvé dans les biofilms, des cellules hôtes qu'ils ont pu infecter. Cette hypothèse suggère toutefois que les conditions d'expression des F-pili par les bactéries hôtes, nécessaire à l'infection, aient été réunies, ce qui semble peu probable (Grabow, 2001).

Trois périodes peuvent être définies sur le plan des cinétiques de rétention observées (Tableau IV-2) :

- La période H0 - H3, au cours de laquelle le taux de rétention est fort (12 à 19 % de virus retenus/heure), et ce pour chacun des types de virus ;
- La période H3 - H8, durant laquelle le taux de rétention se situe entre 5 à 9% ;
- La période H8 - H24, durant laquelle la capacité de rétention des biofilms devient asymptotique, avec des taux situés entre 0 et 2% selon le type de virus.

*Tableau IV-2. Taux horaire de rétention des virus autochtones et spikés pour chacune des périodes définies dans le texte.*

rétention / heure (%)	NoV GI	AdV	MNV	MS2
<b>Période H0-H3</b>	13 ± 6	17 ± 9	19 ± 6	12 ± 3
<b>Période H3-H8</b>	9 ± 5	5 ± 5	7 ± 3	5 ± 5
<b>Période H8-H24</b>	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	2 ± 1

L'abattement des virus au cours de la première période semble trop rapide pour être le fait du vecteur biologique. Il pourrait donc s'agir du résultat de processus essentiellement physiques (filtration en relation avec le colmatage notamment). La deuxième période paraît être une période de transition vers la troisième période au cours de laquelle, du fait de sa cinétique l'abattement des charges correspondrait à des processus biologiques (activité enzymatique, prédation). En fait, l'ensemble des processus coexistent très certainement en permanence, et il apparaît que ce sont ceux dont les cinétiques sont les plus élevées qui contrôlent l'évolution des charges dans les premières heures.

Un modèle simple dans lequel un taux d'abattement fixe (RC) est appliqué à la concentration précédente ( $C_n = C_{n-1} - RC$ ) a été appliqué aux valeurs initiales des concentrations virales. Il vient confirmer la participation de deux types de mécanismes à la réduction de la concentration des charges virales, mécanismes dont les cinétiques diffèrent d'un ordre de grandeur dans le cas de NoV GI (Figure IV-9). La différence est moindre dans le cas des trois autres virus. Le meilleur ajustement a été obtenu en situant le début de la seconde période à 5 h pour MNV et à 8 h pour les autres virus. Il est difficile d'analyser plus avant les différences observées à partir des résultats d'un modèle aussi simple. Ils incitent cependant à l'écriture d'un modèle plus élaboré pour affiner l'identification des mécanismes mis en jeu et la recherche d'éventuelles spécificités de leurs actions vis-à-vis sur les différents types de virus.

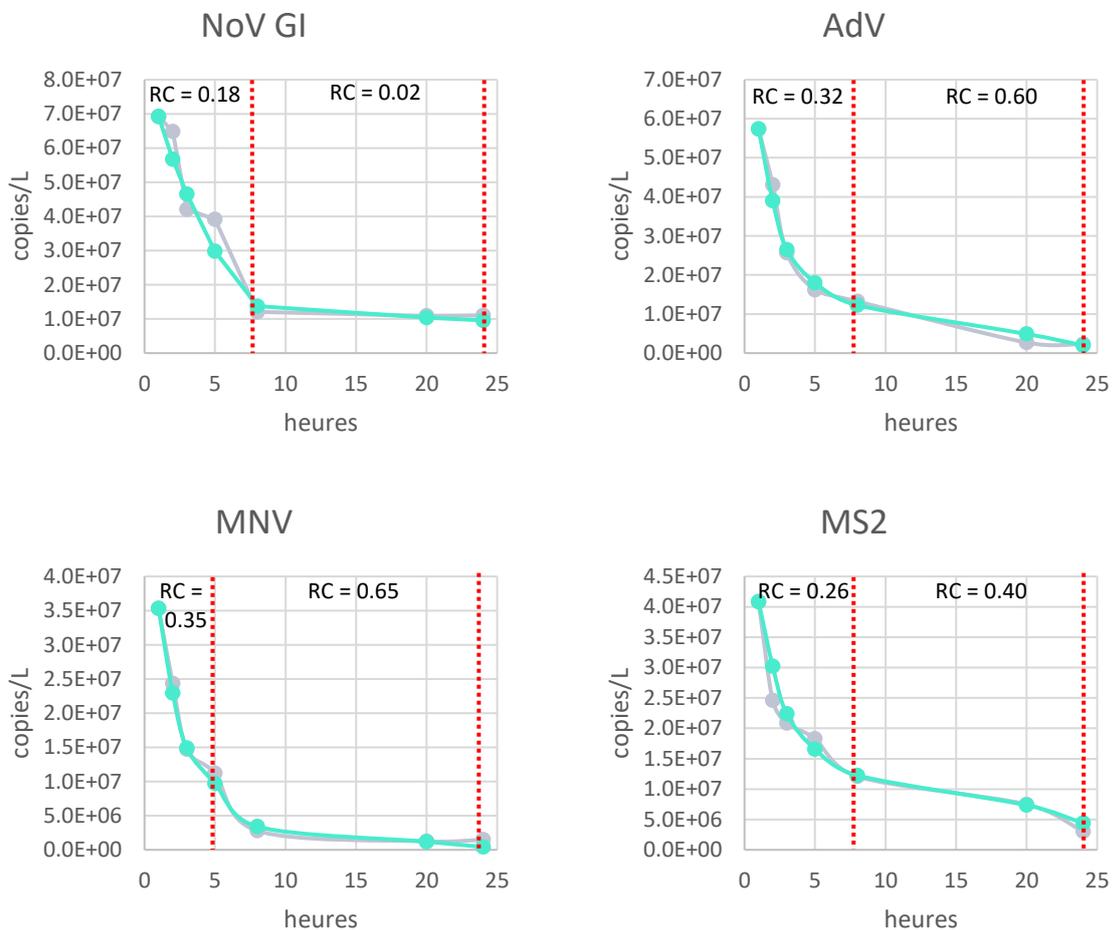


Figure IV-9. Comparaison des valeurs observées de l'évolution des concentrations virales (copies/L) en fonction du temps avec les valeurs calculées et application de deux taux de rétention successifs. Le détail des calculs est donné dans le texte. Ligne grisée : valeurs observées, ligne verte : valeurs calculées. RC = coefficient d'ajustement du modèle. Les périodes pour lesquelles le même coefficient a été appliqué sont délimitées par les lignes pointillées rouge.

Cette expérience aura donc apporté deux informations principales :

- Le fait que l'apport aux réacteurs de nouvelles charges virales (virus autochtone et virus spiké), simultanément à celui de nouvelles ressources trophiques, est suivi de deux périodes caractérisées par des taux d'abattement des charges très contrastés.
- Le fait que la majorité des charges disparaît de l'eau de percolation dans les premières heures (5 à 8 heures) suivant l'apport.

En 1<sup>ère</sup> approche, la cinétique de l'abattement des charges durant la seconde période, incite à attribuer leur contrôle au vecteur biologique (dans le prolongement des remarques faites dans le chapitre IV.2.1). Le rapprochement du constat du caractère tardif de l'intervention des processus biologiques dans l'élimination des virus, et de celui de la chute des capacités filtrantes des réacteurs biologiques à la suite des opérations de détassage, amène à la conclusion que leur efficacité maximale, dans l'abattement des charges virales, devrait être atteinte dans les heures précédant ces opérations.

#### *IV.2.2.2. Relation entre l'abattement des charges virales et le niveau de colmatage des réacteurs.*

Nous avons utilisé ici le fait que les répétitions de l'expérience se sont étendues sur une période de 22 jours. Le remplissage des pilotes est resté le même durant cette période. Ils ont été entretenus par des apports épisodiques d'eau usée fraîchement prélevée à l'UDEP Grand Chambéry et par les apports d'eau usée spikée aux dates pour lesquelles les expériences des suivis sur 24 h étaient menées.

Le niveau de colmatage des biofilms a été évalué à travers la mesure de la vitesse de transit de l'eau de percolation, par la technique d'injection d'un traceur, ici une solution de chlorure de sodium. Les mesures ne pouvaient être faites qu'à la fin des 24h d'expérience en raison des perturbations des biofilms qu'elles pouvaient engendrer. De plus, une vidange des pilotes devait être faite le plus rapidement possible après la mesure. Six valeurs du niveau de colmatage ont ainsi été acquises, en correspondance avec les 6 répétitions de l'expérience.

La première raison pour laquelle le colmatage des bioréacteurs a pu s'accroître (doublement) durant la période d'étude (Figure IV-10) est le développement des biofilms. La seconde a pu être l'accumulation de particules amenées par les eaux usées qui étaient effectivement prélevées en amont des décanteurs lamellaires mais en aval des dispositifs de dessablage, dégrillage et dégraissage. L'accumulation de particules de matières organiques réfractaires à la biodégradation n'est donc pas à exclure.

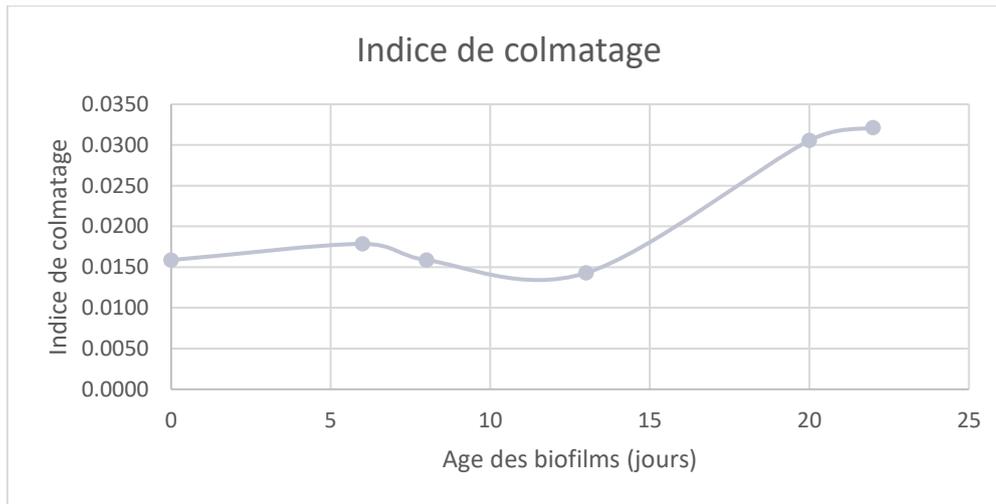


Figure IV-10. Evolution du colmatage du remplissage des pilotes au cours de 6 répétitions de l'expérience. Indice de colmatage = 1/vitesse de percolation.

La confrontation des valeurs d'abattement des charges virales avec le niveau du colmatage (Figure IV-11) montre que ce dernier n'en est pas le facteur déterminant. Le diamètre du volume équivalent des virus en est probablement la raison. Les effets ne sont pas plus manifestes sur les AdV que sur les NoV. Les processus biologiques, de prédation et d'attaque enzymatique pourraient donc être les acteurs principaux des abattements observés, tout comme les phénomènes de physisorption (liaisons de Van der Waals).

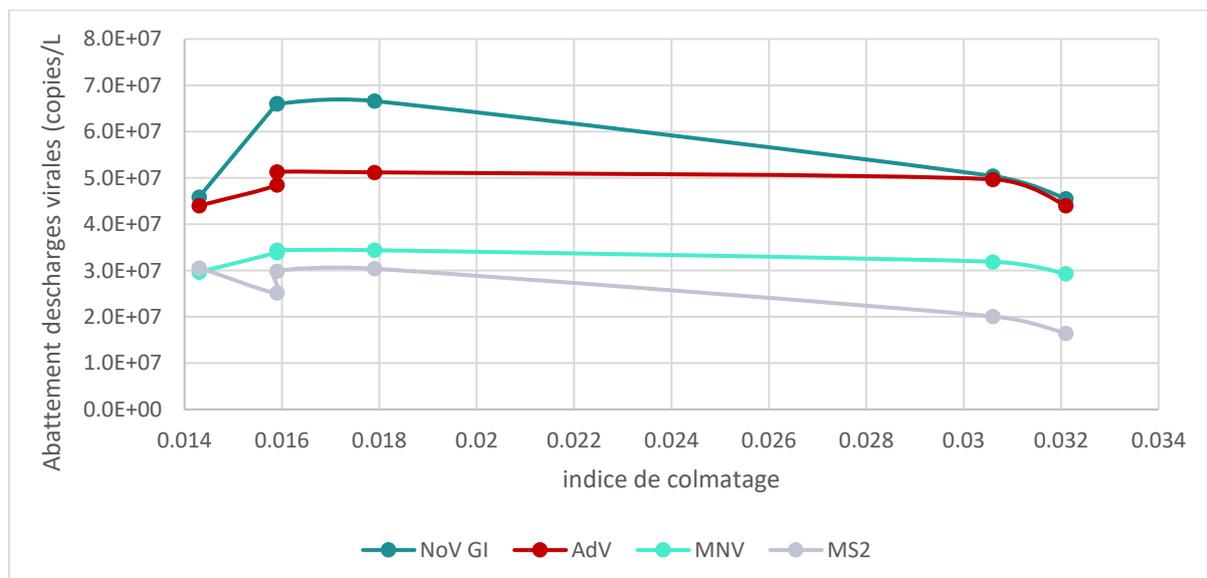


Figure IV-11. Relation entre l'abattement de la concentration des charges virales (copies génome/L) durant les 24h d'expérience et l'indice de colmatage des bioréacteurs.

### IV.2.2.3. Effet à long terme de l'âge des biofilms sur l'évolution de la performance des bioréacteurs dans l'abattement des concentrations virales

Comme dans le chapitre précédent, nous avons utilisé ici le fait que les répétitions de l'expérience se sont étendues sur une période de 22 jours. L'objectif était d'évaluer dans quelle mesure la performance des réacteurs dans l'abattement des charges virales pouvait évoluer avec l'âge des biofilms.

Cette performance, représentée par la chute de la valeur de réduction logarithmique des virus enregistrée au terme de chacun des suivis à court terme (c'est-à-dire à la 24<sup>ème</sup> heure de l'expérience) (Figure IV-12). L'augmentation des valeurs entre J0 et J6 est très certainement due à une période de restructuration des biofilms, après le bouleversement subit lors de la mise en place des pilotes. Cette période n'a donc pas été considérée comme représentative de ce qui pouvait se passer dans la réalité des biofiltres, et, en conséquence, n'a pas été prise en considération dans l'analyse des résultats.

A partir de J6, on observe une diminution d'efficacité de rétention au cours du vieillissement du biofilm pour tous les virus. Cette baisse pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs :

- le vieillissement des biofilms lui-même (dans les conditions dans lesquelles les expériences sur les pilotes ont été conduites) ;
- une diminution de l'activité enzymatique ;
- une diminution globale de l'activité bactérienne (diminution de la sécrétion des exopolymères et donc de la complexification des structures exopolymériques). Ce facteur joue notamment sur la rétention par filtration et sur la baisse de production de nouveaux sites d'accrochage.

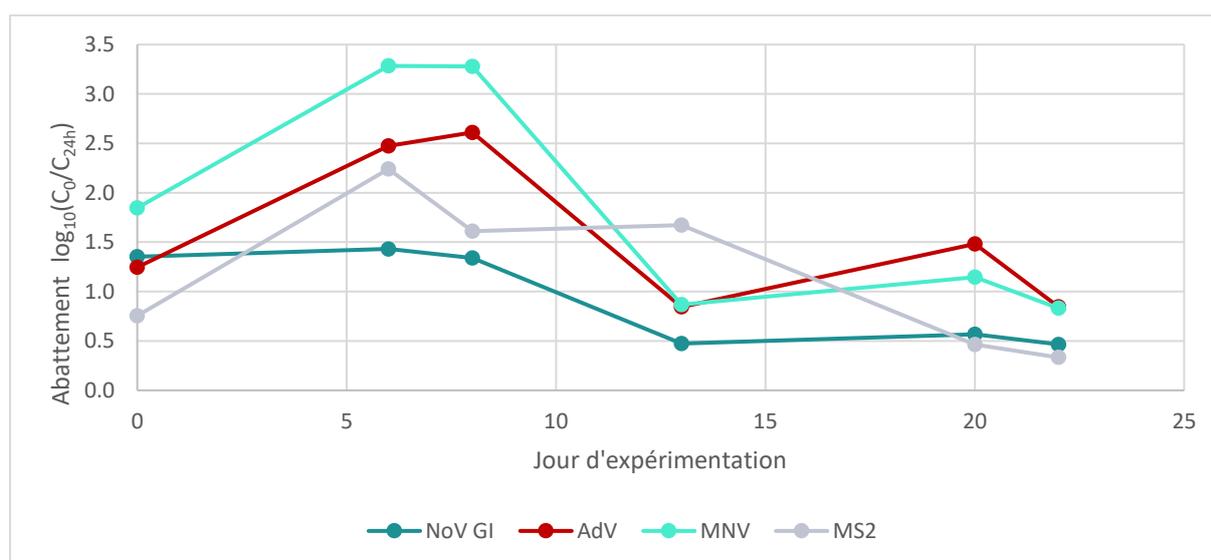


Figure IV-12. Evolution des abattements de charges virales (réduction  $\log_{10}$ ) en fonction de l'âge des biofilms.

#### IV.2.2.4. Evolution des activités enzymatiques

La mesure des activités hydrolasique et phosphatasique dans l'eau circulante durant les 24h d'expérience, vient confirmer la remarque faite plus haut, d'une prédominance des processus biologiques pour leur contribution à l'abattement des charges virales (Figure IV-13).

La simultanéité des taux d'abattement de virus les plus élevés et des valeurs les plus grandes des activités enzymatiques bactériennes semble confirmer le fait que les processus biologiques seraient les principaux acteurs dans l'abattement des charges. Elle laisse supposer également qu'une partie de ces abattements correspond à une dégradation effective des particules virales, en conséquence de ces activités. Elle montre enfin, qu'elles sont activées rapidement dès les premières heures qui suivent un nouvel apport de ressources trophiques (et de virus). Les virus seraient donc à rattacher au lot des nutriments qui sont consommés le plus rapidement par les biofilms, celui des nutriments les plus biodégradables.

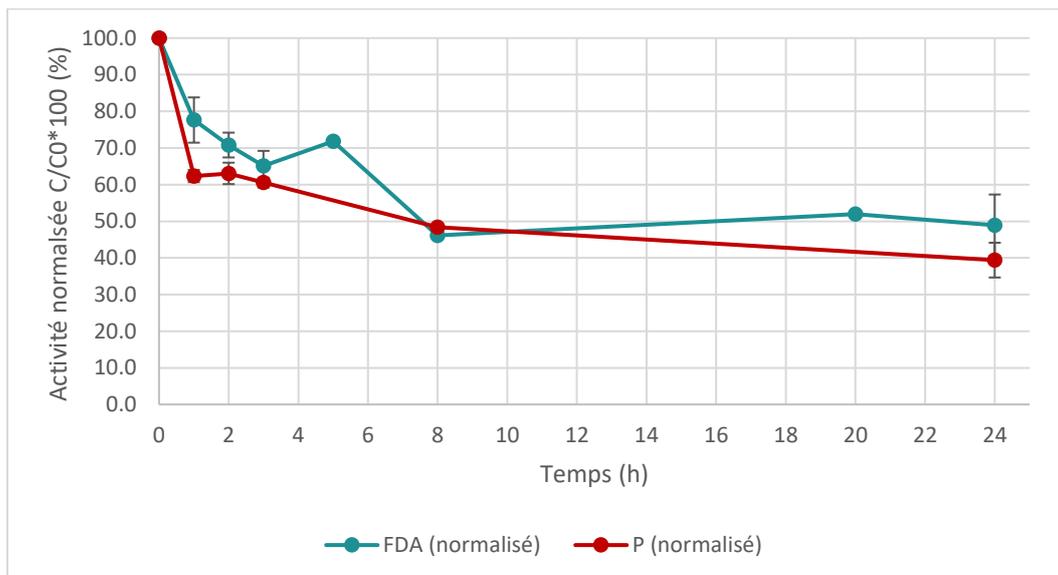


Figure IV-13. Evolution des activités hydrolasique et phosphatasique mesurées dans l'eau circulante durant les 24h d'expérience. Les valeurs sont exprimées en pourcentage par référence aux valeurs mesurées dans l'eau usée spikée avant son introduction dans les réacteurs. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian ( $n=6$ , 3 réplicats par condition).

#### IV.2.2.5. Evolution de l'activité minéralisatrice des biofilms

Les mesures de conductivité réalisées à la fin de chacune des répétitions de l'expérience, ont mis en évidence un accroissement de la minéralisation des eaux de percolation des réacteurs durant la période de 22 j pendant laquelle elles ont été réalisées (Figure IV-14).

Il nous est apparu intéressant de la relater ici, pour les informations qu'elle apporte sur ce qu'a été le fonctionnement des pilotes durant la période d'étude.

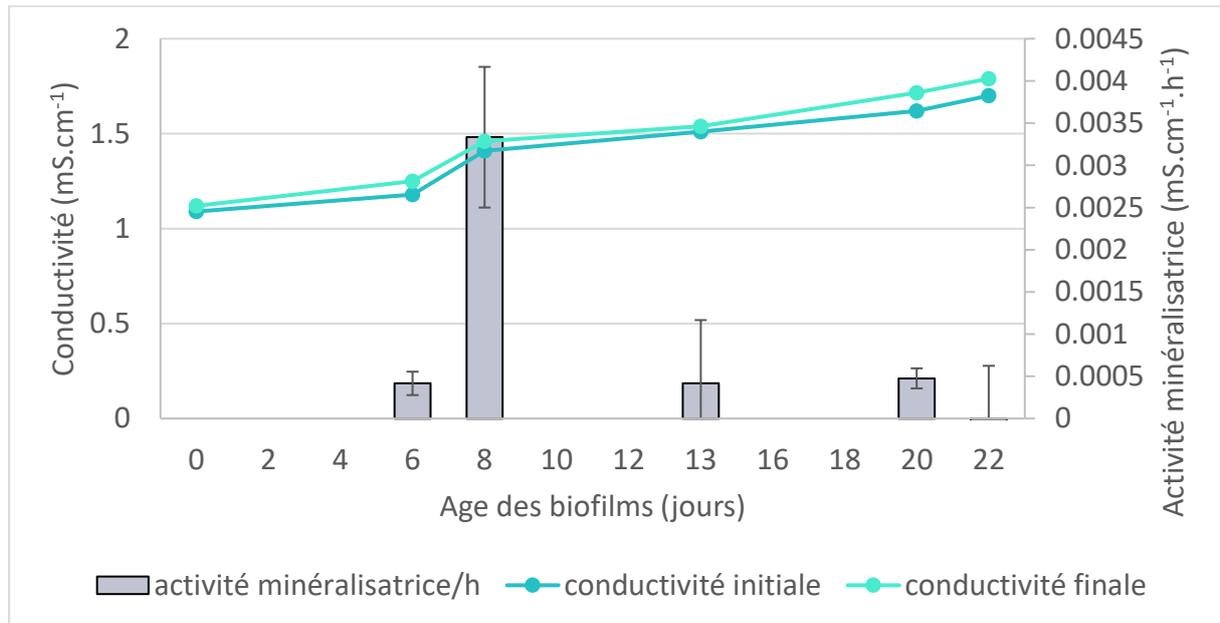


Figure IV-14. Evolution de la minéralisation de l'eau de percolation et des biofilms durant les 22 jours de la répétition de l'expérience. L'activité minéralisatrice est mesurée par la différence des conductivités entre deux expériences :  $Activité\ minéralisatrice = (C_{initiale\ analyse} - C_{finale\ analyse\ précédente}) / (âge\ biofilms\ analyse - âge\ biofilms\ analyse\ précédente) \times 24$ . Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian ( $n=6$ , 3 réplicats par condition).

L'eau de percolation étant remplacée entre chaque répétition de l'expérience, cet accroissement traduit celui de la masse des biofilms présents sur la pouzzolane du remplissage des pilotes et donc de leurs capacités minéralisatrices globales.

En effet, la quantité de sels produite à chaque expérience, correspondait à la minéralisation de la quantité de matières organiques apportée par le remplissage des réacteurs avec de l'eau usées spikée. Si l'on admet que cet apport était à chaque fois du même ordre de grandeur, ainsi que la salinité de l'eau, c'est donc bien la capacité minéralisatrice globale des réacteurs qui était accrue.

La Figure IV-14 fait apparaître une variation particulière de la conductivité entre J6 et J8. Il semble que les apports de matières organiques à J8 soient venus en compléments du résidu

des apports de J6. Le phénomène ne se répète cependant pas dans le cas des expériences J20 et J22 séparées par le même intervalle de temps. Dans les deux cas, l'eau utilisée au jour J+1 était la même que celle utilisée au jour J (conservé à 4°C entre les deux jours). C'est donc la composition chimique des eaux et en particulier la proportion des composés réfractaires de la matière organique qui semble avoir été en cause dans les différences constatées entre ces expériences. Les analyses qui en avaient été faites ne les expliquent cependant pas : le rapport DCO/MES dans l'eau des expériences J20-J22 était de 2.7, alors qu'il était de 2.2 dans celle des expériences J6-J8 (Tableau IV-3). Le rapport DBO/DCO était le même, 0.3, dans les deux cas. Ces différences trouvent par contre leur correspondance dans les mesures d'activité hydrolasique avec un pic marqué à J8 au niveau du saut de la conductivité.

Tableau IV-3. Caractéristiques chimiques et biologiques des eaux usées associées aux mesures à J6-J8 et à J20-J22.

	DCO/MES	DBO/DCO	Activité hydrolasique à H3
<b>J6-J8</b>	2.2	0.3	+46 %
<b>J20-J22</b>	2.7	0.3	+15 %

#### IV.2.2.6. Evolution de l'infektivité du bactériophage

L'effet de la croissance du biofilm sur l'infektivité virale a été étudiée à l'aide du couple bactériophage MS2/bactéries F-spécifiques, en tant que modèle des VEH.

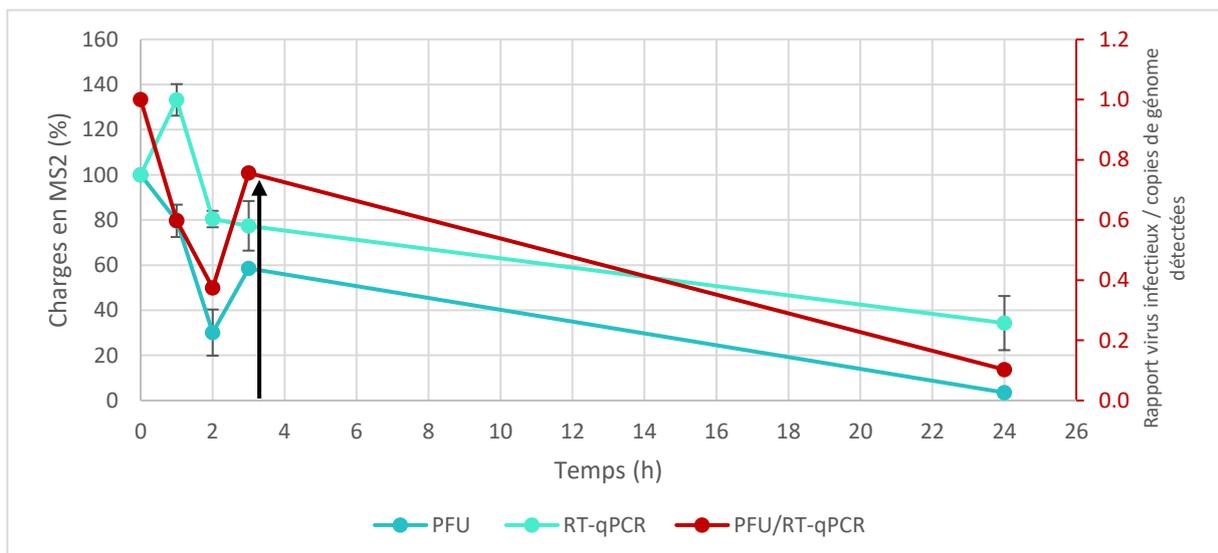


Figure IV-15. Evolution du nombre de copies de génomes de MS2 (RT-qPCR) et de celui de sa forme infectieuse (PFU) au cours des 24h d'expérimentation. La flèche montre une augmentation de la proportion de virus infectieux à H3. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (n=3, 3 réplicats par condition).

Globalement, les résultats montrent une baisse du rapport des virus infectieux aux virus « totaux » (ces derniers mesurés par RT-qPCR) (Figure IV-15.).

L'hypothèse la plus probable est celle d'une dégradation, partielle ou totale, de la capsid du virus, en liaison avec l'activité enzymatique des biofilms. La prédation joue probablement un rôle dans cette disparition, mais également à l'inverse, selon certains auteurs (Verani *et al.* 2016, Atanasova *et al.* 2018), en isolant les virus du milieu extérieur et donc en limitant les interactions avec leurs hôtes, ce qui, à minima, protégerait leurs acides nucléiques d'une dégradation potentielle.

Dans le détail, la Figure IV-15 montre une diminution de la proportion des virus infectieux dans les 2 premières heures de l'expérience, malgré une augmentation des quantités mesurées par RT-qPCR à H1. Les virus hypothétiquement relargués par les biofilms dans la 1<sup>ère</sup> heure de l'expérience (§ IV.2.2.1) seraient donc en grande partie non infectieux.

Elle fait également apparaître une augmentation particulière de la proportion des virus infectieux à H3. Sur la base des travaux de Rappaport (1965), dans lesquels la durée du cycle viral des MS2 est estimée entre 15 et 20 minutes, nous formons l'hypothèse que cette augmentation soudaine de MS2 infectieux correspondrait à un « burst », un relargage massif de virus nouvellement produits à partir des hôtes présents dans les biofilms.

Cependant, comme évoqué précédemment, l'infection des bactéries hôtes par le MS2 requiert la production température-dépendante de pili sexuels. Novotny et Lavin (1971) ont montré que des bactéries F-spécifiques ayant été cultivées à 37°C pouvaient produire de nouveaux pili lorsqu'elles étaient resuspendues dans un milieu à 25°C (probablement par assemblage de sous-unités produites lors de la phase à 37°C, et donc en quantité limitée) mais pas à 20°C. L'hypothèse d'une multiplication des MS2 suggérerait alors que la température dans les biofiltres serait supérieure à 20°C, au moins durant une partie de l'expérience.

Si elle est avérée, cette potentielle production de virus n'aurait alors pas été compensée par les mécanismes de rétention- dégradation à H3. On remarque que ce phénomène ne se produit plus après 3h d'incubation, ou du moins, plus suffisamment pour être détecté. Cela pourrait s'expliquer par l'incapacité des bactéries à produire une quantité suffisante de pili à ces températures non optimales. Cette observation peut également être rapprochée des résultats de quantification moléculaire précédents, dans lesquels on note une nette diminution du taux horaire de réduction du nombre de virus entre les périodes H0-H3 et H3-H8. Après 3h de circulation de l'eau dans les pilotes, il est probable que les bactéries des biofilms commencent à entrer dans un état de veille métabolique, apparenté à celui qu'elles adoptent dans le cadre de leur stratégie d'adaptation aux périodes de déficit trophique (Biselli *et al.* 2020), état dans lequel elles perdent leur compétence vis-à-vis des virus, d'où l'arrêt de la multiplication de MS2.

### IV.2.3. Conclusions

Les expériences décrites précédemment avaient pour objectif de mettre en évidence les effets d'un traitement d'eau usée par biofiltration, ici à l'échelle de pilotes de laboratoire, sur l'abattement des charges virales.

Les principaux résultats des deux expériences qui ont été conduites peuvent être résumés comme suit :

- La diminution de la concentration des charges virales de l'eau de percolation des réacteurs est effective aux deux échelles de temps auxquelles elles ont été observées échelle horaire sur 24h et échelle journalière sur une période de 9 jours.
- Pour deux des virus étudiés, NoV GI et MNV, l'efficacité des réacteurs augmente avec l'âge de leurs biofilms, là encore à l'échelle des 9 jours durant lesquels les analyses ont été conduites. Dans le cas des adénovirus, cette efficacité ne subit pas de changement significatif durant la même période.
- Au terme d'une période d'observation plus longue (22 jours), c'est une baisse de l'efficacité des biofilms qui est observée plus marquée pour NoV GI et MS2 que pour AdV et MNV.
- Les discordances observées à plusieurs reprises entre les évolutions des deux virus autochtones (NoV GI et AdV), font soupçonner l'existence de spécificités dans les mécanismes de rétention des norovirus.
- Les apports aux réacteurs de nouvelles charges virales (virus autochtone et virus spiké), simultanément à celui de nouvelles ressources trophiques, sont rapidement pris en charge par les biofilms (dans le 5 à 8 premières heures).
- Les mesures directes des activités hydrolasique et phosphatasique ont apporté confirmation aux deux remarques précédentes.
- Les processus d'abattement de charges virales sont accompagnés d'une diminution de la proportion des formes infectieuses du bactériophage MS2.

### IV.3. Contribution de certains des mécanismes impliqués dans l'abattement des charges en VEH

Après avoir étudié l'effet global des biofiltres sur la rétention des virus autochtones ou spikés dans les eaux usées, nous nous sommes intéressés plus en détail à l'importance des mécanismes physiques, chimiques et biologiques dans l'évolution des caractéristiques de la charge en VEH de l'eau de percolation.

Les pilotes de laboratoire développés et utilisés dans la première partie de ce chapitre ne nous permettant pas d'isoler ces facteurs pour en évaluer l'incidence, la suite des expérimentations a été réalisée en batch.

Dans cette partie, nous traitons des sujets suivants :

- Essai de mise en évidence, hors du contexte des biofiltres, de la contribution du vecteur biologique à la rétention des VEH
- Comparaison d'un support inerte (pouzzolane calcinée) et d'un support chargé de matières organiques (pouzzolane colonisée par des biofilms) du point de vue de leurs capacités de rétention des virus
- Influence de l'enrobage de pouzzolane calcinée par des matières organiques sur la rétention des virus
- Rétention sur sites spécifiques : récepteurs HBGA-like pour les Norovirus humains.
- Rétention par prédation, avec l'exemple de l'ingestion par les oligochètes *Tubifex tubifex*

#### IV.3.1. Essai de mise en évidence, hors du contexte des biofiltres, de la contribution du vecteur biologique à la rétention des VEH

L'expérience avait pour but de mettre en évidence le rôle du vecteur biologique dans la rétention des virus :

- en l'isolant du contexte du remplissage des pilotes, où elle est en concurrence avec les processus physiques, tels que la filtration,
- par la comparaison d'une période pendant laquelle les activités biologiques des biofilms étaient défavorisées (basse température et faible disponibilité de ressources trophiques) avec une période durant laquelle la température était plus grande et où un apport de nutriments avait été fait (Figure IV-16).

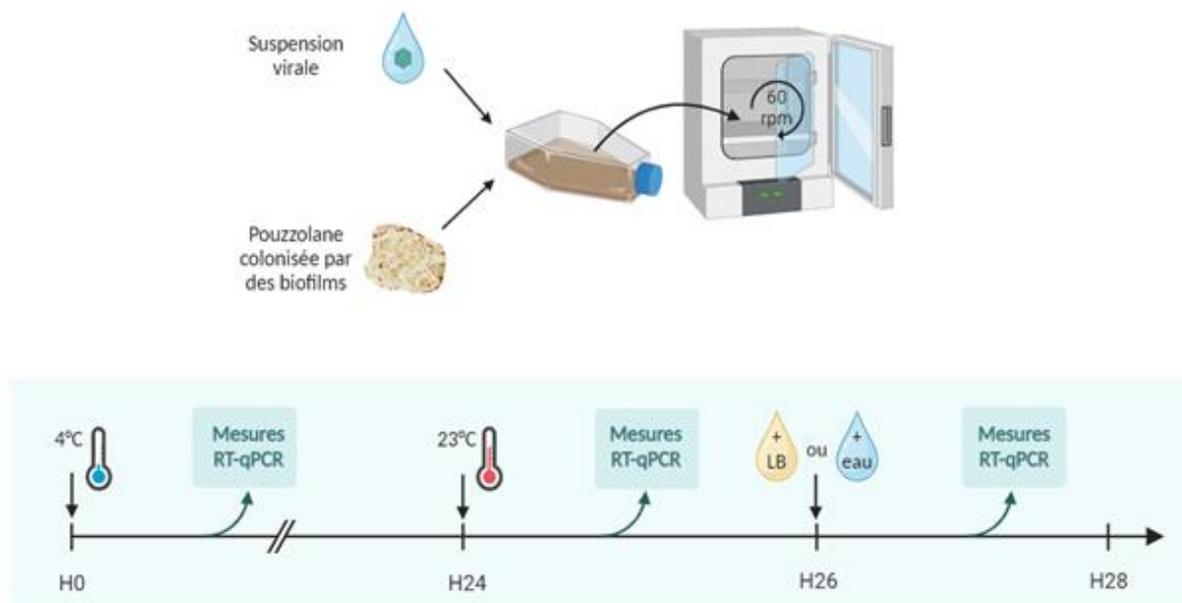


Figure IV-16. Protocole expérimental de l'expérience. Des grains de pouzzolane colonisés par des biofilms extraits des biofiltres pilotes étaient mis en contact avec une suspension de MNV dans un flacon de culture sous agitation.

Les résultats (Figure IV-17) font apparaître une cinétique importante de la rétention des virus dans les premières heures de l'expérience, similaire à celle observée dans les pilotes (environ  $96 \pm 4\%$  de virus retenus dans les pilotes en 24h contre  $75 \pm 1\%$  ici).

Si le vecteur biologique est effectivement défavorisé dans la première partie de l'expérience, la diminution des charges virales des premières heures serait due à des processus physico-chimiques. Il pourrait s'agir d'adsorption sur des supports organiques ou inorganiques, voire de fixations plus spécifiques sur :

- la pouzzolane au niveau des surfaces non recouvertes par les biofilms
- certaines des composantes exo-polymériques des biofilms
- des molécules de la famille des HistoBlood Group Antigen (HBGA), dont certains membres sont connus pour reconnaître les NoV et dont la présence a été montrée chez des bactéries entériques et dans l'environnement (Miura et al. 2013, Li et al. 2015). Nos essais à ce sujet sont présentés dans le chapitre IV.3.5.2.

Après 5h d'expérience, les quantités de MNV présentes dans les eaux ne semblent plus évoluer. Les quantités de virus "disparus" se stabilisent à  $71 \pm 4 \%$  entre H5 et H24 (page « 2 »).

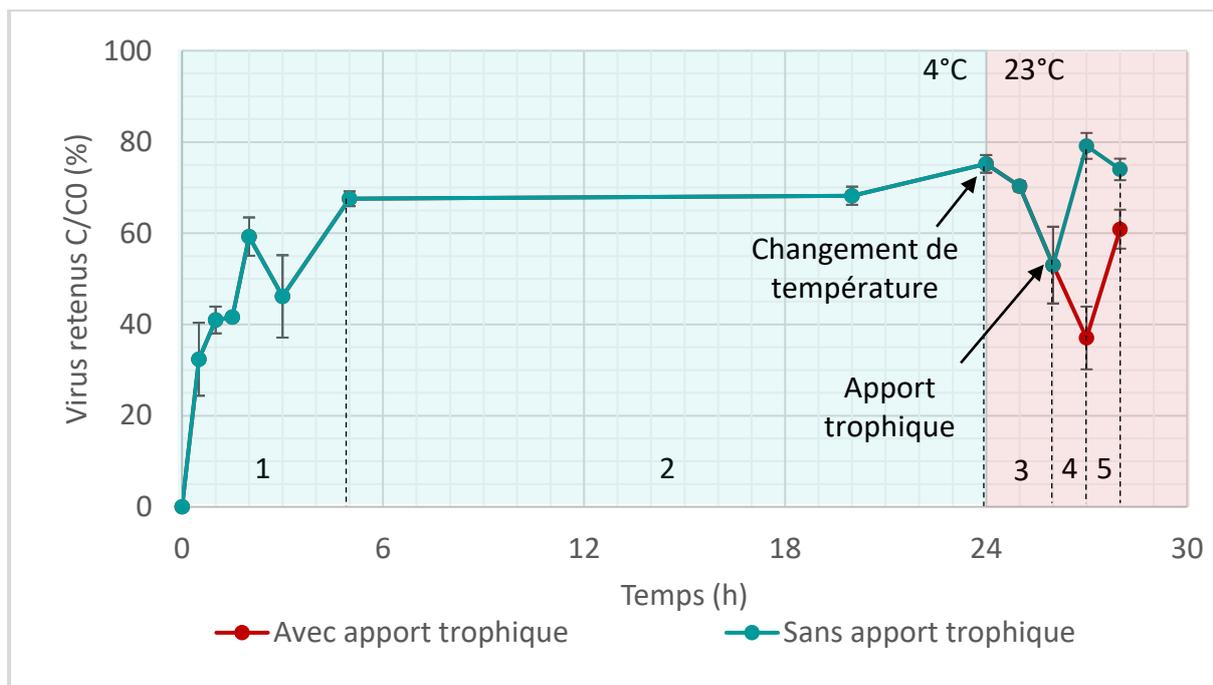


Figure IV-17. Evolution de la rétention de MNV avec le temps d'incubation à 4°C (plage bleue) et à 23°C (plage rouge). A partir de H26, deux expériences sont faites en parallèle : la courbe rouge est celle des virus retenus après ajout d'une solution nutritive (Lysogeny Broth) dans le milieu, la courbe bleue est celle des virus retenus après ajout d'eau stérile. Les valeurs sont données en pourcentages par référence à la concentration de MNV dans la suspension mise en présence des grains de pouzzolane en début d'expérience. Les plages numérotées de 1 à 5 correspondent à des changements de tendance dans l'allure des courbes. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Après 24h d'incubation, la température a été augmentée pour atteindre 23°C. Ce changement a eu pour effet d'accroître de +5% la concentration de virus retrouvés dans l'eau, entre H24 et H25 ce qui, sur la Figure IV-17, se traduit par une baisse de la valeur des virus retenus (plage 3 sur la figure). Les MNV n'ayant pas, dans ces matrices, d'hôtes à partir desquels ils pourraient se multiplier, le phénomène peut être expliqué par une réactivation de la bioturbation, (liée aux organismes mobiles des biofilms tels que les ciliés, les flagellés et même des oligochètes), induite par l'augmentation de température. Deux heures après son changement (H26), on note une diminution de la concentration des virus dans l'eau, donc une reprise des mécanismes de rétention des virus, pour atteindre des valeurs proches de celles mesurées à H24 ( $74 \pm 1\%$  de virus disparus à H28). La prédation et/ou la fixation des virus sur des surfaces nouvellement « ouvertes » pourraient en être la cause (plage 5 sur la figure).

L'impact d'un apport nutritif à H26 sur la rétention des virus, se traduit par une augmentation plus marquée du relargage de MNV évoqué précédemment que dans le cas

où l'apport n'a pas été fait (4). Il est suivi d'une nouvelle diminution de la concentration des virus dans l'eau (5). L'apport trophique pourrait avoir amplifié les phénomènes de bioturbation et leurs conséquences. Il est possible également que l'effet tensioactif qui accompagne parfois les apports de matières organiques dissoutes (Schilling et Zessner, 2011) ait participé à ce relargage. La diminution des charges virales qui apparaît au niveau du dernier point du suivi, à H28, pourrait être attribué, comme dans le cas où l'apport trophique n'a pas été fait, à une accélération des processus de prédation.

Transposés au contexte des installations de traitement des eaux usées en vraie grandeur, ces résultats pourraient laisser supposer que l'abattement viral serait plus important dans les périodes où l'eau est froide. Notre expérience, réalisée uniquement à 4°C, ne permet pas d'aller plus loin dans cette supposition. Elle devrait être répétée en considérant une gamme de température plus large, et en tenant compte du fait que la température de l'eau à la sortie de l'UDEP Grand Chambéry n'est pas descendue en dessous de 11°C durant l'hiver 2022-2023 (chapitre II).

Cette expérience a également montré que le relargage de virus qui avaient été préalablement retenus dans les biofilms, peut se produire. Dans notre cas, le facteur déclenchant a été le brusque changement de température, qui ne devrait pas avoir son équivalent dans les conditions des STEPs en vraie grandeur. Par contre, si notre hypothèse que des phénomènes aussi ténus que la bioturbation participe à des relargages, était vérifiée il serait intéressant de chercher leur existence aux points du trajet des eaux traitées au niveau desquels les biofilms subissent des perturbations hydrodynamiques, notamment.

#### IV.3.2. Effet de l'enrobage de la pouzzolane par des biofilms sur la rétention des charges virales

Dans cette partie du travail, nous nous sommes intéressés au détail de la rétention des virus sur le système pouzzolane – biofilms, en cherchant à évaluer la participation de chacune de ces composantes. Pour ce faire, une étude comparative d'adsorption de MNV et de MS2 a été conduite sur pouzzolane calcinée et pouzzolane colonisée par des biofilms (Figure IV-18), à 4°C et à 23°C.



Figure IV-18. Pouzzolane colonisée par des biofilms (A), pouzzolane calcinée (B). Observation à la loupe binoculaire (X10)

Le choix a été fait de travailler avec ces deux virus pour leurs différences en termes de protéines de surface, et donc, potentiellement, pour celles des mécanismes par lesquels ils peuvent être retenus à la surface des matériaux.

Dans cette expérience, l'analyse des virus par RT-qPCR a été complétée par celle, globale, de l'ensemble des procaryotes, elle aussi par une technique moléculaire. L'expérience a été réalisée selon le protocole décrit dans la Figure IV-19.

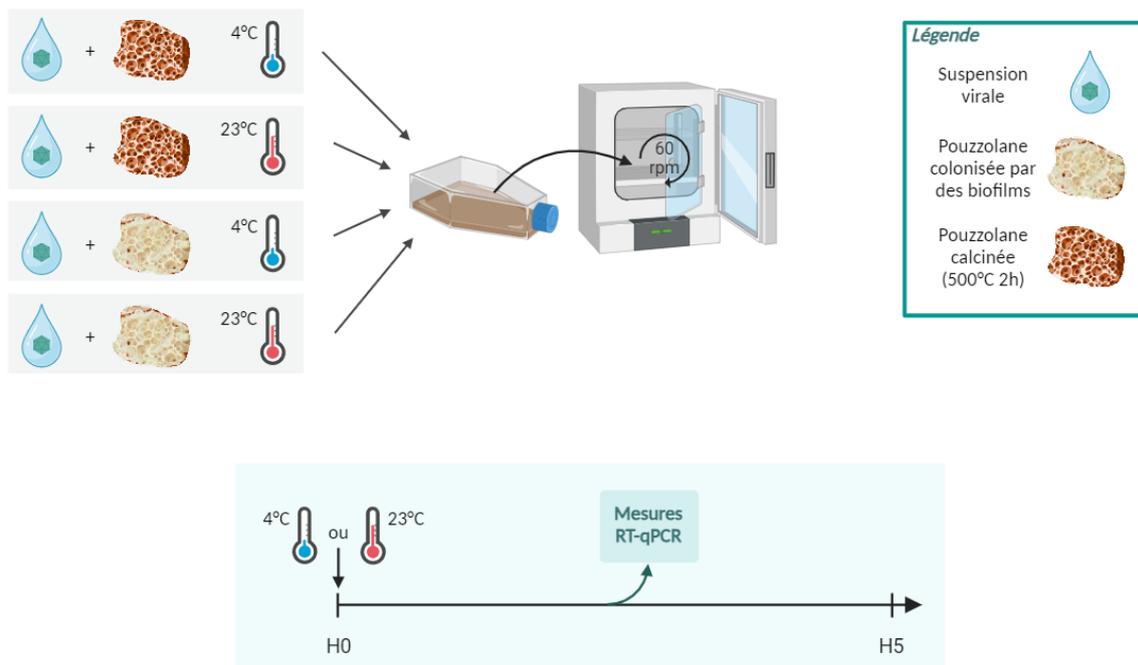


Figure IV-19. Protocole expérimental de la comparaison des capacités de rétention des virus de la pouzzolane calcinée et de la pouzzolane colonisée par des biofilms.

#### IV.3.2.1. Rétention sur pouzzolane calcinée

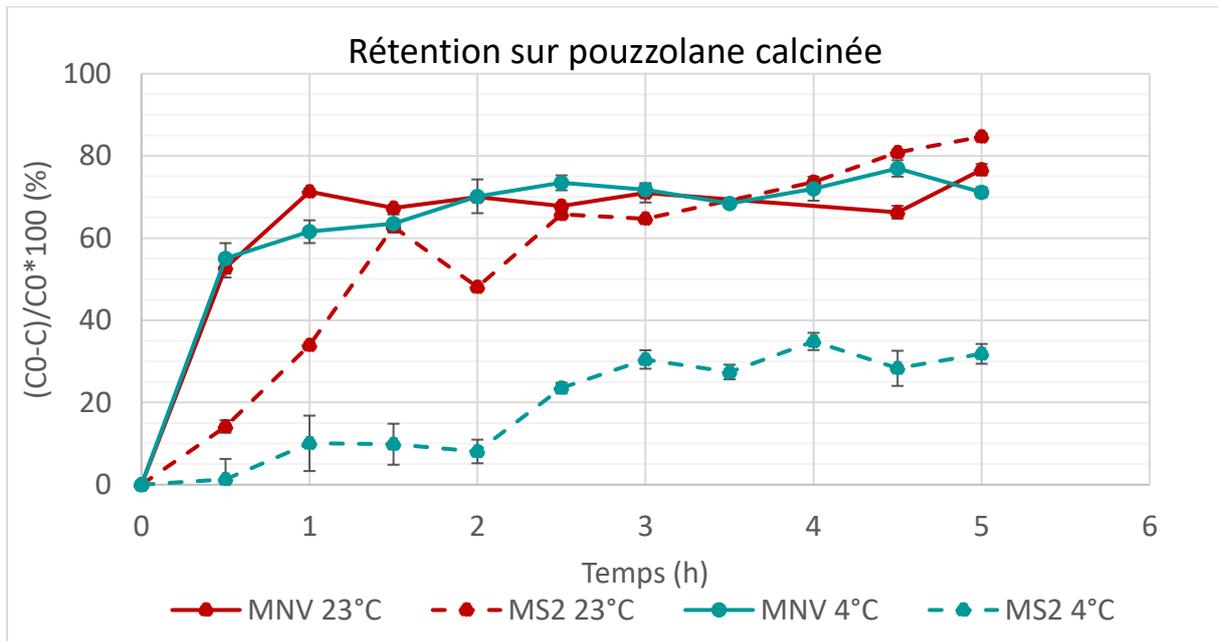


Figure IV-20. Comparaison de la rétention de MNV et MS2 sur de la pouzzolane calcinée, dans deux conditions de température. Les valeurs sont exprimées en pourcentages par référence à la concentration des suspensions virales mises en contact avec la pouzzolane en début d'expérience. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Les résultats font apparaître une différence marquée entre les virus quant aux effets de la température (Figure IV-20). La vitesse de rétention des MS2 est significativement plus grande à 23°C qu'à 4°C et au terme des 5h d'incubation,  $85 \pm 1$  % des virus ont été retenus à 23°C, contre  $32 \pm 3$  % dans le cas de l'incubation à 4°C.

En augmentant la probabilité de rencontre entre virus et matériau, l'agitation moléculaire, plus grande à 23°C qu'à 4°C, pourrait seule, expliquer ces différences, puisque dans les conditions de l'expérience (pouzzolane calcinée), le vecteur biologique n'intervient pas. Elle devrait cependant, être un facteur d'explication commun aux deux virus, ce qui n'est pas le cas.

L'hypothèse peut alors être envisagée que les différences observées soient dues aux spécificités des protéines de surface des capsides des deux virus. Il pourrait s'agir de la protéine VP1 (plus particulièrement le domaine P) pour le MNV, ou de la protéine de maturation (protéine A) pour le MS2. Les différences de charges électrostatiques de surface et de degré d'hydrophobicité de ces virus pourraient également être mises en cause (Michen et Graule 2010).

De ces spécificités pourraient résulter :

- des affinités particulières pour les supports minéraux du type de la pouzzolane, dans le cas de MNV et, peut-être, par extension, d'autres norovirus,
- une plus grande "sensibilité" des structures de surface aux conditions thermiques, dans le cas du bactériophage, qui pourrait se traduire par l'érection de sites d'accrochage avec l'augmentation de la température de l'eau, par exemple.

#### IV.3.2.2. Rétention sur pouzzolane colonisée

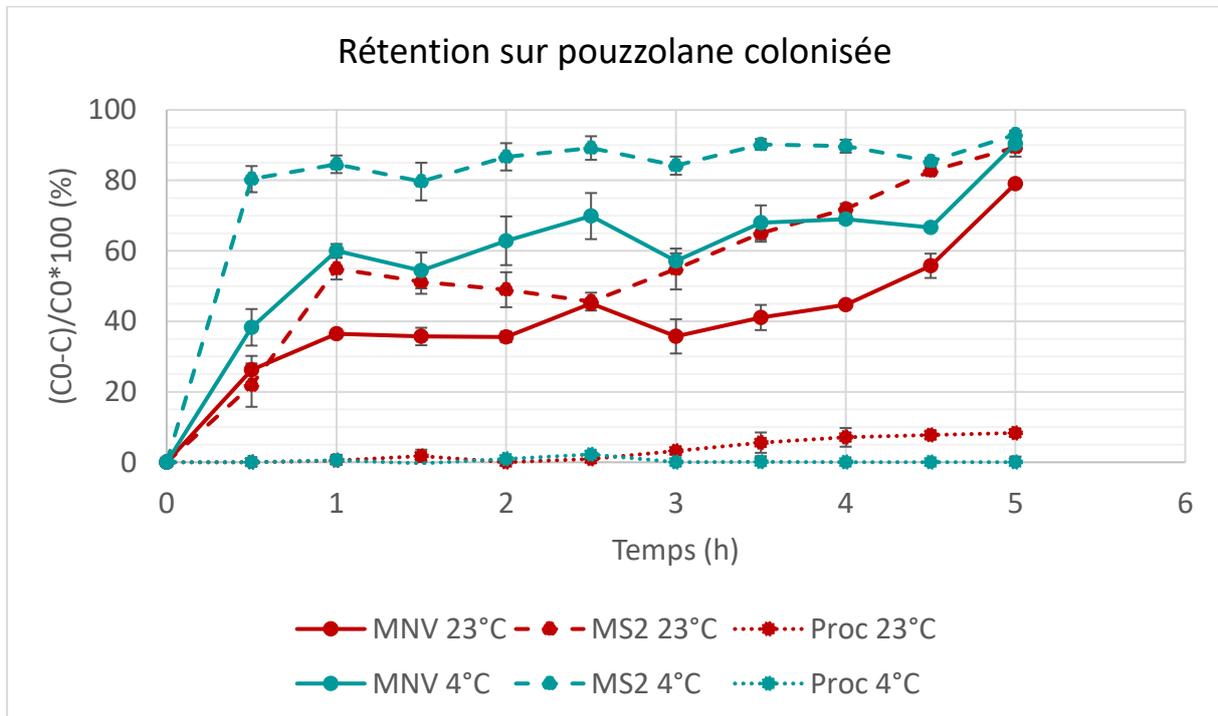


Figure IV-21. Comparaison de la rétention des MNV et MS2 sur de la pouzzolane colonisée par des biofilms, dans deux conditions de température. Les valeurs sont exprimées en pourcentages par référence à la concentration des suspensions virales mises en contact avec la pouzzolane en début d'expérience ( $H_0 < 1$  min de contact). Proc = procaryotes. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (9 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

La Figure IV-21 montre que les cinétiques de rétention suivent globalement le même type d'évolution, quel que soit le virus et la température d'incubation. Les différences se situent dans les niveaux de rétention auxquels les valeurs se stabilisent, toutes après une heure d'incubation.

Les rétentions des deux virus sont plus grandes à 4°C qu'à 23°C. Dans le cas de MS2, les résultats sont donc opposés à ceux obtenus avec la pouzzolane calcinée. Pour autant, notre hypothèse à propos des modifications que pourrait subir les structures de surface du virus (protéines) en fonction de la température, n'est peut-être pas à écarter. Nous avons supposé en effet, que ces modifications pouvaient donner à ces structures, une "compétence" vis à vis de l'accrochage des virus, qui se traduirait par l'augmentation de la rétention "passive" des virus lorsque la température augmente.

Les résultats concernant les MNV, montrent qu'ils sont globalement moins bien retenus sur la pouzzolane colonisée qu'ils ne l'étaient sur la pouzzolane calcinée. Ce constat va dans le sens de l'hypothèse que nous faisons précédemment à propos d'une affinité particulière de ces virus pour le support minéral pouzzolane, puisque dans cet essai, elle est en grande partie masquée par les biofilms.

#### IV.3.3. Effet de l'enrobage de la pouzzolane par de la matière organique (fraction < 1.2µm) sur la cinétique de rétention des virus

Les abattements de charges virales observés dans l'expérience précédente, étaient le résultat de mécanismes multiples issus d'un environnement complexe associant un support minéral enrobé de biofilms représentant toutes les formes de matière organiques : dissoutes, particulaire, inerte et vivante.

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes qui en sont responsables nous avons cherché à les explorer dans le cadre d'un modèle réduit 1) à l'échelle physique des deux principaux composants de l'unité fonctionnelle des biofiltres : le couple formé par un support minéral (pouzzolane) et son enrobage de matières organiques et 2) à l'échelle temporelle des 1<sup>ères</sup> heures de leur mise en contact.

Il était difficile de reproduire expérimentalement les niveaux de colonisation dans lesquels se trouve la pouzzolane en amont et en aval d'un cycle de lavage dans les biofiltres en vraie grandeur. Les granules ne sont d'ailleurs pas affectés de façon homogène par l'opération, dans l'ensemble du volume des réacteurs. Notre approche pour l'étude de ses conséquences a été d'estimer en quoi la matière organique associée à la pouzzolane contribue à la capacité de rétention des virus.

Quatre niveaux de charge organique de la pouzzolane ont ainsi été comparés : le niveau zéro c'est-à-dire de granules exemptes de matière organique (pouzzolane calcinée) et celui atteint par des granules préalablement exposés, pour différentes durées, à la fraction dissoute (<1.2µm) de la matière organique d'une eau usée. Les tests ont porté sur deux types de virus, norovirus murins et bactériophage MS2. Le détail du mode opératoire a été donné dans le chapitre Matériel et méthodes.

Dans une 1<sup>ère</sup> étape des grains de pouzzolane, préalablement calcinés, ont été conditionnés par immersion dans différents filtrats d'eau usée (Figure IV-22). Dans une 2<sup>ème</sup> étape, ils étaient mis en contact avec des suspensions de MNV ou de MS2.

Les résultats sont donnés par le rapport  $C/C_0$  entre la concentration des virus de l'eau libre en fin d'expérience et sa concentration au moment où elle a été mise en contact avec la pouzzolane. Ils étaient donc susceptibles de varier avec la durée pendant laquelle la pouzzolane a été mise en présence avec le filtrat d'eau usée ("incub m.o."), mais aussi avec le temps durant lequel la suspension virale a été mise en contact avec le matériau ("incub virus"). Dans les analyses qui suivent, ces deux descripteurs et la porosité des membranes à partir desquelles les filtrats d'eau usée ont été préparés (0.45 $\mu$ m et 1.2 $\mu$ m) constituent les trois variables explicatives de la variable "rétention virus".

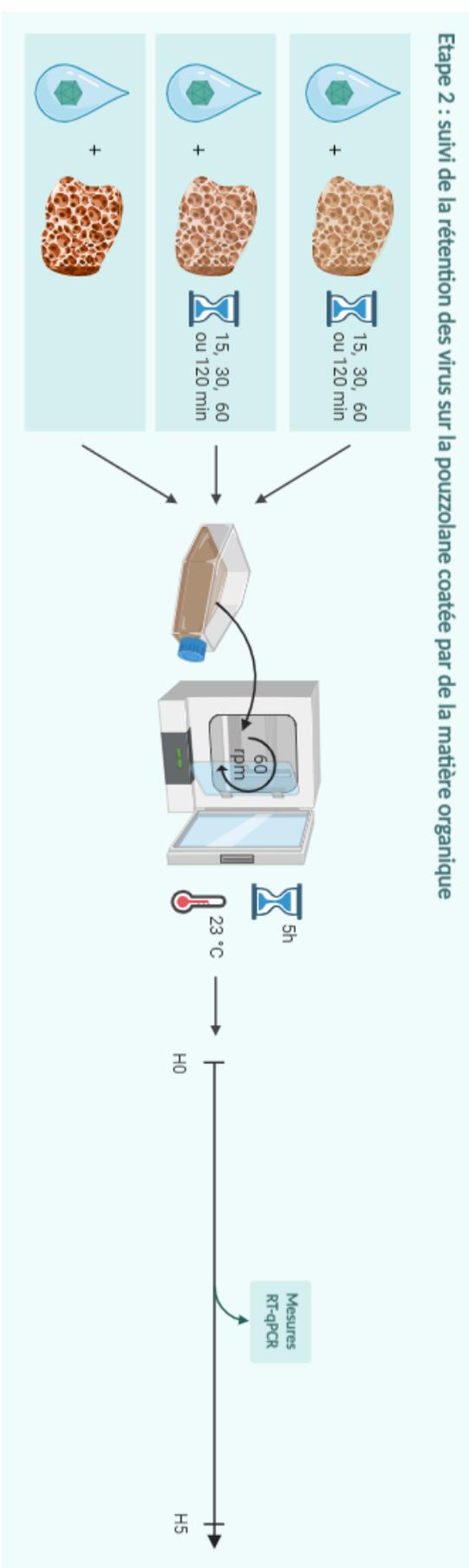
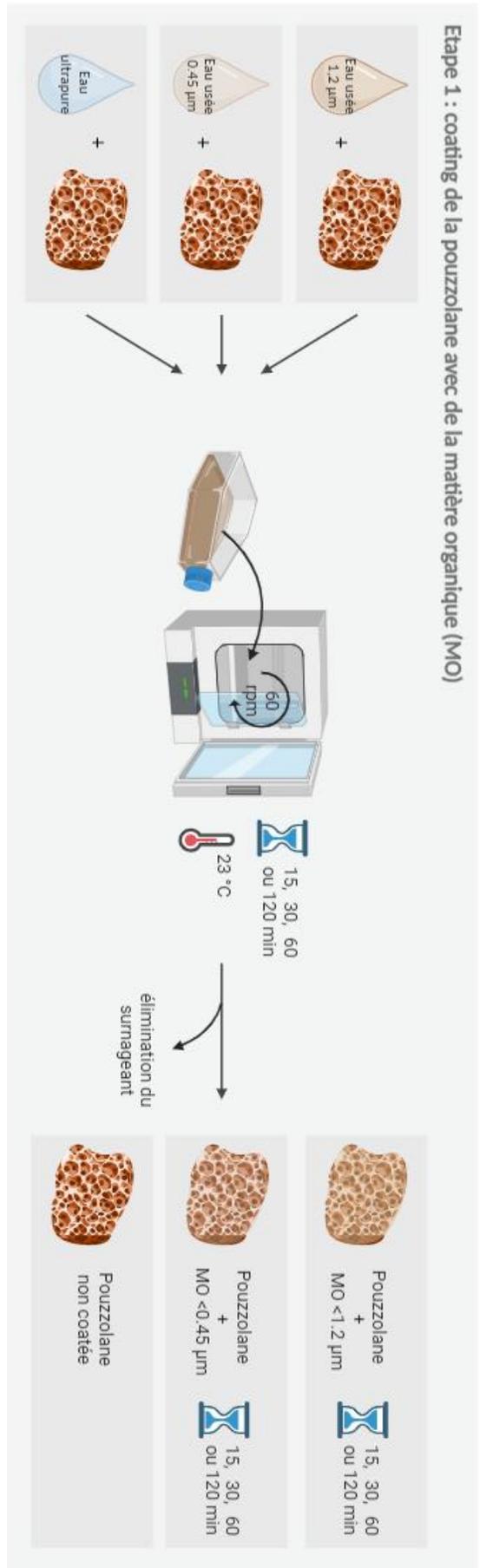


Figure IV-22. Protocole expérimental pour l'évaluation de l'effet de la matière organique dissoute sur la rétention des virus.

### IV.3.3.1. Essais réalisés avec le norovirus murin (MNV)

La Figure IV-23 montre que le principal effet sur le pourcentage de virus retenus est celui de l'incubation virus (temps de contact de la suspension virale avec la pouzzolane), puis de l'incubation m.o. (temps de contact de la pouzzolane avec l'eau usée filtrée). L'effet de la filtration considéré à travers ses deux modalités (porosité des filtres) apparaît être mineur.

Ces observations sont confirmées dans le détail apporté par la Figure IV-24 où sont portées toutes les valeurs de l'évolution du pourcentage de virus retenus (rapport  $C/C_0$ ), au croisement de chacune des variables explicatives. En complément de la figure précédente, cette représentation fait apparaître une forte interaction entre l'incubation virus et l'incubation m.o. (Figure IV-24, cadre rouge), à l'inverse de la filtration qui, pour les deux modalités testées (0.45 $\mu$ m et 1.2 $\mu$ m), semble avoir peu d'effet sur les deux autres facteurs.

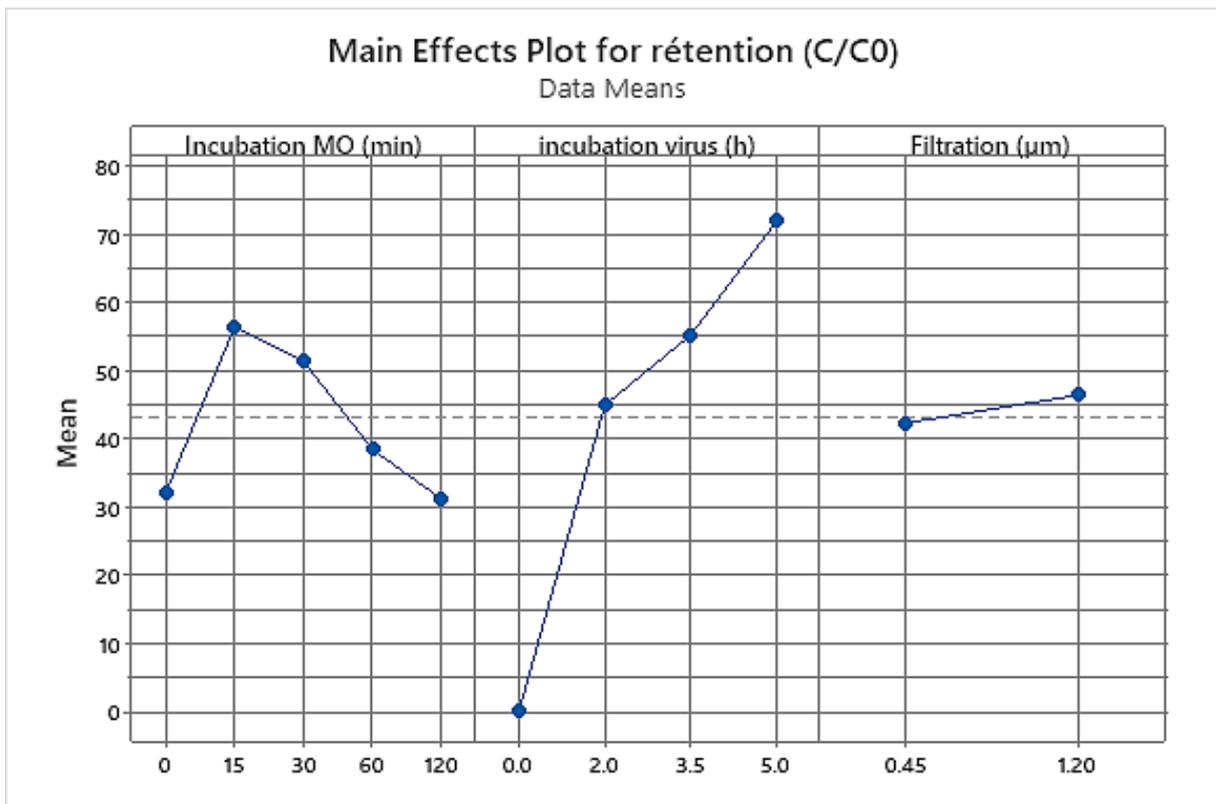


Figure IV-23. Variation de la moyenne du pourcentage de virus retenus (MNv) dans le cadre de chacune des variables explicatives. La ligne pointillée (ligne de référence) marque la moyenne générale, toutes valeurs des variables explicatives confondues.

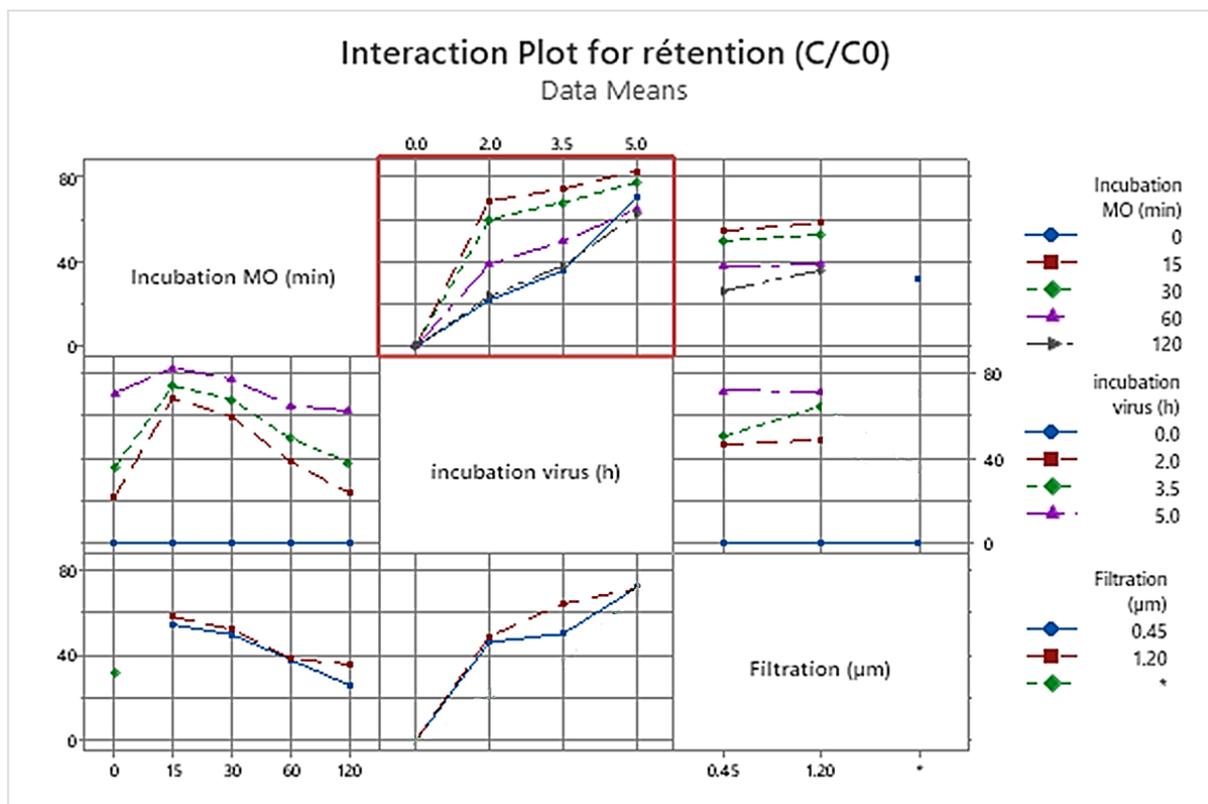


Figure IV-24. Matrice des interactions entre les variables explicatives (incubation m.o., incubation virus, filtration) dans la détermination du pourcentage de virus retenus.

Dans ce qui suit, nous avons souhaité compléter l'analyse graphique des résultats, par une ACP (analyse en composantes principales) afin de mettre en évidence la proximité des variables explicatives à travers leurs contributions aux axes principaux par lesquels la matrice de corrélation, extraite de la matrice des données pouvait être définie. Les valeurs de rétention de MS2 ont été jointes à la matrice.

Les résultats des tests de normalité (Ryan-Joiner) des valeurs de rétention de chacun des deux virus sont donnés dans la Figure IV-25 et la Figure IV-26.

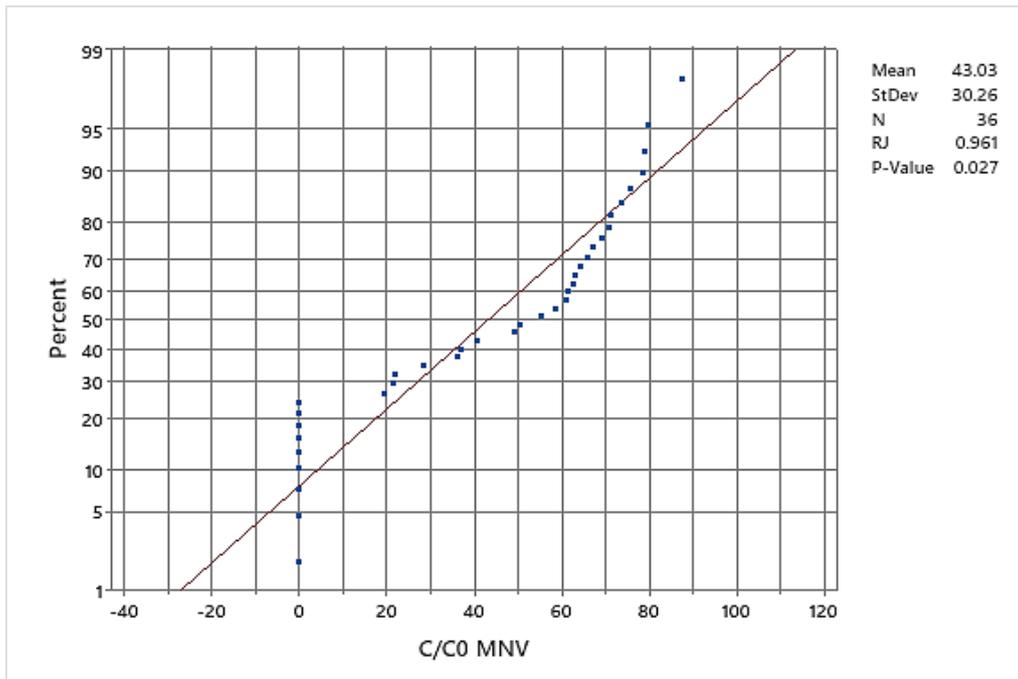


Figure IV-25. Test de normalité de la variable rétention MNV.

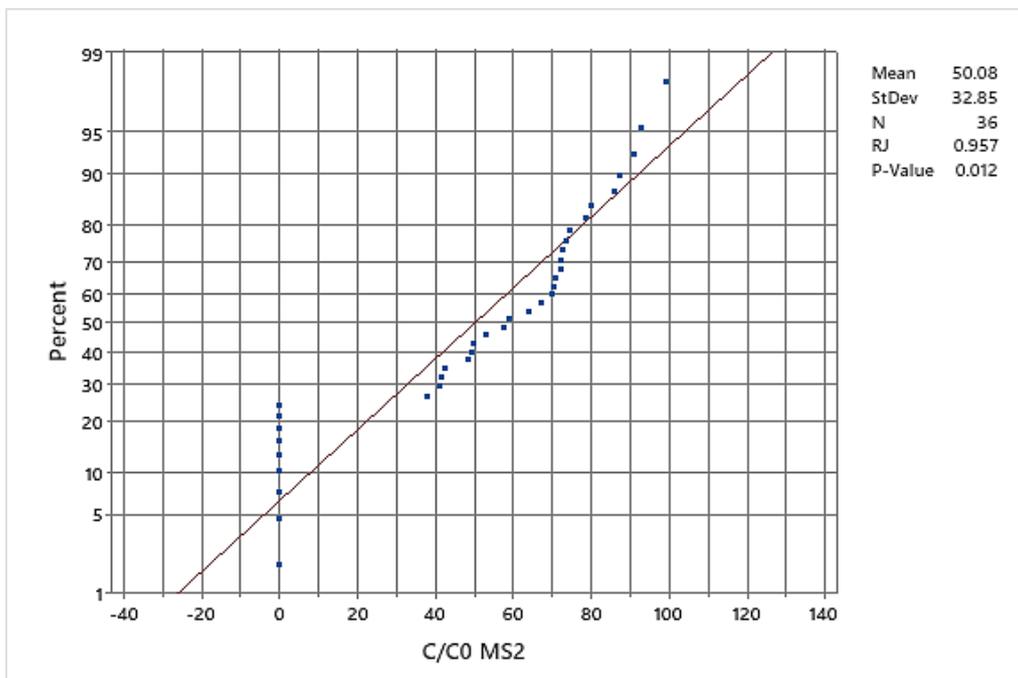


Figure IV-26. Test de normalité de la variable rétention MS2.

Le 1<sup>er</sup> axe explique près de 60 % de la variance et avec les deux suivants, la valeur atteint plus de 97 % de la variance (Tableau IV-4).

Tableau IV-4. Représentativité des axes définis par l'ACP

<b>Eigenvalue</b>	2.8741	1.0091	1.0000	0.0978	0.0190
<b>Proportion</b>	0.575	0.202	0.200	0.020	0.004
<b>Cumulative</b>	0.575	0.777	0.977	0.996	1.000

Le 1<sup>er</sup> axe est celui de la rétention des MNV, de celle des MS2 et de l'incubation virus (Tableau IV-5). Le second axe est essentiellement défini par la filtration et partiellement par l'incubation m.o. avec un coefficient négatif. L'axe 3 est défini par l'incubation m.o et par la filtration.

Tableau IV-5. Représentations des variables sur les trois premiers axes de l'analyse.

<b>Variable</b>	PC1	PC2	PC3
<b>C/CO MNV</b>	0.581	0.068	-0.000
<b>C/CO MS2</b>	0.581	-0.068	0.000
<b>Incub MO</b>	-0.175	-0.556	0.770
<b>incub virus</b>	0.542	-0.192	0.239
<b>Filtration (µm)</b>	0.009	0.803	0.591

La représentation des variables dans le plan factoriel 1-2 (Figure IV-27) montre clairement la proximité des rétentions des deux virus, entre elles et avec l'incubation virus. Elle vient donc confirmer les résultats de l'analyse graphique :

- la rétention de MNV (en fait des deux virus) est essentiellement déterminée par la durée avec laquelle la suspension virale a été mise en contact avec la pouzzolane enrobée,
- le taux de rétention du virus diminue avec l'accroissement de la durée de la phase d'enrobage de la pouzzolane
- la filtration contribue à la marge au contrôle du taux de rétention.

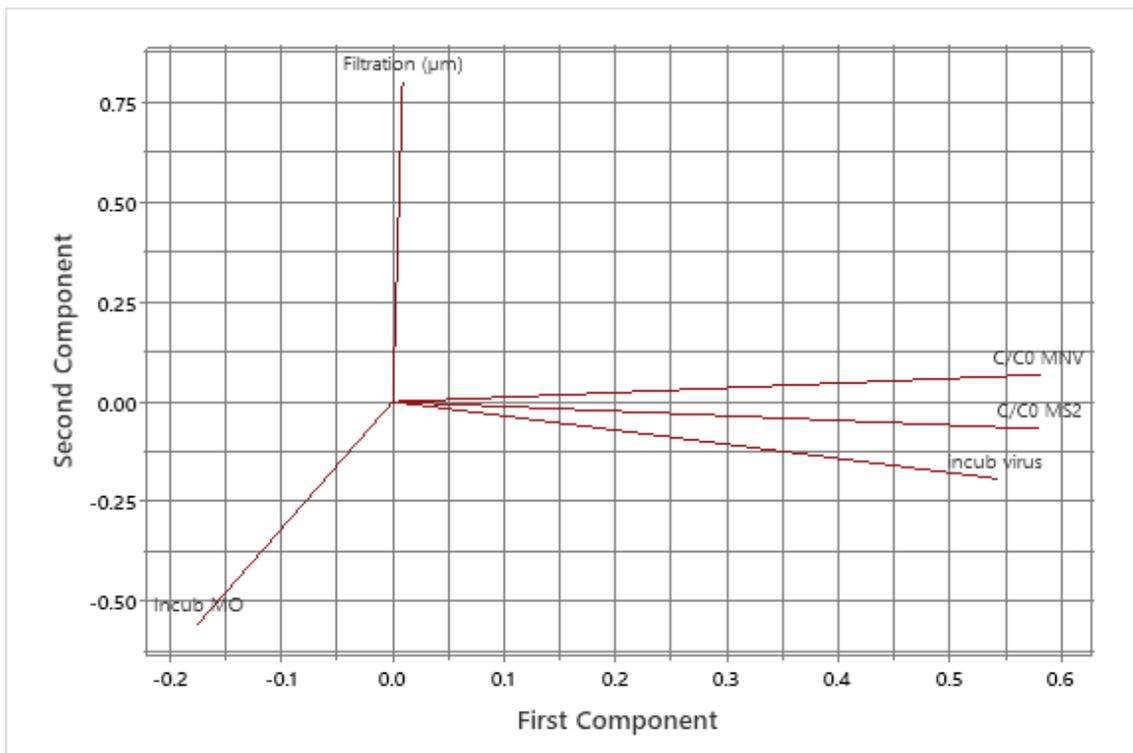


Figure IV-27. Représentation des variables dans le plan des deux 1ers axes.

En résumé, le 1<sup>er</sup> enseignement de ces essais a été de montrer les fortes capacités de rétention de MNV (70 % après 2 h de temps de contact avec la suspension virale, jusqu'à 87% après un temps de contact de 5h, Figure IV-28) d'une pouzzolane calcinée exposée pendant 15' seulement aux matières organiques dissoutes et particulaires < 1.2µm issues d'une eau usée.

Ces résultats semblent indiquer que les mécanismes mis en jeu sont essentiellement des processus abiotiques, immédiats, auxquels se sont probablement ajoutés (pour une contribution de l'ordre de 16 %) des processus biotiques (essentiellement bactériens en lien avec l'activité exo enzymatique) qui ont pu se développer durant les 5 h (valeur maximale testée) du temps d'exposition à la suspension virale. C'est ce que suggère le fait que le pourcentage de rétention augmente avec le temps d'exposition à la suspension virale (Figure IV-28).

Les résultats montrent également que le pourcentage de rétention des MNV augmente avec le temps de contact de la pouzzolane enrobée avec la suspension virale, mais dans une moindre mesure, lorsque le temps laissé à la matière organique de l'eau usée de recouvrir la pouzzolane augmente. La rétention des virus est maximale pour la durée minimale d'exposition au filtrat d'eau usée (15'). En d'autres termes, le fait d'accroître le temps de contact de la pouzzolane calcinée avec de l'eau usée dégrade de façon significative, le pourcentage de rétention de MNV. L'hypothèse peut être faite que l'accroissement de ce temps de contact, accroît le colmatage des anfractuosités de la pouzzolane avec deux

conséquences : la diminution des surfaces offertes à une rétention potentielle des virus et l'éloignement de la surface minérale de l'interface avec l'eau et donc des forces électrostatiques dont elle peut être à l'origine.

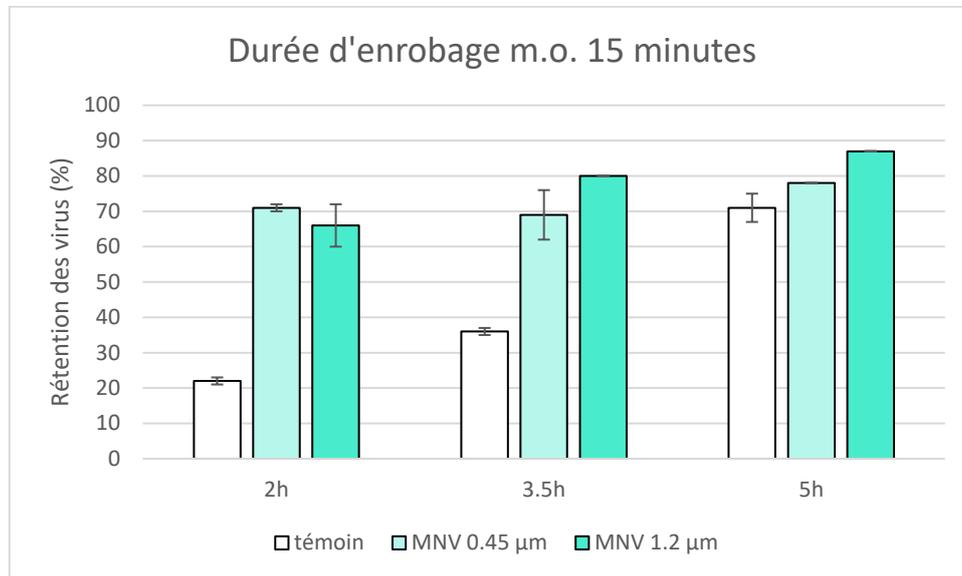


Figure IV-28. Relation entre le taux de rétention de MNV et le temps de contact entre la suspension virale et une pouzzolane dont le temps d'enrobage a été de 15' au contact de deux filtrats (0.45µm et 1.2µm). Témoin = pouzzolane non enrobée. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Pour des particules telles que les virus, le développement des biofilms sur la pouzzolane irait donc à l'encontre des capacités des biofiltres à les retenir et donc à les éliminer de l'eau avant son rejet dans l'environnement. Ce problème est probablement corrigé en partie par la répétition de l'opération de dé-tassage-lavage, mais les observations que nous avons pu faire de la charge restant sur les granules de pouzzolane qui l'avaient subie, suggèrent que leurs capacités de rétention pourraient être accrues par un décapage plus avancé.

Il est à noter, par ailleurs, que les résultats de nos essais vont à l'encontre d'un rôle significatif de la dégradation des virus liée à l'activité exo enzymatique des bactéries dont on peut pourtant supposer qu'elle s'est développée au cours des 5 h d'incubation.

#### IV.3.3.2 Essais réalisés avec le bactériophage MS2

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont montré que l'évolution des taux de rétention du MS2 était analogue, sur plusieurs points, avec celle des MNV. Elle est contrôlée

principalement et positivement par l'"incubation virus" et négativement par l'"incubation m.o." (Figure IV-29).

Les résultats sont semblables, également, concernant la forte interaction entre l'incubation virus et l'incubation m.o. (Figure IV-30), à l'inverse de la filtration qui semble avoir peu d'effet sur les deux autres facteurs.

La comparaison des quatre figures (Figure IV-23, Figure IV-24, Figure IV-29, Figure IV-30) fait cependant apparaître une opposition, entre les deux virus, pour les valeurs relatives des taux de rétention associés aux deux filtrations (0.45 $\mu$ m et 1.2 $\mu$ m) : dans le cas du MNV les valeurs sont plus grandes avec le filtrat obtenu sous la membrane de 1.2 $\mu$ m qu'avec celui obtenu avec le filtrat 0.45 $\mu$ m. Si les différences sont significatives, ce constat laisse supposer une forme d'association particulière des MNV avec certaines classes de taille de particules apportées par les filtrats. En effet, après qu'elles aient intégré l'enrobage des grains de pouzzolane, ces particules participent probablement à la rétention des virus. Les différences observées entre les deux filtrats seraient alors l'indication que celles dont la taille est comprise entre 0.45 et 1.2  $\mu$ m intéresseraient plus particulièrement les MNV.

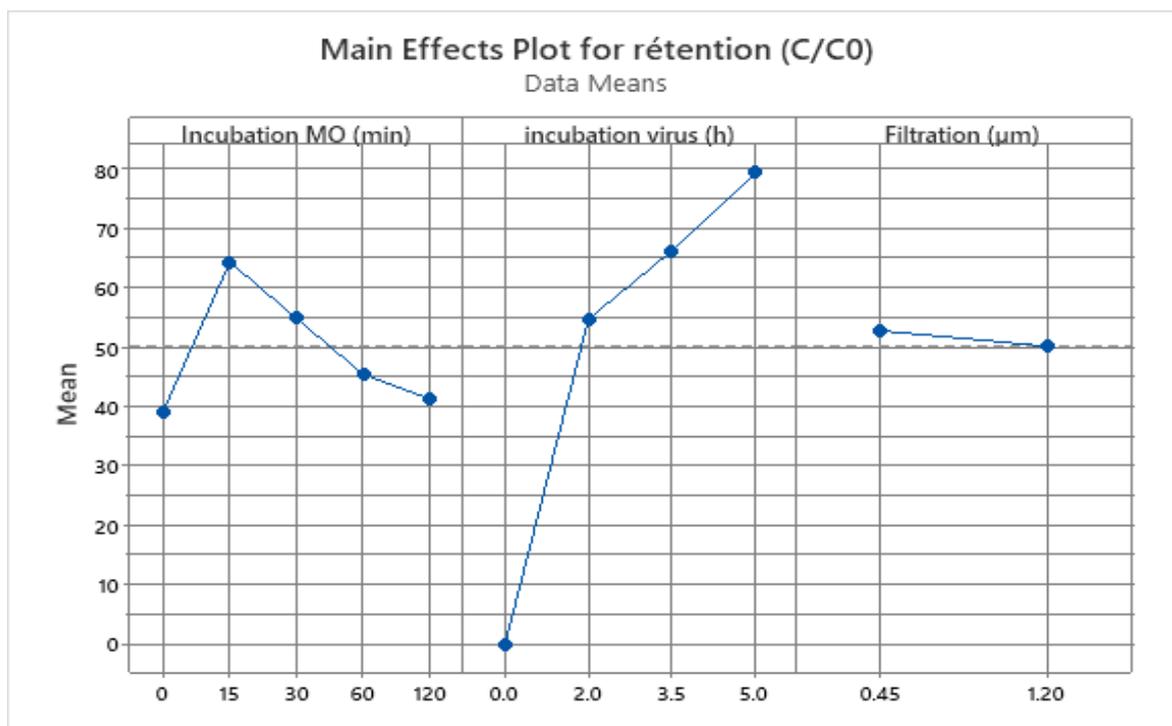


Figure IV-29. Variation de la moyenne du pourcentage de virus retenus (MS2) dans le cadre de chacune des variables explicatives. La ligne pointillée (ligne de référence) marque la moyenne générale, toutes valeurs des variables explicatives confondues.

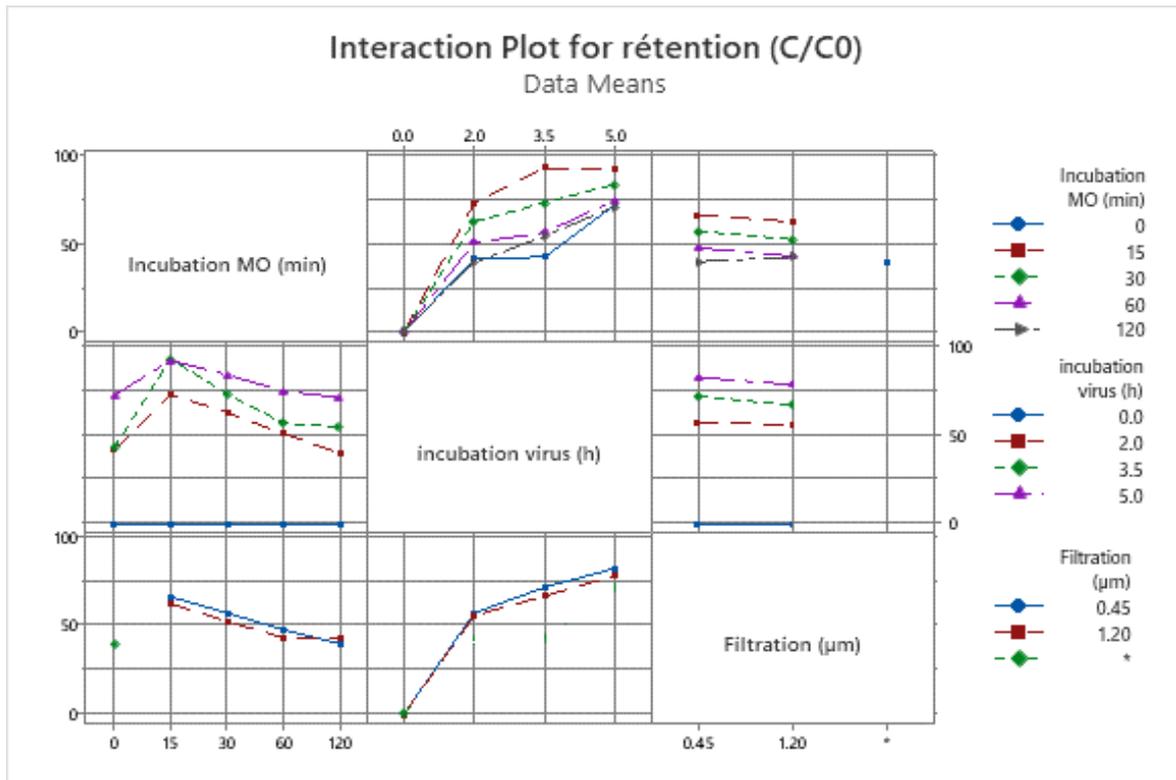


Figure IV-30. Matrice des interactions entre les variables explicatives (incubation m.o., incubation virus, filtration) dans la détermination du pourcentage de virus retenus.

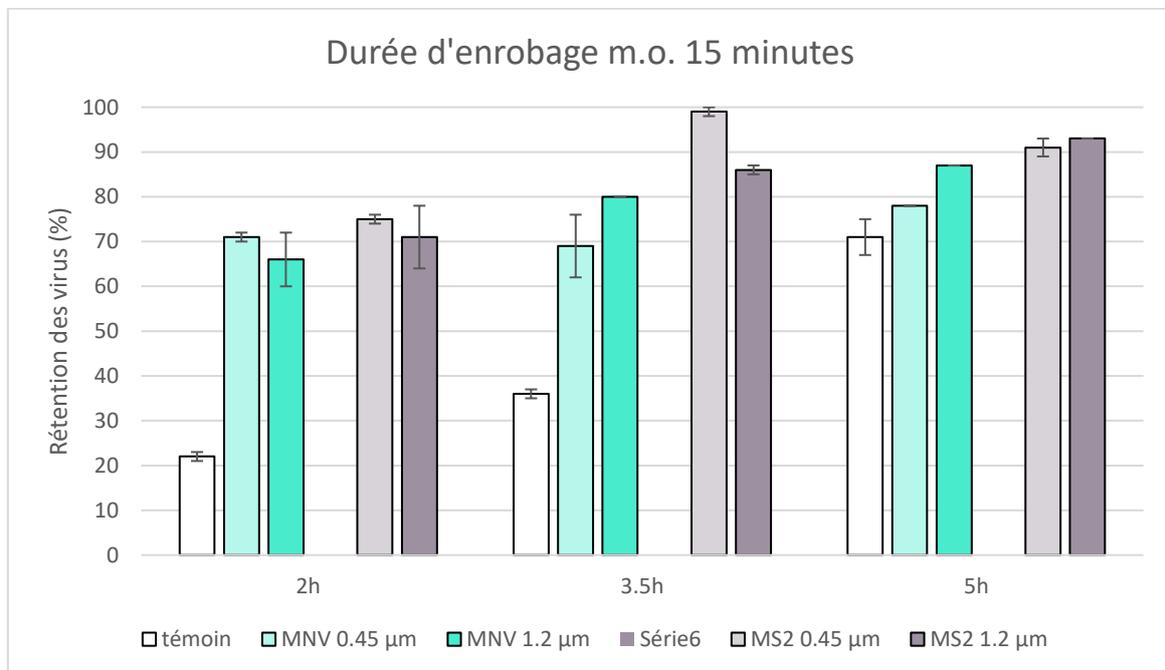


Figure IV-31. Relation entre les taux de rétention des virus et le temps de contact entre la suspension virale et une pouzzolane dont le temps d'enrobage a été de 15' au contact de deux filtrats (0.45µm et 1.2µm). Témoin = pouzzolane non enrobée. Les barres d'erreur

*représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).*

Les résultats obtenus avec ce virus, confirment les fortes capacités des mécanismes abiotiques (immédiats) de rétention, avec une valeur atteignant 75 % après 2 h de temps de contact (tc). Elle atteint 99 % puis se réduit à 93 %, respectivement après 3.5 h et 5 h de temps de contact. Les valeurs sont toutes supérieures à celles observées pour les MNV (87 %) ce qui pourrait être l'indication d'une plus grande contribution des mécanismes de rétention complémentaires, de nature biologique, dans le cas du bactériophage que dans celui des MNV (différences de l'ordre de 7 % à 43 %).

#### *IV.3.3.3. Conclusions*

Dans le prolongement des chapitres précédents, cette expérience avait pour objectif d'apporter des éléments d'interprétation des mécanismes d'abattement des charges virales de l'eau circulante des bioréacteurs, par la mise en œuvre d'un modèle réduit à 30 grammes d'un support minéral enrobé de matières organiques dissoutes et particulaires <1.2µm.

Nos mesures ont fait apparaître les fortes capacités de rétention de charges virales que peuvent avoir de tels microcosmes, avec des valeurs d'abattement de l'ordre de 70 % en 2 h.

Sur la base des démonstrations apportées par les essais mais aussi des hypothèses qu'ils nous ont incités à émettre, leur fonctionnement semble pouvoir être résumé comme suit :

Les mécanismes abiotiques passifs (physisorption, adsorption, accrochage aux résidus d'exo polymères) sont, chronologiquement, les 1<sup>ers</sup> intervenants. C'est en effet, avec la durée d'enrobage minimale (15 min) de la pouzzolane que l'efficacité de rétention s'est avérée maximale, un temps incompatible pour un développement important de processus biologiques. Il est probable qu'à ce stade précoce, le support minéral participe encore à la rétention des virus. La comparaison des valeurs de la pouzzolane témoin à celles de la pouzzolane 0.45µm, après 2 h de temps de contact avec la suspension virale, dans la Figure IV-28, par exemple, montre cependant que la rétention virale est principalement contrôlée par l'enrobage de matières organiques.

C'est ensuite un accroissement dans le temps ("incubation virus") de l'efficacité d'abattement des charges virales des bioréacteurs, qui est observé, très probablement en lien avec le développement de processus biologiques (multiplication des bactéries, croissance des biofilms, production d'EPS). La multiplication des populations microbiennes ajoute ainsi aux processus de rétention des mécanismes amenant à la disparition des virus (activités exo enzymatiques, ingestion par les organismes eucaryotes). En fait, les deux types de mécanismes, abiotiques et biotiques, doivent entrer en concurrence très tôt au cours de l'évolution des bioréacteurs, le développement des biofilms réduisant l'étendue des sites

d'accrochage passifs en lissant la surface des grains de pouzzolane (colmatage des anfractuosités). Nos résultats montrent en effet, une dégradation de l'efficacité des bioréacteurs lorsque le temps de contact de la pouzzolane calcinée avec de l'eau usée filtrée est augmenté.

La sélection qui a été faite de certaines classes de taille de particules visait en particulier l'apport de bactéries au microcosme par le biais du filtrat d'eau usée et, en aval, la vitesse avec laquelle les biofilms pouvaient se reconstituer. Les résultats montrent que le choix des pouvoirs de coupures à 1.2  $\mu\text{m}$  et 0.45  $\mu\text{m}$  n'a pas fait apparaître de différence significative de l'efficacité des abattements de charge. Nous avons remarqué cependant, que le sens des variations relatives des taux de rétention associés aux deux types de filtrats 0.45  $\mu\text{m}$  et 1.2  $\mu\text{m}$  s'inverse pour MNV après 3.5 h et 5 h d'incubation. Comme indiqué plus haut (§ IV.3.3.2), cette inversion pourrait témoigner de relations particulières de ce virus avec les particules dont la taille est comprise entre 0.45  $\mu\text{m}$  et 1.2  $\mu\text{m}$ . La remarque est à rapprocher de celle faite dans le chapitre IV.2.1 où il est apparu que ce virus se trouvait très rapidement associé aux particules en suspension.

Projetés sur les effets des cycles de détassage des bioréacteurs en vraie grandeur, les résultats de cette expérience laissent supposer que l'abattement des charges virales résultent d'un compromis entre la prééminence des processus abiotiques, immédiatement à la fin de l'opération, après le décapage partiel des grains de pouzzolane, puis de celle des processus biologiques avec le développement des biofilms au cours des 13 h qui suivent.

#### IV.3.4. Approche du rôle joué par les métazoaires : contribution des annélides aux abattements des charges virales

Dans cette expérience, nous avons cherché à mettre en évidence la participation de représentants des eucaryotes des biofiltres à l'abattement actif ou passif, des charges en VEH.

Une grande diversité d'eucaryotes colonise les biofiltres des STEPs. L'exploration de l'ensemble de leurs contributions à l'abattement des charges virales justifierait une étude à part entière. C'est donc à titre d'exemple, que nous avons choisi de considérer le cas de *Tubifex tubifex*, un oligochète pouvant être utilisé dans le traitement des eaux usées (Huang *et al.* 2006, de Valk *et al.* 2016, Yang *et al.* 2023, Figure IV-32). Dans l'environnement urbain, les oligochètes peuvent être utilisés comme bioaccumulateurs, ou bioindicateurs de la qualité de l'eau (Kazanci et Girgin 1996, Bouché *et al.* 2000). La présence excessive de ces organismes est souvent associée à des dysfonctionnements au cours du traitement (taux importants de matières organiques non dégradées, déficits en oxygène, températures élevées, etc. Daiger *et al.* 2011). Ces vers présentent notamment l'avantage d'être plus

facilement échantillonnés que ne le sont les protistes, par exemple, et en nombre suffisant pour réaliser des répliques.

Cette partie du travail, est, là encore, une 1<sup>ère</sup> approche visant à estimer le rôle joué par ces organismes dans la rétention des charges virales au sein de biofiltres, simulés ici par nos pilotes.



Figure IV-32. Images de *Tubifex tubifex* à la surface du lit de pouzzolane dans nos biofiltres pilotes (gauche) et après échantillonnage aux fins d'analyses (droite)

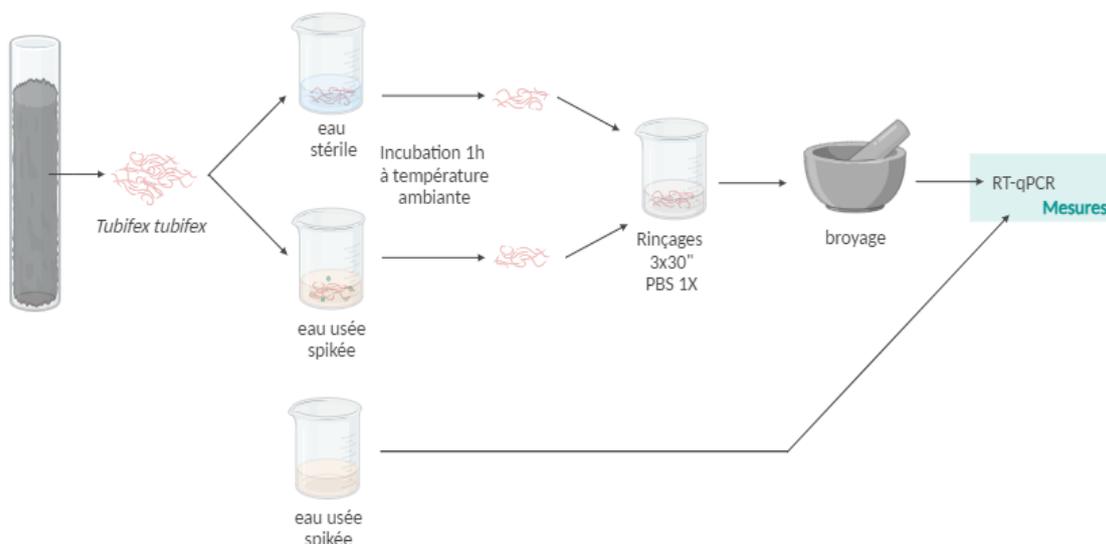


Figure IV-33. Schéma expérimental de l'essai réalisé pour la recherche des VEH dans le tube digestif de *Tubifex tubifex*.

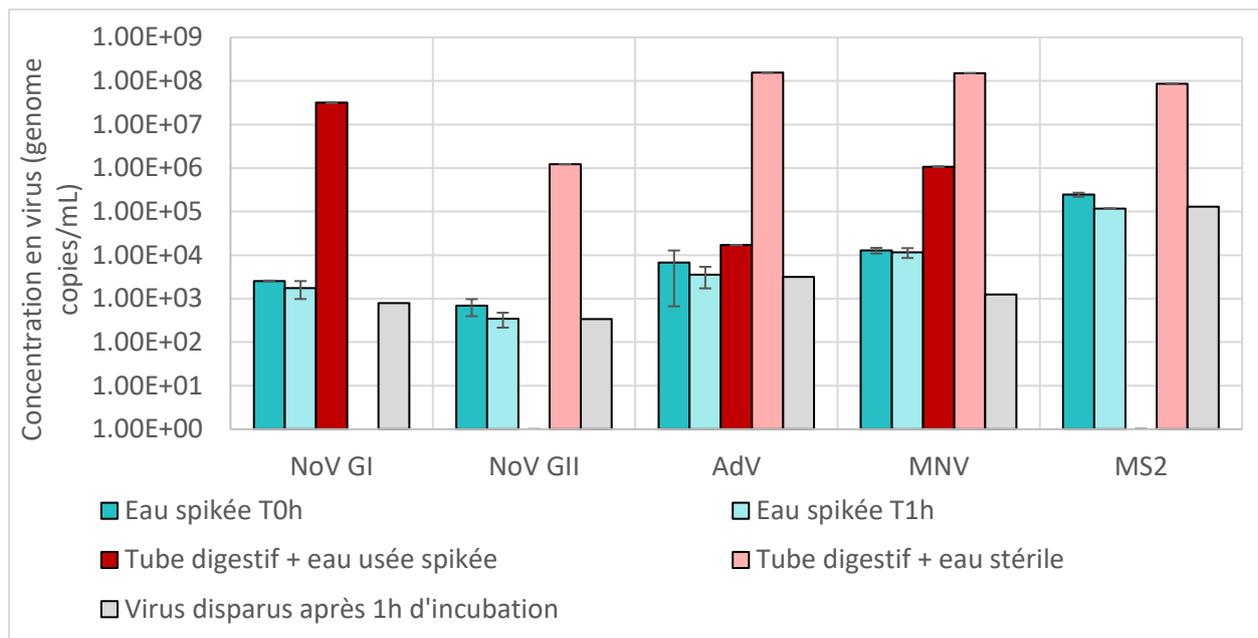


Figure IV-34. Comparaison des concentrations en VEH, MNV et MS2 dans les eaux usées et les tubes digestifs de *Tubifex tubifex*. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

Les résultats montrent, globalement, que les concentrations des virus (NoV GI, AdV et MNV) sont plus importantes dans les tubes digestifs des vers que dans l'eau usée (Figure IV-34). La diminution de la concentration des eaux en virus, après 1h d'incubation, en présence des vers, ne semblent toutefois pas suffisamment significatives pour conclure à leur implication directe dans cette réduction, probablement en raison d'une durée d'incubation trop faible.

La concentration des virus dans les tubes digestifs de vers incubés en eau stérile apparaît plus élevée que celle des vers incubés en eau usée. Deux hypothèses peuvent être formulées à ce sujet :

- la plus vraisemblable est celle d'un effet de masque des inhibiteurs de RT-qPCR de l'eau usée restée dans le tube digestif de l'animal, sur les petites quantités de virus y étaient présentes. A l'inverse, après qu'ils aient été plongés dans l'eau stérile pendant 1 h, ces composés, ont probablement été éliminés ou suffisamment dilués pour ne plus interférer sur les analyses.
- Il est possible qu'une partie des virus ingérés aient été digérés par les vers incubés en eau usée, dans laquelle leurs tubes digestifs et leurs microbiotes ont pu maintenir leurs activités.

Bien que les diminutions de concentrations en virus dans les eaux ne soient pas significatives, les plus fortes concentrations retrouvées dans les tubes digestifs de ces vers (augmentations de 1 à 4-logs) suggèrent qu'ils joueraient effectivement un rôle dans la

réétention des VEH au sein des biofiltres, et peut être, dans la préservation de leurs acides nucléiques dans les cas de digestion incomplète.

#### IV.3.5. Réétention des VEH par accrochage spécifique et non spécifique aux éléments des biofilms

Le dernier facteur de la réétention que nous avons exploré est celui de la contribution d'HBGA-like, présents à la surface de certaines bactéries, à la réétention des Norovirus à travers deux expériences.

Deux expériences ont donc été réalisées au cours desquelles les biofilms et les eaux ont été analysés selon le protocole de recherche des VEH développé dans le chapitre I.

##### *IV.3.5.1. Exploration de la distribution des virus entre les éléments concrétisés et l'eau interstitielle des biofilms.*

Les biofilms peuvent schématiquement être décomposés entre deux compartiments :

- celui de leurs éléments concrétisés : la masse des substances exopolymériques (EPS), les particules de toutes natures qui y sont piégées et les organismes,
- celui de l'eau interstitielle au sein du maillage des exo polymères et dans les canaux qu'ils aménagent entre eux et sous les formes érigées, au contact de leur support (ici la pouzzolane). Ce compartiment comporte lui aussi des éléments concrétisés sous la forme de particules en suspension

On peut imaginer en conséquence, qu'en fonction de leurs caractéristiques physiques et des propriétés de leurs constituants, les virus ne se distribuent pas de façon homogène entre ces deux compartiments. Ainsi, à la diversité des VEH, du point de vue de leur dimension, de leur géométrie ou de la composition des protéines de leur capsid, doit correspondre une diversité des affinités qu'ils peuvent avoir avec les composantes des biofilms.

Avec ce nouvel essai nous avons pour objectif d'explorer la distribution des VEH autochtones et d'un virus spiké (MNV), dans les biofilms des bioréacteurs pouzzolane. En ce sens, la concentration des virus a été comparée dans 3 types d'échantillons (Figure IV-35) :

- dans un biofilm "entier" (biofilm broyé afin de dissocier, autant que possible, les virus des éléments auxquels ils adhéraient) ;
- dans le surnageant de ce broyat après qu'il ait été centrifugé ;
- dans l'eau d'imbibition d'un biofilm non broyé (eau interstitielle), obtenue, elle aussi après centrifugation.

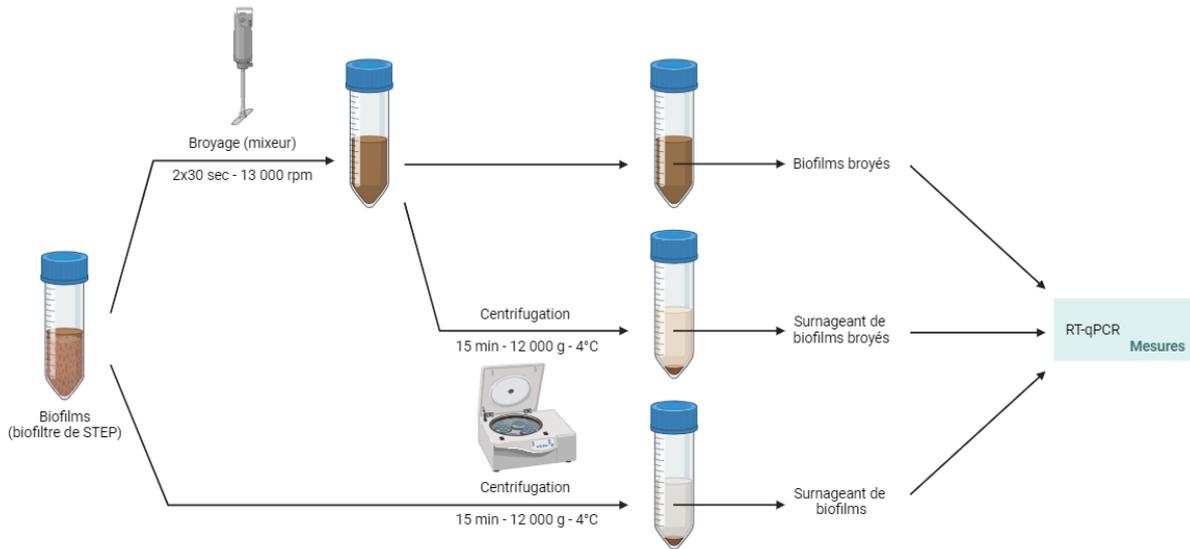


Figure IV-35. Mode opératoire de l'exploration de la distribution des virus dans les compartiments des biofilms. Le spiking aux MNV a été réalisé dans les échantillons de biofilms entiers juste avant leur traitement par broyage ou centrifugation.

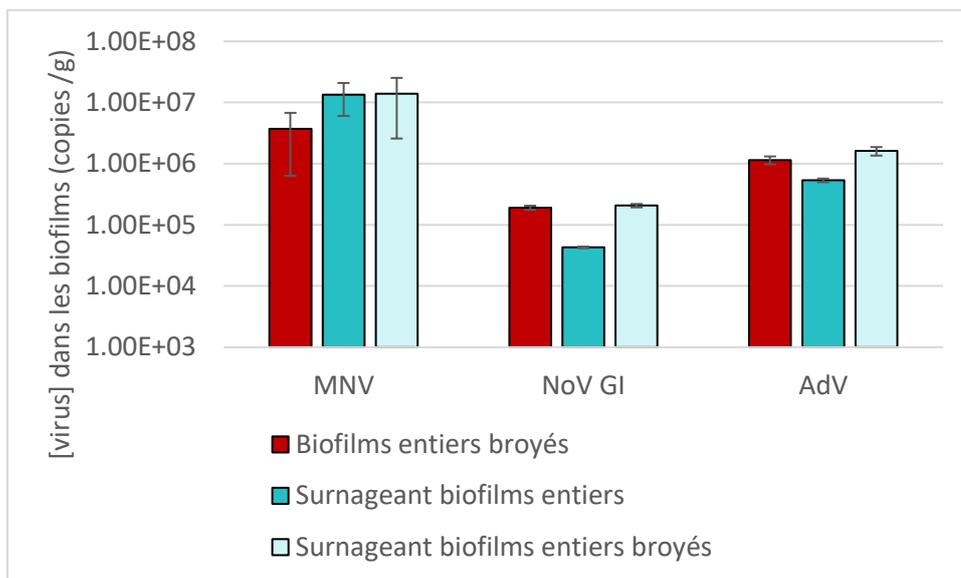


Figure IV-36. Concentrations de virus spiké et des virus autochtones dans les biofilms entiers, dans les eaux interstitielles (surnageant biofilms) et dans les surnageants de biofilms broyés. Les barres d'erreur représentent l'écart absolu médian (3 réplicats par condition, analysés en duplicats de RT-qPCR).

La comparaison des concentrations des biofilms entiers avec celles des eaux interstitielles permet d'estimer la concentration des virus accrochés aux éléments figurés des biofilms (Figure IV-36). Le rapport entre les virus retrouvés dans l'eau interstitielle (surnageant de

biofilms entiers) et ceux dans l'échantillon total (biofilms entiers broyés) s'avèrent être de  $22 \pm 1$  % pour les NoV GI et de  $47 \pm 3$  % pour les AdVs. Les norovirus apparaissent donc avoir plus de liens avec les éléments figurés des biofilms que les adénovirus.

Les valeurs obtenues pour les "surnageants de biofilms broyés" sont sensiblement les mêmes que celles des "biofilms entiers broyés" pour les deux virus. Le broyage semble donc avoir été suffisamment efficace pour détacher tous les virus des structures auxquelles ils étaient attachés. Le résultat indique aussi que, pour la contrainte (broyage) qui a été appliquée aux biofilms, les deux virus ne se distinguent pas du point de vue de la résistance de leurs attaches avec les composantes des biofilms.

Les analyses faites sur le virus spiké (MNV) font apparaître des valeurs plus faibles dans les biofilms entiers que dans les échantillons "eaux interstitielles" et "surnageant des biofilms broyés". Cette anomalie pourrait être liée à l'effet d'inhibiteurs de PCR sur les analyses de biofilms entiers. Ce sont en effet, les échantillons dans lesquels leur concentration devait être la plus grande, par comparaison avec les surnageants de centrifugation. Cette remarque suppose que les composés inhibiteurs étaient d'emblée associés à des particules ou qu'ils l'ont été à la suite du lessivage particulaire concomitant à la centrifugation. Les résultats montrent aussi qu'entre le moment où il a été mis en contact avec les biofilms et celui de la centrifugation (environ 2 minutes, avec 30 secondes de vortex), le virus est resté en suspension dans l'eau d'imbibition des biofilms, sans contracter, donc, d'attache particulière avec leurs éléments figurés.

Le rapport des concentrations AdV/GI, apporte une autre information au sujet de la distribution des virus au sein des biofilms. Sa valeur plus élevée dans les eaux interstitielles (12.5) que dans les deux autres types d'échantillons (7.8 et 6 respectivement pour les surnageants de biofilms broyés et pour les biofilms entiers) pourrait être une nouvelle indication d'une affinité des NoV GI pour les éléments figurés des biofilms plus grande que celle des AdV. La présence de récepteurs spécifiques, tels que les HBGA-like, pourrait en être l'une des explications.

#### *IV.3.5.2. Recherche d'HBGA-like dans les biofilms des bioréacteurs*

Dans le prolongement des conclusions du chapitre précédent, nous avons cherché à mettre en évidence la présence d'HBGA-like dans des échantillons de biofiltre en opérant selon le protocole schématisé dans la Figure IV-37. Les échantillons ont reçu un immunomarquage fluorescent basé sur un anticorps primaire, spécifiquement dirigé contre un HBGA-A (Miura *et al.* 2013) et un anticorps secondaire associé à un fluorophore émettant dans le vert ( $\lambda_{460\text{nm}}$ ). Un marquage au DAPI (émission dans le bleu,  $\lambda_{488\text{nm}}$ ) a également été réalisé afin de mettre en évidence la présence des corps bactériens. Les HBGA-like étant supposés être

sécrétés à la périphérie, voire à la surface des bactéries, les observations en microscopie confocale laser, ont été consacrées à la recherche de superpositions des fluorescences.

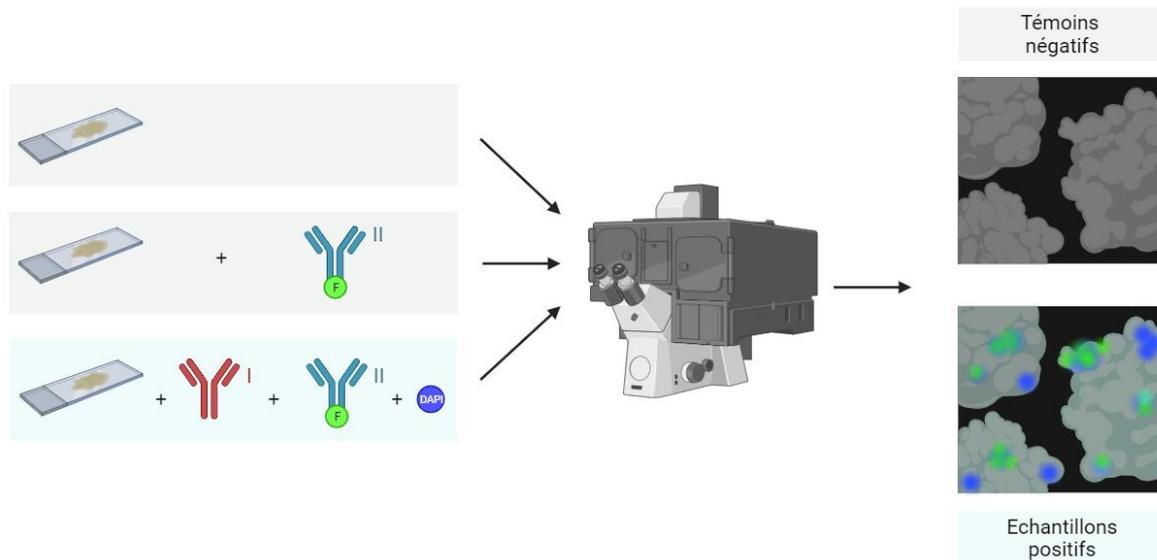


Figure IV-37. Protocole expérimental de la recherche d'HBGA-like dans les biofilms de la station d'épuration. 1) marquage des échantillons par immunofluorescence, 2) observation en microscopie confocale laser (CLSM).

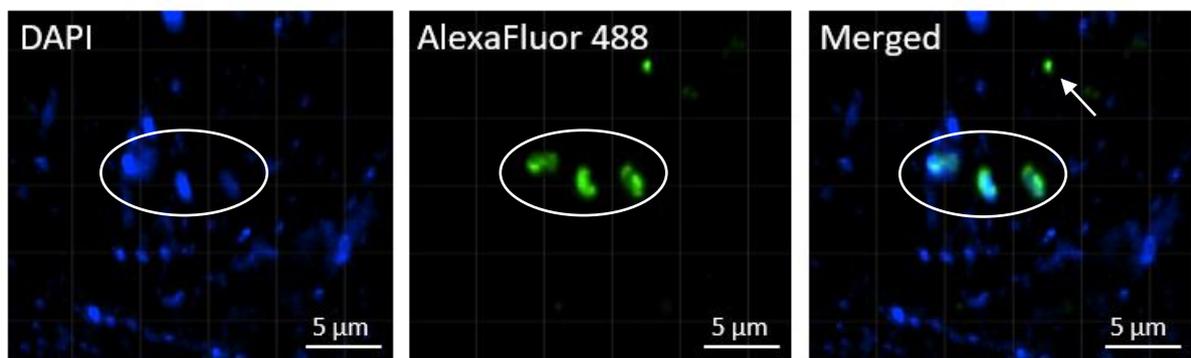


Figure IV-38. Observations au microscope confocal d'HBGA dans des échantillons de biofilms de biofiltres par immunofluorescence. DAPI : corps bactériens. AlexaFluor 488 : HBGA-A. Merged : superposition des deux fluorescences. L'ellipse montre la colocalisation d'HBGA et de bactéries. La flèche montre la présence d'HBGA « libres ».

Dans la plupart des images qui ont été acquises, la faible résolution n'a pas permis d'identifier avec certitude la nature des particules observées, en particulier de bacilles marqués au DAPI. La superposition des canaux « DAPI » et « AlexaFluor » a cependant révélé quelques objets au niveau desquels les fluorescences étaient en coïncidence, suggérant la

présence de bactéries exprimant des HBGA-A (Figure IV-38). Nous n'en avons rencontré que deux sur la vingtaine de champs parcourus lors de nos observations, correspondant à environ 5E-10 g de biofilms.

Le résultat doit être interprété en sachant que le marquage de nos échantillons n'a été fait que pour un seul type d'HBGA alors qu'il est probable que plusieurs autres types aient été présents.

Chez les bactéries, les HBGA-like sont localisés au niveau des lipopolysaccharides et des substances exopolymériques (Miura *et al.* 2013, Li *et al.* 2015, Amarasiri *et al.* 2016). Ils peuvent alors se situer à la surface des bactéries, mais aussi être plus éloignés suite à un décrochage de ces éléments. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs images aient fait apparaître des points au niveau desquels la fluorescence des anticorps  $\alpha$ HBGA-A (HBGA-A "libres") ne se superposait pas à la fluorescence du DAPI (Figure IV-38, flèche).

## IV.4. Conclusions du Chapitre IV

Ce chapitre était consacré à l'effet du traitement biologique de l'eau sur la rétention des charges virales.

Dans un premier temps, c'est l'effet de l'ensemble des acteurs de cette rétention qui a été étudié, à travers la mise en œuvre de pilotes de laboratoire. De ces essais, il résulte que les phénomènes de rétention des virus se décomposeraient en deux phases : une phase précoce et rapide, durant laquelle la rétention est la plus importante, et serait principalement due à des phénomènes physiques, suivie d'une phase tardive, durant laquelle des phénomènes biologiques entreraient en jeu.

Ces résultats suggèrent également que le colmatage des bioréacteurs, induits par la croissance des biofilms qui les colonisent, ne semble pas impacter significativement la rétention des virus.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés au détail de la contribution de certains mécanismes. Les résultats ont apporté confirmation aux hypothèses émises précédemment sur la temporalité de l'implication des phénomènes physiques et biologiques. Ils ont par ailleurs mis en évidence l'effet de la température sur la rétention des virus par les biofilms, suggérant que si les températures un peu élevées (>11°C) auxquelles fonctionnent les bioréacteurs de la STEP, sont plutôt favorables au développement des biofilms, elles seraient plutôt contre-productives vis-à-vis de la rétention des virus.

Au-delà des biofiltres pilotes, nos expériences ont montré les fortes capacités de rétention de charges virales que peuvent avoir des microcosmes réduits à quelques grains de pouzzolane enrobés de biofilms. Ils ont apporté, à leur échelle, la confirmation de la temporalité des processus évoqués plus haut, avec l'alternance des processus abiotiques et des processus biotiques dans le contrôle des abattements viraux. Ils ont également amené des éléments sur la concurrence qui semble s'établir entre les deux types de processus à certains stades de l'évolution des réacteurs, analogue à celle des biofiltres de l'UDEP, entre deux opérations de détassage. A ce sujet, les résultats obtenus sur ces microcosmes viennent en contradiction de la remarque précédente à propos de l'effet du colmatage sur la rétention des virus. Ils ont aussi apporté des éléments complémentaires en faveur de l'existence de relations particulières que les NoV GI semblent avoir avec les éléments figurés des biofilms et qui ne sont pas observés avec les AdV.

Sur le plan méthodologique, la comparaison des effets des différents facteurs sur les virus modèles de VEH, que nous avons utilisés, MNV et les MS2, a mis en évidence des différences de "comportement" notables, qui soulèvent la question de leur pertinence et de l'importance du choix de ces modèles pour ce type d'étude.

Le sujet de l'effet spécifique du traitement biologique des eaux usées sur les charges virales est aussi encore très peu documenté. Il implique de très nombreux acteurs, tous en interaction et c'est pourquoi nous avons souhaité l'aborder en considérant le plus grand nombre de ses aspects, plutôt qu'en cherchant à en isoler l'une des composantes. Ce choix est aussi la raison pour laquelle plusieurs de nos investigations relèvent de premières approches. C'est le cas, en particulier, de l'exploration que nous avons faites de facteurs de rétention spécifiques avec le cas des NoV (HBGA-like) et de facteurs non spécifiques d'abattement des charges virales telle que l'ingestion par *T. tubifex*.

# Conclusions générales et perspectives

## Conclusions générales et perspectives

Il nous apparaît utile de rappeler ici que ce projet a été conçu et réalisé dans le cadre d'une collaboration tripartite associant l'entreprise Abiolab, le groupe VIH et Virus Humains Persistants de l'IBS (Institut de Biologie Structurale) de l'Université Grenoble Alpes et l'UMR CNRS EDYTEM (Environnements, Dynamiques et Territoire de Montagne) de l'Université Savoie Mont-Blanc.

De ce fait, il devait, tout à la fois, présenter un intérêt sur le plan des connaissances scientifiques mais aussi adresser des questions en prise avec les réalités socio-économiques de l'entreprise, susceptibles de déboucher, à court ou à moyen terme, sur des applications potentielles dans le domaine de l'analyse des virus entériques dans les eaux environnementales.

Le sujet de notre travail a été défini au constat des enjeux de santé publique attachés à la mesure de la charge en virus entériques humains des eaux usées, aussi bien à l'entrée des STEPs, en tant que 1<sup>er</sup> niveau d'alerte d'épisodes épidémiques, qu'à la sortie, vis-à-vis des risques de contamination des milieux environnementaux et, indirectement, des populations humaines.

Bien que de nombreuses études se soient penchées sur la détection et la quantification des virus dans les eaux usées, notamment en lien avec la pandémie de SARS-CoV-2, les travaux sur les performances des STEPs dans la réduction des charges virales sont encore très fragmentaires. Les études font état d'une grande variabilité des résultats en raison de la diversité des situations et des procédés de traitement. Les défis initiaux dans ces études portent sur les analyses elles-mêmes, incluant les problèmes liés à l'échantillonnage, à l'extraction des virus et aux interférences dues à certains éléments de la composition chimiques des eaux usées.

Dans ce contexte, notre approche a été orientée vers deux points principaux :

- celui des problèmes liés à l'échantillonnage et à l'analyse des virus dans les eaux usées, deux étapes dont les performances déterminent la qualité des données et celle des interprétations qui en sont faites, mais aussi grâce auxquelles les protocoles existants peuvent être optimisés,
- celui de l'évaluation de la performance des STEPs dans la rétention / la transformation des charges en VEH, en termes de concentration, d'intégrité des particules virales et de diversité.

Les progrès apportés par notre travail aux connaissances relatives à ces deux points complémentaires sont multiples.

Au plan méthodologique, une partie de nos essais a été consacrée à la mise au point de techniques d'échantillonnage innovantes (échantillonneurs passifs basés sur des matériaux adsorbants), et à l'optimisation de l'extraction des virus et de l'analyse des acides nucléiques. L'examen de la bibliographie montre en effet la nécessité d'élaborer des protocoles optimisés pour les eaux environnementales. Dans ce domaine, nos résultats concluent au fait que l'une des principales améliorations qui doit être apportée aux méthodes basées sur les matériaux adsorbants de type chitosan et charbon actif, concerne l'efficacité de la récupération des virus. Ils soulignent également le fait que, dans l'état actuel de leur mise au point, ces dispositifs relèvent plus des techniques de détection que des techniques de quantification des virus.

Nos résultats viennent également compléter la connaissance, encore trop fragmentaire, de l'évolution des charges virales dans les eaux usées, à plusieurs échelles.

Celle, globale, des deux traitements principaux (traitements primaire et secondaire) avec les informations apportées sur leurs efficacités relatives dans l'abattement des charges en VEH. Sur l'ensemble de nos mesures, les valeurs ont été de l'ordre de 36% de part et d'autre du décanteur primaire pour les NoV GI et AdV, et de 60% pour le NoV GII. De part et d'autre des biofiltres, les diminutions se sont révélées être d'environ 30% pour les NoV GI et les AdV, et 0% pour les NoV GII. Au total, les abattements entre l'entrée et à la sortie de la station s'établissaient donc à 58 % et 52 % respectivement pour les NoV et des AdV. Au terme de ce travail, le constat de la difficulté de comparer ces valeurs à celles qui apparaissent dans la bibliographie, en raison de la disparité des contextes dans lesquels elles ont été acquises : variabilité intrinsèque de la composition des eaux usées, variabilité des traitements et des techniques d'analyse.

La seconde échelle à laquelle nos résultats viennent apporter une connaissance complémentaire, est celle de la constitution des populations virales avec le chiffrage spécifique de quelques représentants des VEH aux stades intermédiaires des traitements. En complément des valeurs enregistrées à l'entrée et à la sortie de la STEP, cette information est un préambule à toute perspective d'amélioration ou d'optimisation des procédés de traitement, mais aussi à l'évaluation des risques associés aux opérations auxquelles les boues primaires sont soumises ultérieurement.

Plusieurs de nos résultats, apportent l'indication que certaines des évolutions observées ne représentent pas des généralités. C'est ce qu'il faut conclure des disparités relevées entre les abattements des trois virus étudiés ou encore, de l'indications reçue dans plusieurs de nos essais, de la probabilité d'une relation particulière des NoV GI avec les particules en suspension. Ces disparités montrent l'intérêt que pourrait avoir la reproduction de notre démarche avec d'autres représentants des VEH.

La fraction des VEH qui a conservé son caractère infectieux constitue, elle aussi, un cas particulier auquel se sont adressées nos mesures réalisées à l'aide du virus modèle MS2. Ils montrent que cette fraction est éliminée à hauteur de plus de 80% avec les boues primaires et la combinaison de polymères mise en œuvre à l'UDEP. 20 % des virus infectieux poursuivraient donc leur cheminement en direction des biofiltres. Les mesures effectuées au niveau du traitement secondaire apportent l'indication d'une contribution complémentaire effective des biofiltres à ces abattements. Bien qu'elle n'ait pas pu être chiffrée, ces résultats font apparaître la possibilité d'une émission de formes virulentes des VEH en aval de la station.

Sur le plan de la connaissance des mécanismes de l'abattement des charges virales, nos expériences, ont été essentiellement focalisées sur ceux qui interviennent dans les biofiltres. Ils ont été menés en microcosmes par une série d'essais dans lesquels certains des acteurs qui déterminent ces mécanismes étaient tour à tour isolés. Leur connaissance est en effet un préambule dans la recherche d'améliorations des procédés de traitement, notamment sur le plan de l'élimination des organismes pathogènes. Les résultats révèlent la coexistence de processus physiques et de processus biologiques, en concurrence les uns avec les autres, mais qui, tour à tour, prennent le contrôle principal de l'abattement des virus. Ils montrent aussi que, dans le système pouzzolane-biofilm, la rétention due au minéral est plus importante que celle liée au vecteur biologique, dans le cas du norovirus murin.

Les mesures effectuées sur pilotes de laboratoire montrent l'augmentation effective de la rétention virale avec l'âge des biofilms, suivant un modèle de type logistique. Une forme de validation a été apportée à nos pilotes pour la simulation qu'ils étaient censés faire des biofiltres de la station, avec l'apparition, au bout de 8h, du début de la phase plateau, en correspondance avec les 13h qui séparent les phases de détassage au sein de l'UDEP.

Ce travail a également eu pour objectif d'apporter une information sur les effets des traitements sur la diversité des VEH, en liaison avec la variabilité du risque infectieux selon les génotypes, génogroupes ou espèces au sein d'un même genre. Les essais ont été conduits sur la base d'analyses NGS. Les résultats partiels obtenus, suite aux nombreuses difficultés rencontrées, soutiennent notre hypothèse d'un effet filtre espèce-dépendant sur les AdV, qui serait conséquent à la mise en œuvre de polymères au niveau de la décantation primaire.

Au terme de ces conclusions, relatives à des expériences qui, pour la plupart, relèvent de 1ères approches, les principales études qui pourraient venir dans le prolongement de ce travail nous paraissent être les suivantes :

Sur le plan méthodologique :

- Poursuivre la mise au point d'échantillonneurs passifs par une amélioration de l'efficacité des procédés de récupération des virus ou de leurs acides nucléiques.

Sur le plan analytique :

- Compte-tenu de la récurrence des problèmes posés par les inhibiteurs des réactions enzymatiques relevant de la biologie moléculaire, inciter au montage de projets collaboratifs transdisciplinaires sur leur identification et la mise au point de techniques visant à en réduire les effets ;
- Reproduire une partie des expériences faites dans ce travail avec un panel de VEH élargi aux *Astrovirus* et *Rotavirus* en liaison avec leurs particularités structurales et leur importance du point de vue épidémiologique ;

Sur le plan de l'effet des traitements des eaux usées sur les charges virales :

- Donner suite à notre recherche, par séquençage haut débit, de changements de diversité induits par les traitements, en particulier du fait de la mise en œuvre de polymères de coagulation-floculation.

## Références

- Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gerba, C.P. and Pepper, I.L., 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 59, 1318–1324.
- Ahmed, W., Bertsch, P.M., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., Haramoto, E., Gyawali, P., Korajkic, A., McMinn, B.R., Mueller, J.F., Simpson, S.L., Smith, W.J.M., Symonds, E.M., Thomas, K.V., Verhagen, R., Kitajima, M., 2020. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of The Total Environment* 739, 139960.
- Aggarwal, R., 2013. Hepatitis E: Clinical Presentation in Disease-Endemic Areas and Diagnosis. *Semin Liver Dis* 33, 030–040.
- Aggarwal, R., Naik, S.R., 1994. Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. *Journal of Hepatology* 21, 718–723.
- Aggarwal, R., 2013. Hepatitis E: Clinical Presentation in Disease-Endemic Areas and Diagnosis. *Semin Liver Dis* 33, 030–040.
- Ahmed, W., Payyappat, S., Cassidy, M., Besley, C., Power, K., 2018. Novel crAssphage marker genes ascertain sewage pollution in a recreational lake receiving urban stormwater runoff. *Water Research* 145, 769–778.
- Ahmed, W., Bertsch, P.M., Bivins, A., Bibby, K., Farkas, K., Gathercole, A., Haramoto, E., Gyawali, P., Korajkic, A., McMinn, B.R., Mueller, J.F., Simpson, S.L., Smith, W.J.M., Symonds, E.M., Thomas, K.V., Verhagen, R., Kitajima, M., 2020. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Science of The Total Environment* 739, 139960.
- Ahmed, W., Bivins, A., Korajkic, A., Metcalfe, S., Smith, W.J.M., Simpson, S.L., 2023. Comparative analysis of Adsorption-Extraction (AE) and Nanotrap® Magnetic Virus Particles (NMVP) workflows for the recovery of endogenous enveloped and non-enveloped viruses in wastewater. *Science of The Total Environment* 859, 160072.
- Ahmed, W., Smith, W.J.M., Metcalfe, S., Jackson, G., Choi, P.M., Morrison, M., Field, D., Gyawali, P., Bivins, A., Bibby, K., Simpson, S.L., 2022. Comparison of RT-qPCR and RT-dPCR Platforms for the Trace Detection of SARS-CoV-2 RNA in Wastewater. *ACS EST Water* 2, 1871–1880.
- Akello, J.O., Kamgang, R., Barbani, M.T., Suter-Riniker, F., Leib, S.L., Ramette, A., 2020. Epidemiology of Human Adenoviruses: A 20-Year Retrospective Observational Study in Hospitalized Patients in Bern, Switzerland. *CLEP Volume 12*, 353–366.
- Akter, J., Smith, W.J.M., Liu, Y., Kim, I., Simpson, S.L., Thai, P., Korajkic, A., Ahmed, W., 2024. Comparison of adsorption-extraction (AE) workflows for improved measurements of viral and bacterial nucleic acid in untreated wastewater. *Science of The Total Environment* 908, 167966.
- Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J.M., Courtois, S., Girones, R., 2009. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *Journal of Virological Methods* 158, 104–109.
- Alfano-Sobsey, E., Sweat, D., Hall, A., Breedlove, F., Rodriguez, R., Greene, S., Pierce, A., Sobsey, M., Davies, M., Ledford, S.L., 2012. Norovirus outbreak associated with undercooked oysters and secondary household transmission. *Epidemiol. Infect.* 140, 276–282.
- Almand, E.A., Moore, M.D., Jaykus, L.-A., 2017. Norovirus Binding to Ligands Beyond Histo-Blood Group Antigens. *Front. Microbiol.* 8, 2549.
- 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 Research* 95, 383–391.
- 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.
- Anupama, V.N., Amrutha, P.N., Chitra, G.S., Krishnakumar, B., 2008. Phosphatase activity in anaerobic bioreactors for wastewater treatment. *Water Research* 42, 2796–2802.
- Ao, X., Eloranta, J., Huang, C.-H., Santoro, D., Sun, W., Lu, Z., Li, C., 2021. Peracetic acid-based advanced oxidation processes for decontamination and disinfection of water: A review. *Water Research* 188, 116479.

- Aoki, Y., Suto, A., Mizuta, K., Ahiko, T., Osaka, K., Matsuzaki, Y., 2010. Duration of norovirus excretion and the longitudinal course of viral load in norovirus-infected elderly patients. *Journal of Hospital Infection* 75, 42–46.
- Appleton, H. and Higgins, P.G. (1975) Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet* 1(7919), 1297.
- Arana, A., Cilla, G., Montes, M., Gomariz, M., Pérez-Trallero, E., 2014. Genotypes, Recombinant Forms, and Variants of Norovirus GII.4 in Gipuzkoa (Basque Country, Spain), 2009–2012. *PLoS ONE* 9, e98875.
- Araud, E., Fuzawa, M., Shisler, J.L., Li, J., Nguyen, T.H., 2020. UV Inactivation of Rotavirus and Tulane Virus Targets Different Components of the Virions. *Appl Environ Microbiol* 86, e02436-19.
- Armanious, A., Aeppli, M., Jacak, R., Refardt, D., Sigstam, T., Kohn, T., Sander, M., 2016. Viruses at Solid–Water Interfaces: A Systematic Assessment of Interactions Driving Adsorption. *Environ. Sci. Technol.* 50, 732–743.
- Aslan, A., Xagorarakis, I., Simmons, F.J., Rose, J.B., Dorevitch, S., 2011. Occurrence of adenovirus and other enteric viruses in limited-contact freshwater recreational areas and bathing waters. *Journal of Applied Microbiology*.
- Assis, A.S.F., Otenio, M.H., Drumond, B.P., Fumian, T.M., Miagostovich, M.P., Da Rosa E Silva, M.L., 2017. Optimization of the skimmed-milk flocculation method for recovery of adenovirus from sludge. *Science of The Total Environment* 583, 163–168.
- 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 Research* 144, 204–214.
- Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Graham, D.Y., 2008. Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1553–1557.
- 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.
- Bányai, K., Martella, V., Meleg, E., Kisfali, P., Péterfi, Z., Benkő, M., Melegh, B., Szu, G., 2009. Searching for HAdV-52, the putative gastroenteritis-associated human adenovirus serotype in Southern Hungary.
- Bao, C., Fang, C., 2012. Water Resources Flows Related to Urbanization in China: Challenges and Perspectives for Water Management and Urban Development. *Water Resour Manage* 26, 531–552.
- Barreto-Vieira, D.F., Barth, O.M., 2015. Negative and Positive Staining in Transmission Electron Microscopy for Virus Diagnosis, in: Shah, M.M. (Ed.), *Microbiology in Agriculture and Human Health*. InTech.
- Bhatt, A., Arora, P., Prajapati, S.K., 2020. Occurrence, fates and potential treatment approaches for removal of viruses from wastewater: A review with emphasis on SARS-CoV-2. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 12.
- Bibby, K., Peccia, J., 2013. Prevalence of respiratory adenovirus species B and C in sewage sludge. *Environ. Sci.: Processes Impacts* 15, 336–338.
- Biselli, E., Schink, S.J., Gerland, U., 2020. Slower growth of *Escherichia coli* leads to longer survival in carbon starvation due to a decrease in the maintenance rate. *Molecular Systems Biology* 16, e9478.
- Bitton, G., 2014. *Microbiology of Drinking Water Production and Distribution*. Wiley-Blackwell.
- Bivins, A., Kaya, D., Ahmed, W., Brown, J., Butler, C., Greaves, J., Leal, R., Maas, K., Rao, G., Sherchan, S., Sills, D., Sinclair, R., Wheeler, R.T., Mansfeldt, C., 2022. Passive sampling to scale wastewater surveillance of infectious disease: Lessons learned from COVID-19. *Science of The Total Environment* 835, 155347.
- Blacklow, N.R., Greenberg, H.B., 1991. Viral Gastroenteritis. *N Engl J Med* 325, 252–264.
- Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., Girones, R., 2006. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. *Appl Environ Microbiol* 72, 7894–7896.
- Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Calgua, B., Rusiñol, M., Maluquer De Motes, C., Girones, R., 2011. Cost-effective Method for Microbial Source Tracking Using Specific Human and Animal Viruses. *JoVE* 2820.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., Van Der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28, 495–503.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., Van Der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., Mumford, R., 2014. Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research* 186, 20–31.
- Bott, T., Shaw, G., Gregory, S., 2023. A simple method for testing and controlling inhibition in soil and sediment samples for qPCR. *Journal of Microbiological Methods* 212, 106795.

- Bouché, M.-L., Habets, F., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2000. Toxic Effects and Bioaccumulation of Cadmium in the Aquatic Oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 246–251.
- Brown, M.R., Camézuli, S., Davenport, R.J., Petelenz-Kurdziel, E., Øvreås, L., Curtis, T.P., 2015. Flow cytometric quantification of viruses in activated sludge. *Water Research* 68, 414–422.
- Bucardo, F., Carlsson, B., Nordgren, J., Larson, G., Blandon, P., Vilchez, S., Svensson, L., 2012. Susceptibility of Children to Sapovirus Infections, Nicaragua, 2005–2006. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1875–1878.
- Burge, W.D., Enkiri, N.K., 1978. Virus Adsorption by Five Soils<sup>1</sup>. *Journal of Environment Quality* 7, 73.
- Buser, A., Chollet, N., Davit, A., Guggenheim, C., Hofacker, A., Kayser, A., 2021. Groupe de suivi projets partiels 2 et 3.
- 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.
- Calgua, B., Barardi, C.R.M., Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J., Girones, R., 2011. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of Virological Methods* 171, 1–7.
- Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A.P., López-Pila, J.M., Girones, R., 2008. Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples. *Journal of Virological Methods* 153, 79–83.
- Canh, V., Tabata, S., Yamanoi, S., Onaka, Y., Yokoi, T., Furumai, H., Katayama, H., 2021. Evaluation of Porous Carbon Adsorbents Made from Rice Husks for Virus Removal in Water. *Water* 13, 1280.
- 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.
- Cardoso, B., J., Rodrigues, E., Gaspar, A., R., Gomes, A., 2021. Energy performance factors in wastewater treatment plants: a review. *J. Clean. Prod.* 322.
- Carol, M., Guadalupe-Fernández, V., Rius, C., Soldevila, N., Razquin, E., Guix, S., Dominguez, A., on behalf of the Working Group for the Study of Outbreaks of Acute Gastroenteritis in Catalonia, 2021. A Waterborne Gastroenteritis Outbreak Caused by a GII Norovirus in a Holiday Camp in Catalonia (Spain), 2017. *Viruses* 13, 1792.
- Cassidy, J., Silva, T., Semião, N., Ramalho, P., Santos, A., Feliciano, J., 2020. Improving wastewater treatment plants operational efficiency and effectiveness through an integrated performance assessment system. *H2Open Journal* 3, 276–287.
- Chahal, C., Van Den Akker, B., Young, F., Franco, C., Blackbeard, J., Monis, P., 2016. Pathogen and Particle Associations in Wastewater, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 63–119.
- Chang, S. L., Berg, G., Clarke, N. A., and Kabler, P. W. 1960. Survival, and Protection against Chlorination, of Human Enteric Pathogens in Free-Living Nematodes Isolated from Water Supplies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 9, 2, 136-142
- Chang, S.L., 1961. Viruses, Amebas, and Nematodes and Public Water Supplies. *Journal AWWA* 53, 288–296.
- Chaudhry, R.M., Holloway, R.W., Cath, T.Y., Nelson, K.L., 2015. Impact of virus surface characteristics on removal mechanisms within membrane bioreactors. *Water Research* 84, 144–152.
- Chemtech International, 2021. <https://chemtech-us.com/articles/coagulation-vs-flocculation-which-option-is-best-for-your-water-treatment/>
- Chen, L., Deng, Y., Dong, S., Wang, H., Li, P., Zhang, H., Chu, W., 2021. The occurrence and control of waterborne viruses in drinking water treatment: A review. *Chemosphere* 281, 130728.
- Cheong, S., Lee, C., Song, S.W., Choi, W.C., Lee, C.H., Kim, S.-J., 2009. Enteric Viruses in Raw Vegetables and Groundwater Used for Irrigation in South Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7745–7751.
- Chhabra, P., Payne, D.C., Szilagyi, P.G., Edwards, K.M., Staat, M.A., Shirley, S.H., Wikswo, M., Nix, W.A., Lu, X., Parashar, U.D., Vinjé, J., 2013. Etiology of Viral Gastroenteritis in Children <5 Years of Age in the United States, 2008–2009.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., Koopmans, M.P.G., Vinjé, J., 2019. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*.

- Chia, M.-Y., Chung, W.-Y., Chiang, P.-S., Chien, Y.-S., Ho, M.-S., Lee, M.-S., 2014. Monitoring Antigenic Variations of Enterovirus 71: Implications for Virus Surveillance and Vaccine Development. *PLoS Negl Trop Dis* 8, e3044.
- Chik, A.H.S., Glier, M.B., Servos, M., Mangat, C.S., Pang, X.-L., Qiu, Y., D'Aoust, P.M., Burnet, J.-B., Delatolla, R., Dorner, S., Geng, Q., Giesy, J.P., McKay, R.M., Mulvey, M.R., Prystajek, N., Srikanthan, N., Xie, Y., Conant, B., Hrudefy, S.E., 2021. Comparison of approaches to quantify SARS-CoV-2 in wastewater using RT-qPCR: Results and implications from a collaborative inter-laboratory study in Canada. *Journal of Environmental Sciences* 107, 218–229.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J., 1979. Isolation of Biologically Active Ribonucleic Acid from Sources Enriched in Ribonuclease. *Journal of Virology* 31, 100–104.
- Cho, H.G., Lee, S.G., Lee, M.Y., Hur, E.S., Lee, J.S., Park, P.H., Park, Y.B., Yoon, M.H., Paik, S.Y., 2016. An outbreak of norovirus infection associated with fermented oyster consumption in South Korea, 2013. *Epidemiol. Infect.* 144, 2759–2764.
- Choe, J.S., Bang, K.W., Lee, J.H., 2002. Characterisation of surface runoff in urban areas. *Water Sci Technol* 45:249–254
- Chowdhary, R., Shukla, A., Datta, T., Dhole, T.N., 2005. Rapid Detection of Sewage Sample Polioviruses by Integrated Cell Culture Polymerase Chain Reaction. *Archives of Environmental & Occupational Health* 60, 223–228.
- Clarke, I.N., Estes, M.K., Green, K.Y., Hansman, G.S., Knowles, N.J., Koopmans, M.K., Matson, D.O., Meyers, G., Neill, J.D. and Radford, A., 2012. Caliciviridae, p 977–986. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, San Diego, CA.
- CNR Virus entériques, 2020. <https://www.cnr-ve.org/index.html>
- Cordey, S., Vu, D.-L., Schibler, M., L'Huillier, A.G., Brito, F., Docquier, M., Posfay-Barbe, K.M., Petty, T.J., Turin, L., Zdobnov, E.M., Kaiser, L., 2016. Astrovirus MLB2, a New Gastroenteric Virus Associated with Meningitis and Disseminated Infection. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 846–853.
- Corpus, M.V.A., Buonerba, A., Vigliotta, G., Zarra, T., Ballesteros, F., Campiglia, P., Belgiorno, V., Korshin, G., Naddeo, V., 2020. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. *Science of The Total Environment* 745, 140910.
- Coudray-Meunier, C., Fraise, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Delannoy, S., Fach, P., Perelle, S., 2015. A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of Hepatitis A virus and Norovirus in lettuce and water samples. *International Journal of Food Microbiology* 201, 17–26.
- Coursaget P, Lesage G, Yvonnet B, Goudeau A, Maupas P. Frequency of inapparent hepatitis A infection. *Biomedicine.* 1980 Dec;33(8):246-7. PMID: 7213922.
- Croxson, M.C., Bellamy, A.R., 1981. Extraction of rotavirus from human feces by treatment with lithium dodecyl sulfate. *Appl Environ Microbiol* 41, 255–260.
- Cunliffe, N.A., Glass, R.I., Nakagomi, O., 2014. Rotavirus and Other Viral Diarrhoea. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 100–107.
- Da Silva, A.K., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Pommepuy, M., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2007. Evaluation of Removal of Noroviruses during Wastewater Treatment, Using Real-Time Reverse Transcription-PCR: Different Behaviors of Genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol* 73, 7891–7897.
- Da Silva, A.K. da, Guyader, F.S.L., Saux, J.-C.L., Pommepuy, M., Montgomery, M.A., Elimelech, M., 2008. Norovirus Removal and Particle Association in a Waste Stabilization Pond. *Environ. Sci. Technol.* 42, 9151–9157.
- Dalton, H.R., Bendall, R., Ijaz, S., Banks, M., 2008. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries 8. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1–7.
- Davis, R., Zivanovic, S., D'Souza, D.H., Davidson, P.M., 2012. Effectiveness of chitosan on the inactivation of enteric viral surrogates. *Food Microbiology* 32, 57–62.
- De Oliveira-Tozetto, S., Santiso-Bellón, C., Ferrer-Chirivella, J.M., Navarro-Lleó, N., Vila-Vicent, S., Rodríguez-Díaz, J., Buesa, J., 2021. Epidemiological and Genetic Characterization of Sapovirus in Patients with Acute Gastroenteritis in Valencia (Spain). *Viruses* 13, 184.
- De Valk, S., Khadem, A.F., Foreman, C.M., Van Lier, J.B., De Kreuk, M.K., 2017. Physical and biochemical changes in sludge upon Tubifex tubifex predation. *Environmental Technology* 38, 1524–1538.
- De Wit, M.A.S., Koopmans, M.P.G., Kortbeek, L.M., Wannet, W.J.B., Vinjé, J., Van Leusden, F., Bartelds, A.I.M., Van Duynhoven, Y.T.H.P., 2001. Sensor, a Population-based Cohort Study on Gastroenteritis in the Netherlands: Incidence and Etiology. *American Journal of Epidemiology* 154, 666–674.

- Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., Héchard, Y., 2013. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Research* 47, 6958–6965.
- Dennehy, P.H., Nelson, S.M., Spangenberg, S., Noel, J.S., Monroe, S.S., Glass, R.I., 2001. A Prospective Case-Control Study of the Role of Astrovirus in Acute Diarrhea among Hospitalized Young Children. *J INFECT DIS* 184, 10–15.
- Dermody TS, Parker JSL, Sherry B, 2013. Orthoreovirus. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*, vol 2. 6th edn. Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, pp 1304–1346.
- Dey, S.K., Hoq, I., Okitsu, S., Hayakawa, S., Ushijima, H., 2013. Prevalence, seasonality, and peak age of infection of enteric adenoviruses in Japan, 1995–2009. *Epidemiol. Infect.* 141, 958–960.
- Dey, S.K., Phathamavong, O., Nguyen, T.D., Thongprachum, A., Chan-It, W., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H., 2012. Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003–2009. *Epidemiol. Infect.* 140, 74–77.
- Di Profio, F., Melegari, I., Palombieri, A., Sarchese, V., Arbuatti, A., Fruci, P., Marsilio, F., Martella, V., Di Martino, B., 2019. High prevalence of hepatitis E virus in raw sewage in Southern Italy. *Virus Research* 272, 197710.
- 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.
- Dowd, S.E., Halonen, M.J., Maier, R.M., 2009. Immunological Methods, in: *Environmental Microbiology*. Elsevier, pp. 225–241.
- Drouaz, N., Schaeffer, J., Farkas, T., Le Pendu, J., Le Guyader, F.S., 2015. Tulane Virus as a Potential Surrogate To Mimic Norovirus Behavior in Oysters. *Appl Environ Microbiol* 81, 5249–5256.
- Duizer, E., Koopmans, M., 2006. Tracking emerging pathogens: the case of noroviruses. *EauFrance*. 2023. <https://services.eaufrance.fr/indicateurs/P254.3>
- El Samrani, A.G., Lartiges, B.S., Montargès-Pelletier, E., Kazpard, V., Barrès, O., Ghanbaja, J., 2004. Clarification of municipal sewage with ferric chloride: the nature of coagulant species. *Water Research* 38, 756–768.
- El-Senousy, W.M., Costafreda, M.I., Pintó, R.M., Bosch, A., 2013. Method validation for norovirus detection in naturally contaminated irrigation water and fresh produce. *International Journal of Food Microbiology* 167, 74–79.
- Falman, J.C., Fagnant-Sperati, C.S., Kossik, A.L., Boyle, D.S., Meschke, J.S., 2019. Evaluation of Secondary Concentration Methods for Poliovirus Detection in Wastewater. *Food Environ Virol* 11, 20–31.
- Farkas, T., Cross, R.W., Hargitt, E., Lerche, N.W., Morrow, A.L., Sestak, K., 2010. Genetic Diversity and Histo-Blood Group Antigen Interactions of Rhesus Enteric Caliciviruses. *J Virol* 84, 8617–8625.
- Farkas, T., Lun, C.W.P., Fey, B., 2014. Relationship between genotypes and serotypes of genogroup 1 reoviruses: a model for human norovirus antigenic diversity. *Journal of General Virology* 95, 1469–1478.
- 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.
- Farkas, T., Wong Ping Lun, C., 2014. Prevalence of Recovirus-Neutralizing Antibodies in Human Serum Samples. *J Clin Microbiol* 52, 3088–3090.
- Farthing, M., Salam, M.A., Lindberg, G., Dite, P., Khalif, I., Salazar-Lindo, E., Ramakrishna, B.S., Goh, K.-L., Thomson, A., Khan, A.G., Krabshuis, J., LeMair, A., 2013. Acute Diarrhea in Adults and Children: A Global Perspective. *Journal of Clinical Gastroenterology* 47, 12–20.
- Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O’Flaherty, V., Doré, W., 2013. Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. *Water Research* 47, 5222–5231.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633.
- Flood, J.A., Ashbolt, N., 1999. Virus-sized particles can be entrapped and concentrated one hundred-fold within wetland biofilms (Reprinted from *Advances in Environmental Research*, vol 3, pg 403-411, 2000).
- Fong, T.-T., Phanikumar, M.S., Xagorarakis, I., Rose, J.B., 2010. Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. *Appl Environ Microbiol* 76, 715–723.

- Fontvieille, D.A., Outaguerouine, A., Thevenot, D.R., 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges. *Environmental Technology* 13, 531–540.
- Forés, E., Bofill-Mas, S., Itarte, M., Martínez-Puchol, S., Hundesa, A., Calvo, M., Borrego, C.M., Corominas, L.L., Girones, R., Rusiñol, M., 2021. Evaluation of two rapid ultrafiltration-based methods for SARS-CoV-2 concentration from wastewater. *Science of The Total Environment* 768, 144786.
- Forterre, P., 2017. Viruses in the 21st Century: From the Curiosity-Driven Discovery of Giant Viruses to New Concepts and Definition of Life. *Clinical Infectious Diseases* 65, S74–S79.
- Fumian, T.M., Fioretti, J.M., Lun, J.H., dos Santos, I.A.L., White, P.A., Miagostovich, M.P., 2019. Detection of norovirus epidemic genotypes in raw sewage using next generation sequencing. *Environment International* 123, 282–291.
- Fumian, T.M., Leite, J.P.G., Castello, A.A., Gaggero, A., Caillou, M.S.L.D., Miagostovich, M.P., 2010. Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. *Journal of Virological Methods* 170, 42–46.
- Furuse, K. Distribution of coliphages in the environment: general considerations. *Phage ecology*, 1987, p. 87-124.
- Gan, S.D., Patel, K.R., 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1–3.
- Gao, Y., Shi, X., Jin, X., Wang, X., Jin, P., 2023. A critical review of wastewater quality variation and in-sewer processes during conveyance in sewer systems. *Water Res.* 228, 119398.
- Galaxy (plateformes), 2023. <https://galaxy.pasteur.fr/> et <https://usegalaxy.eu/>
- Garg, A., Narasimman, L.M., Hogg, J., Nutter, A., Mahoney, G., 2016. Wastewater Disinfection with Peracetic Acid. *proc water environ fed 2016*, 1798–1808.
- 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., Abd-Elmaksoud, S., Newick, H., El-Esnawy, N.A., Barakat, A., Ghanem, H., 2015. Assessment of Coliphage Surrogates for Testing Drinking Water Treatment Devices. *Food Environ Virol* 7, 27–31.
- 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. *Journal of Water and Health* 12, 452–464.
- Gibson, K.E., Schwab, K.J., Spencer, S.K., Borchardt, M.A., 2012. Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples. *Water Research* 46, 4281–4291.
- Giordano, M. O. M.S., Martínez, L. C., Isa, B., Ferreyra, L. J., Canna, F., Paván, J. V., Paez, M.D., Vergara, M., Notario, R., Nates, S. V. Twenty-year study of the occurrence of reovirus infection in hospitalized children with acute gastroenteritis in argentina. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 21(9):p 880-882, September 2002.
- Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas, S., 2010. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. *Water Research In Press*, Corrected Proof.
- Girón-Guzmán, I., Díaz-Reolid, A., Cuevas-Ferrando, E., Falcó, I., Cano-Jiménez, P., Comas, I., Pérez-Cataluña, A., Sánchez, G., 2023. Evaluation of two different concentration methods for surveillance of human viruses in sewage and their effects on SARS-CoV-2 sequencing. *Science of The Total Environment* 862, 160914.
- Gonzales-Gustavson, E., Cárdenas-Youngs, Y., Calvo, M., Da Silva, M.F.M., Hundesa, A., Amorós, I., Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., Rosell, R., Ganges, L., Araujo, R., Girones, R., 2017. Characterization of the efficiency and uncertainty of skimmed milk flocculation for the simultaneous concentration and quantification of water-borne viruses, bacteria and protozoa. *Journal of Microbiological Methods* 134, 46–53.
- Goosney, D.L., Nemerow, G.R., 2003. Adenovirus Infection: Taking the Back Roads to Viral Entry. *Current Biology* 13, R99–R100.
- Grabow, W., 2004a. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *WSA* 27, 251–268.
- Grabow, W., 2004b. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *WSA* 27, 251–268.
- Graham, D.Y., Dufour, G.R., Estes, M.K., 1987. Minimal infective dose of rotavirus. *Archives of Virology* 92, 261–271.

- Grant, S.B., List, E.J., Lidstrom, M.E., 1993. Kinetic analysis of virus adsorption and inactivation in batch experiments. *Water Resour. Res.* 29, 2067–2085.
- Grant, T., Grigorieff, N., 2015. Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6. *eLife* 4, e06980.
- Gregory, J., 2013. *Encyclopedia of colloid and interface science*. Springer Berlin
- Greninger, A.L., Runckel, C., Chiu, C.Y., Haggerty, T., Parsonnet, J., Ganem, D., DeRisi, J.L., 2009. The complete genome of klassevirus – a novel picornavirus in pediatric stool. *Virology Journal*.
- Grøndahl-Rosado, R.C., Yarovitsyna, E., Trettenes, E., Myrmel, M., Robertson, L.J., 2014. A One Year Study on the Concentrations of Norovirus and Enteric Adenoviruses in Wastewater and A Surface Drinking Water Source in Norway. *Food Environ Virol* 6, 232–245.
- Guix, S., Bosch, A. and Pintó, R.M. 2013. *Astrovirus Research*, pp. 97-118, Springer.
- Guzmán, C., Jofre, J., Blanch, A.R., Lucena, F., 2007. Development of a feasible method to extract somatic coliphages from sludge, soil and treated biowaste. *Journal of Virological Methods* 144, 41–48.
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Überla, K., Wilhelm, M., 2009. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Research* 43, 2657–2668.
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M., 2011. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 424–436.
- Hamza, I.A., Leifels, M., 2024. Assessment of PCR Inhibitor Removal Methods to Monitor Viruses in Environmental Water Samples: DAX-8 Outperforms Competitors. *Water Air Soil Pollut* 235, 20.
- Harada, S., Tokuoka, E., Kiyota, N., Katayama, K., Oka, T., 2013. Phylogenetic Analysis of the Nonstructural and Structural Protein Encoding Region Sequences, Indicating Successive Appearance of Genomically Diverse Sapovirus Strains from Gastroenteritis Patients. *Jpn J Infect Dis* 66, 454–457.
- Haramoto, E., Fujino, S., Otagiri, M., 2015. Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment* 520, 32–38.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Ohgaki, S., 2007. Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments: Quantification of human adenoviruses in water. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2153–2159.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Hata, A., Torrey, J.R., Masago, Y., Sano, D., Katayama, H., 2018. A review on recent progress in the detection methods and prevalence of human enteric viruses in water. *Water Research* 135, 168–186.
- Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., Ohgaki, S., 2010. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Research* 44, 1747–1752.
- Hardstaff, J.L., Clough, H.E., Lutje, V., McIntyre, K.M., Harris, J.P., Garner, P., O'Brien, S.J., 2018. Foodborne and Food-Handler Norovirus Outbreaks: A Systematic Review. *Foodborne Pathogens and Disease* 15, 589–597.
- Harrach, B., Benkö, M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A. and Lehmkuhl, H.D. (2012) Family Adenoviridae, p 125–141. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.
- 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.
- Havelaar, A.H., Meulemans, C.C.E., Pot-Hogeeoom, W.M., Koster, J., 1990. Inactivation of bacteriophage MS2 in wastewater effluent with monochromatic and polychromatic ultraviolet light. *Water Research* 24, 1387–1393.
- Hayes, E.K., Stoddart, A.K., Gagnon, G.A., 2022. Adsorption of SARS-CoV-2 onto granular activated carbon (GAC) in wastewater: Implications for improvements in passive sampling. *Science of The Total Environment* 847, 157548.
- He, Z., Parra, B., Nesme, J., Smets, B.F., Dechesne, A., 2022. Quantification and fate of plasmid-specific bacteriophages in wastewater: Beyond the F-coliphages. *Water Research* 227, 119320.
- Heiderscheidt, E., Leiviskä, T., Kløve, B., 2016. Coagulation of humic waters for diffused pollution control and the influence of coagulant type on DOC fractions removed. *Journal of Environmental Management* 181, 883–893.

- Hellmér, M., Paxéus, N., Magnius, L., Enache, L., Arnholm, B., Johansson, A., Bergström, T., Norder, H., 2014. Detection of Pathogenic Viruses in Sewage Provided Early Warnings of Hepatitis A Virus and Norovirus Outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 80, 6771–6781.
- Hennechart-Collette, C., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2015. Determination of which virus to use as a process control when testing for the presence of hepatitis A virus and norovirus in food and water. *International Journal of Food Microbiology* 202, 57–65.
- 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. *Journal of Infectious Diseases* 158, 182–185.
- Hewitt, J., Leonard, M., Greening, G.E., Lewis, G.D., 2011. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. *Water Research* 45, 6267–6276.
- Hierholzer, J.C., Killington, R.A., 1996. Virus isolation and quantitation, in: *Virology Methods Manual*. Elsevier, pp. 25–46.
- Hjelmsø, M.H., Hellmér, M., Fernandez-Cassi, X., Timoneda, N., Lukjancenko, O., Seidel, M., Elsässer, D., Aarestrup, F.M., Löfström, C., Bofill-Mas, S., Abril, J.F., Girones, R., Schultz, A.C., 2017. Evaluation of Methods for the Concentration and Extraction of Viruses from Sewage in the Context of Metagenomic Sequencing. *PLoS ONE* 12, e0170199.
- Hoorfar, J., Wolffs, P., Rådström, P., 2004. Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. *APMIS* 112, 808–814.
- Hoy, M.A., 2019. DNA Sequencing and the Evolution of the “-Omics,” in: *Insect Molecular Genetics*. Elsevier, pp. 223–262.
- Hsueh, T.-Y., Gibson, K.E., 2015. Interactions between Human Norovirus Surrogates and *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 4005–4013.
- Huang, T., Wu, H.-X., Chen, Q.-J., 2006. Experimental study on killing tubifex in drinking water. 38. 263-268
- Huggett, J.F., Novak, T., Garson, J.A., Green, C., Morris-Jones, S.D., Miller, R.F., Zumla, A., 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Res Notes* 1, 70.
- Hughes, J., Cowper-Heays, K., Olesson, E., Bell, R., Stroombergen, A., 2021. Impacts and implications of climate change on wastewater systems: A New Zealand perspective. *Climate Risk Management* 31, 100262.
- Hurst, C.J., Dahling, D.R., Safferman, R.S., Goyke, T., 1984. Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples. *Can. J. Microbiol.* 30, 1253–1263.
- Hurwitz, B.L., Deng, L., Poulos, B.T., Sullivan, M.B., 2013. Evaluation of methods to concentrate and purify ocean virus communities through comparative, replicated metagenomics. *Environmental Microbiology* 15, 1428–1440.
- Hwang, S., Alhatlani, B., Arias, A., Caddy, S.L., Christodoulou, C., Bragazzi Cunha, J., Emmott, E., Gonzalez-Hernandez, M., Kolawole, A., Lu, J., Ripinger, C., Sorgeloos, F., Thorne, L., Vashist, S., Goodfellow, I., Wobus, C.E., 2014. Murine Norovirus: Propagation, Quantification, and Genetic Manipulation. *Current Protocols in Microbiology* 33.
- Ibrahim, C., Hammami, S., Mejri, S., Mehri, I., Pothier, P., Hassen, A., 2017. Detection of Aichi virus genotype B in two lines of wastewater treatment processes. *Microbial Pathogenesis* 109, 305–312.
- Ibrahim, Y., Ouda, M., Kadadou, D., Banat, F., Naddeo, V., Alsafar, H., Yousef, A.F., Barceló, D., Hasan, S.W., 2021. Detection and removal of waterborne enteric viruses from wastewater: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 105613.
- Ikner, L.A., Soto-Beltran, M., Bright, K.R., 2011. New Method Using a Positively Charged Microporous Filter and Ultrafiltration for Concentration of Viruses from Tap Water. *Appl Environ Microbiol* 77, 3500–3506.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M.F.P., Yong, W.H., 2019. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining, in: Yong, W.H. (Ed.), *Biobanking, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 299–311.
- International Committee on Taxonomy of Viruses, King, A.M.Q. (Eds.), 2012a. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London ; Waltham, MA.

- Iwakiri, A., Ganmyo, H., Yamamoto, S., Otao, K., Mikasa, M., Kizoe, S., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N., Oka, T., 2009. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch Virol* 154, 689–693.
- Jackson, G.G., Muldoon, R.L., 1973. Viruses Causing Common Respiratory Infection in Man. IV. Reoviruses and Adenoviruses. *Journal of Infectious Diseases* 128, 811–866.
- Janowski, A.B., Wang, D., 2019. Infection and Propagation of Astrovirus VA1 in Cell Culture. *CP Microbiology* 52, e73.
- Jin, H.X., Seo, S.B., Lee, H.Y., Cho, S., Ge, J., King, J., Budowle, B., Lee, S.D., 2014. Differences of PCR efficiency between two-step PCR and standard three-step PCR protocols in short tandem repeat amplification. *Australian Journal of Forensic Sciences* 46, 80–90.
- Ijzerman, M.M., Dahling, D.R. and Fout, G.S., 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 63, 145–153.
- Jofre, J., 2009. Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? *Journal of Applied Microbiology* 106, 1059–1069.
- Johansson, H., P.J., Bergentoft, K., Larsson, P.A., Magnusson, G., Widell, A., Thorhagen, M., Hedlund, K.-O., 2005. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 37, 200–204.
- Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M. and Ulrich, R.G., 2014. Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses. *Infection, Genetics and Evolution* 27, 212–229. Jonassen, T.O., Monceyron, C., Lee, T.W., Kurtz, J.B. and Grinde, B. (1995) Detection of all serotypes of human astrovirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 52(3), 327–334.
- Jones, D.L., Grimsley, J.M.S., Kevill, J.L., Williams, R., Pellett, C., Lambert-Slosarska, K., Singer, A.C., Williams, G.B., Bargiela, R., Brown, R.W., Wade, M.J., Farkas, K., 2022. Critical Evaluation of Different Passive Sampler Materials and Approaches for the Recovery of SARS-CoV-2, Faecal-Indicator Viruses and Bacteria from Wastewater. *Water* 14, 3568.
- Jubelt, B., Lipton, H.L., 2014. Enterovirus/Picornavirus infections, in: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier, pp. 379–416.
- Juel, M.A.I., Stark, N., Nicolosi, B., Lontai, J., Lambirth, K., Schlueter, J., Gibas, C., Munir, M., 2021. Performance evaluation of virus concentration methods for implementing SARS-CoV-2 wastewater based epidemiology emphasizing quick data turnaround. *Science of The Total Environment* 801, 149656.
- Kaikkonen, S., Räsänen, S., Rämetsä, M., Vesikari, T., 2010. Aichi virus infection in children with acute gastroenteritis in Finland. *Epidemiol. Infect.* 138, 1166–1171.
- Kaneko, H., Maruko, I., Iida, T., Ohguchi, T., Aoki, K., Ohno, S., Suzutani, T., 2008. The Possibility of Human Adenovirus Detection From the Conjunctiva in Asymptomatic Cases During Nosocomial Infection. *Cornea* 27, 527–530.
- 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.
- Kapoor, A., Victoria, J., Simmonds, P., Slikas, E., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Sharif, S., Alam, M.M., Angez, M., Wang, C., Shafer, R.W., Zaidi, S., Delwart, E., 2008. A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20482–20487.
- Kargar, M., Javdani, N., Najafi, A., Tahamtan, Y., 2013. First molecular detection of group A rotavirus in urban and hospital sewage systems by nested-RT PCR in Shiraz, Iran. *J Environ Health Sci Engineer* 11, 4.
- Karst, S.M., Wobus, C.E., Lay, M., Davidson, J., Virgin, H.W., 2003. STAT1-Dependent Innate Immunity to a Norwalk-Like Virus. *Science* 299, 1575–1578.
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H., Ohgaki, S., 2008. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Research* 42, 1441–1448.
- Katzenelson, E., Fattal, B., Hostovesky, T., 1976. Organic Flocculation: an Efficient Second-Step Concentration Method for the Detection of Viruses in Tap Water. *Appl Environ Microbiol* 32, 638–639.

- Kazancı, N., GiRgin, S., 1996. Distribution of Oligochaeta species as bioindicators of organic pollution in Ankara Stream and their use in biomonitoring.
- Kepner, R.L., Pratt, J.R., 1994. Use of Fluorochromes for Direct Enumeration of Total Bacteria in Environmental Samples: Past and Present 58.
- Kesheh, M.M., Khatami, A., Saadati, H., Jabbari, M., Razizadeh, M.H., Fatemipour, M., Ghorbani, S., Soleimani, A., 2022. Salivirus infection: Systematic review and meta-analysis of association with gastrointestinal symptoms in children. *Reviews in Medical Virology* 32, e2238.
- Kevill, J.L., Lambert-Slosarska, K., Pellett, C., Woodhall, N., Richardson-O'Neill, I., Pântea, I., Alex-Sanders, N., Farkas, K., Jones, D.L., 2022. Assessment of two types of passive sampler for the efficient recovery of SARS-CoV-2 and other viruses from wastewater. *Science of The Total Environment* 838, 156580.
- Kirchhoff, C.J., Watson, P.L., 2019. Are Wastewater Systems Adapting to Climate Change? *J American Water Resour Assoc* 55, 869–880.
- Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2014. Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes — Identification of potential viral indicators. *Science of The Total Environment* 488–489, 290–296.
- Kitis, M., 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment International* 30, 47–55.
- Klimaszyk, P., Rzymyski, P., Piotrowicz, R., Joniak, T., 2015. Contribution of surface runoff from forested areas to the chemistry of a through-flow lake. *Environ Earth Sci* 73, 3963–3973.
- Klovins, J., Overbeek, G.P., Van Den Worm, S.H.E., Ackermann, H.-W., Van Duin, J., 2002. Nucleotide sequence of a ssRNA phage from Acinetobacter: kinship to coliphages. *Journal of General Virology* 83, 1523–1533.
- Koopmans, M., 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 187–205.
- Koukou, G., Niendorf, S., Hornei, B., Schlump, J.-U., Jenke, A.C., Jacobsen, S., 2019. Human astrovirus infection associated with encephalitis in an immunocompetent child: a case report. *J Med Case Reports* 13, 341.
- Kreder, C.A., 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* 62, 1102–1106.
- Kumblathan, T., Liu, Y., Uppal, G.K., Hruday, S.E., Li, X.-F., 2021. Wastewater-Based Epidemiology for Community Monitoring of SARS-CoV-2: Progress and Challenges. *ACS Environ. Au* 1, 18–31.
- Kunz, J.M., Lawinger, H., Miko, S., Gerdes, M., Thuneibat, M., Hannapel, E., Roberts, V.A., 2024. Surveillance of Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water — United States, 2015–2020. *MMWR Surveill. Summ.* 73, 1–23.
- Kuo, D.H.-W., Simmons, F.J., Blair, S., Hart, E., Rose, J.B., Xagorarakis, I., 2010. Assessment of human adenovirus removal in a full-scale membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water Research* 44, 1520–1530.
- La Rosa, G., Bonadonna, L., Lucentini, L., Kenmoe, S., Suffredini, E., 2020. Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review. *Water Research* 179, 115899.
- Langenfeld, K., Chin, K., Wigginton, K.R., Duhaime, M.B., 2020. Comparison of ultrafiltration and iron chloride flocculation in the preparation of aquatic viromes from contrasting sample types (preprint). *Microbiology*.
- Le Guyader, F.S., Le Saux, J.-C., Ambert-Balay, K., Krol, J., Serais, O., Parnaudeau, S., Giraudon, H., Delmas, G., Pommepuy, M., Pothier, P., Atmar, R.L., 2008. Aichi Virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus Involved in Clinical Cases from a French Oyster-Related Gastroenteritis Outbreak. *J Clin Microbiol* 46, 4011–4017.
- Le Guyader, F.S., Miura, T., Atmar, R.L., 2013. Prevalence and control of Norovirus and hepatitis A virus in shellfish, in: Smulders, F.J.M., Nørrung, B., Budka, H. (Eds.), *ECVPH Food Safety Assurance*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 137–168.
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., Delattre, J.M., 2001. Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters: H. LECLERC ET AL. *Journal of Applied Microbiology* 88, 5–21.
- Lee, L.E., Cebelinski, E.A., Fuller, C., Keene, W.E., Smith, K., Vinjé, J., Besser, J.M., 2012. Sapovirus Outbreaks in Long-Term Care Facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 873–876.
- Lee, S., Ihara, M., Yamashita, N., Tanaka, H., 2017. Improvement of virus removal by pilot-scale coagulation-ultrafiltration process for wastewater reclamation: Effect of optimization of pH in secondary effluent. *Water Research* 114, 23–30.

- Lee, S.-H., Kim, S.-J., 2002. Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. *Water Research* 36, 248–256.
- Leifels, M., Cheng, D., Sozzi, E., Shoults, D.C., Wuertz, S., Mongkolsuk, S., Sirikanchana, K., 2021. Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in environmental and food applications – A systematic review. *Water Research X* 11, 100080.
- Leifels, M., Dan, C., Sozzi, E., Shoults, D.C., Wuertz, S., Sirikanchana, K., 2020. 1 Capsid integrity quantitative PCR to determine virus infectivity in 2 environmental and food applications – a systematic review.
- Lewandowski, D.J., 2008. Tobamovirus, in: *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, pp. 68–72.
- L’Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, É., Lamontagne, A.-M., Ouardani, M., Lacroix, G., Simard, C., 2009. Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes* 39, 66–75.
- 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.
- Li, J., Verhagen, R., Ahmed, W., Metcalfe, S., Thai, P.K., Kaserzon, S.L., Smith, W.J.M., Schang, C., Simpson, S.L., Thomas, K.V., Mueller, J.F., Mccarthy, D., 2022. In Situ Calibration of Passive Samplers for Viruses in Wastewater. *ACS EST Water* 2, 1881–1890.
- Li, X., Cheng, Z., Dang, C., Zhang, M., Zheng, Y., Yu Xia, 2021. Metagenomic and viromic data mining reveals viral threats in biologically treated domestic wastewater. *Environmental Science and Ecotechnology* 7, 100105.
- Lin, J., Ganesh, A., 2013. Water quality indicators: bacteria, coliphages, enteric viruses. *International Journal of Environmental Health Research* 23, 484–506.
- Lizasoain, A., Tort, L.F.L., García, M., Gillman, L., Alberti, A., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Pou, S.A., Cagiao, A., Rzasap, A., Huertas, J., Berois, M., Victoria, M., Colina, R., 2018. Human enteric viruses in a wastewater treatment plant: evaluation of activated sludge combined with UV disinfection process reveals different removal performances for viruses with different features. *Lett Appl Microbiol* 66, 215–221.
- Loisy, F., Atmar, R.L., Le Saux, J.-C., Cohen, J., Caprais, M.-P., Pommepuy, M., Le Guyader, F.S., 2005. Use of Rotavirus Virus-Like Particles as Surrogates To Evaluate Virus Persistence in Shellfish. *Appl Environ Microbiol* 71, 6049–6053.
- Lorenzo-Morales, J., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Maciver, S.K., Coronado-Álvarez, N., 2007. Detection of Four Adenovirus Serotypes within Water-Isolated Strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 753–756.
- Lugo, D., Krogstad, P., 2016. Enteroviruses in the early 21st century: new manifestations and challenges. *Current Opinion in Pediatrics* 28, 107–113.
- Ma, L., Mao, G., Liu, J., Yu, H., Gao, G., Wang, Y., 2013. Rapid quantification of bacteria and viruses in influent, settled water, activated sludge and effluent from a wastewater treatment plant using flow cytometry. *Water Science and Technology* 68, 1763–1769.
- Madeley, C.R., Cosgrove, B.P., 1975. Viruses in infantile gastroenteritis. *The Lancet* 306, 124.
- Mallmann, L., Hermann, B.S., Schallenberger, K., Demoliner, M., Eisen, A.K.A., Heldt, F.H., Gularte, J.S., Hansen, A.W., De Almeida, P.R., Weber, M.N., Spilki, F.R., Fleck, J.D., 2021. Proteinase K treatment in absence of RNA isolation classical procedures is a quick and cheaper alternative for SARS-CoV-2 molecular detection. *Journal of Virological Methods* 293, 114131.
- Marsh, Z.A., Grytdal, S.P., Beggs, J.C., Leshem, E., Gastañaduy, P.A., Rha, B., Nyaku, M., Lopman, B.A., Hall, A.J., 2018. The unwelcome houseguest: secondary household transmission of norovirus. *Epidemiol. Infect.* 146, 159–167.
- Marshall, N.T., Vanderploeg, H.A., Chaganti, S.R., 2021. Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Sci Rep* 11, 2769.
- Martínez-Puchol, S., Rusiñol, M., Fernández-Cassi, X., Timoneda, N., Itarte, M., Andrés, C., Antón, A., Abril, J.F., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2020. Characterisation of the sewage virome: comparison of NGS tools and occurrence of significant pathogens. *Science of The Total Environment* 713, 136604.
- Masclaux, F.G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D., Oppliger, A., 2013. High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. *Water Research* 47, 5101–5109.

- Matsui S.M., Greenberg H.B. Astroviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields Virology*. 3rd edn. Lippincott-Raven; Philadelphia: 1996. pp. 875–893.
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Tatsuki, Y., Matsui, Y., 2013. Investigating norovirus removal by microfiltration, ultrafiltration, and precoagulation–microfiltration processes using recombinant norovirus virus-like particles and real-time immuno-PCR. *Water Research* 47, 5819–5827.
- Matthijnsens, J., Van Ranst, M., 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Current Opinion in Virology* 2, 426–433.
- Maunula, L., Miettinen, I.T., von Bonsdorff, C.-H., 2005. Norovirus Outbreaks from Drinking Water. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1716–1721.
- Maurya, A., Singh, M.K., Kumar, S., 2020. Biofiltration technique for removal of waterborne pathogens, in: *Waterborne Pathogens*. Elsevier, pp. 123–141.
- Maximova, O.A., Weller, M.L., Krogmann, T., Sturdevant, D.E., Ricklefs, S., Virtaneva, K., Martens, C., Wollenberg, K., Minai, M., Moore, I.N., Sauter, C.S., Barker, J.N., Lipkin, W.I., Seilhean, D., Nath, A., Cohen, J.I., 2023. Pathogenesis and outcome of VA1 astrovirus infection in the human brain are defined by disruption of neural functions and imbalanced host immune responses. *PLoS Pathog* 19, e1011544.
- Mayer, B.K., Yang, Y., Gerrity, D.W., Abbaszadegan, M., 2015. The Impact of Capsid Proteins on Virus Removal and Inactivation during Water Treatment Processes. *Microbiol Insights* 8s2, MBI.S31441.
- Mazaheritehrani, E., Sala, A., Orsi, C.F., Neglia, R.G., Morace, G., Blasi, E., Cermelli, C., 2014. Human pathogenic viruses are retained in and released by *Candida albicans* biofilm in vitro. *Virus Research* 179, 153–160.
- McCrary, M.H., 1915. The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube Results. *Journal of Infectious Diseases* 17, 183–212.
- Medema, G., Heijnen, L., Elsinga, G., Italiaander, R., Brouwer, A., 2020. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 7, 511–516.
- Méndez, E., Fernández-Luna, T., López, S., Méndez-Toss, M., Arias, C.F., 2002. Proteolytic Processing of a Serotype 8 Human Astrovirus ORF2 Polyprotein. *J Virol* 76, 7996–8002.
- Michen, B., Fritsch, J., Aneziris, C., Graule, T., 2013. Improved Virus Removal in Ceramic Depth Filters Modified with MgO. *Environ. Sci. Technol.* 130109072929009.
- Michen, B., Graule, T., 2010. Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology* 109, 388–397.
- Mikalsen, A.B., Nilsen, P., Frøystad-Saugen, M., Lindmo, K., Eliassen, T.M., Rode, M., Evensen, Ø., 2014. Characterization of a Novel Calicivirus Causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Proposal for a New Genus of Caliciviridae. *PLoS ONE* 9, e107132.
- Mikula, C., Springer, B., Reichart, S., Bierbacher, K., Lichtenschopf, A., Hoehne, M., 2010. Sapovirus in Adults in Rehabilitation Center, Upper Austria. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1186–1187.
- 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. *Journal of Virology* 87, 9441–9451.
- Miyoshi, M., Yoshizumi, S., Kanda, N., Karino, T., Nagano, H., Kudo, S., Okano, M., Ishida, S., 2010. Different Genotypic Sapoviruses Detected in Two Simultaneous Outbreaks of Gastroenteritis among Schoolchildren in the Same School District in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 63, 75–78.
- Monpoeho, S., Dehée, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.-C., Billaudel, S., Ferré, V., 2000. Quantification of Enterovirus RNA in Sludge Samples Using Single Tube Real-Time RT-PCR. *BioTechniques* 29, 88–93.
- Monpoeho, S., Maul, A., Mignotte-Cadiergues, B., Schwartzbrod, L., Billaudel, S., Ferre, V., 2001. Best Viral Elution Method Available for Quantification of Enteroviruses in Sludge by Both Cell Culture and Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2484–2488.
- Montazeri, N., Goettert, D., Achberger, E.C., Johnson, C.N., Prinyawiwatkul, W., Janes, M.E., 2015. Pathogenic Enteric Viruses and Microbial Indicators during Secondary Treatment of Municipal Wastewater. *Appl Environ Microbiol* 81, 6436–6445.

- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J. and Megraud, F. (1997) Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol* 35, 995–998.
- Moore, R.S., 1982. Adsorption of Reovirus by Minerals and Soils. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 44, 8.
- Moore, R.S., 1982. Adsorption of Reovirus by Minerals and Soils. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 44, 8.
- Morales-Morales, H.A., Vidal, G., Olszewski, J., Rock, C.M., Dasgupta, D., Oshima, K.H., Smith, G.B., 2003. Optimization of a Reusable Hollow-Fiber Ultrafilter for Simultaneous Concentration of Enteric Bacteria, Protozoa, and Viruses from Water. *Appl Environ Microbiol* 69, 4098–4102.
- Moser, L., Schultz-Cherry, S., 2008. Astroviruses, in: *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, pp. 204–210.
- Mustafa, H., Bishop, R.F. and Palombo, E.A., 2001. The biology and epidemiology of human astroviruses. *Reviews in Medical Microbiology* 12(2), 75-85.
- Nasser, A.M., Tchorch, Y., Fattal, B., 1995. Validity of serological methods (ELISA) for detecting infectious viruses in water.
- Ng, T.F.F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., Oderinde, B.S., Wommack, K.E., Delwart, E., 2012. High Variety of Known and New RNA and DNA Viruses of Diverse Origins in Untreated Sewage. *J Virol* 86, 12161–12175.
- Nicand E., Teyssou R. et Y. Buisson (1998) Le risque fécal viral en 1998, *Virologie*, 2: 103-16.
- Nielsen, A.C.Y., Gyhrs, M.L., Nielsen, L.P., Pedersen, C., Böttiger, B., 2013. Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus, and salivirus in young children. *Journal of Clinical Virology* 57, 239–242.
- Nordgren, J., Matussek, A., Mattsson, A., Svensson, L., Lindgren, P.-E., 2009. Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Research* 43, 1117–1125.
- Nosyk, O., ter Haseborg, E., Metzger, U., Frimmel, F.H., 2008. A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization. *Journal of Microbiological Methods* 75, 449–456.
- Novohradská, S., Ferling, I., Hillmann, F., 2017. Exploring Virulence Determinants of Filamentous Fungal Pathogens through Interactions with Soil Amoebae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 497.
- Novotny, C.P., Lavin, K., 1971. Some Effects of Temperature on the Growth of F Pili. *J Bacteriol* 107, 671–682.
- Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., 2003. Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus. *Appl Environ Microbiol* 69, 350–357.
- Obaideen, K., Shehata, N., Sayed, E.T., Abdelkareem, M.A., Mahmoud, M.S., Olabi, A.G., 2022. The role of wastewater treatment in achieving sustainable development goals (SDGs) and sustainability guideline. *Energy Nexus* 7, 100112.
- Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A., Gantzer, C., 2010. Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 8019–8025.
- Ogorzaly, L., Walczak, C., Galloux, M., Etienne, S., Gassilloud, B., Cauchie, H.-M., 2015. Human Adenovirus Diversity in Water Samples Using a Next-Generation Amplicon Sequencing Approach. *Food Environ Virol* 7, 112–121.
- Olszewski, J., Winona, L., Oshima, K.H., 2005. Comparison of 2 ultrafiltration systems for the concentration of seeded viruses from environmental waters. *Can. J. Microbiol.* 51, 295–303.
- Opel, K.L., Chung, D., McCord, B.R., 2010. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR\* †. *Journal of Forensic Sciences* 55, 25–33.
- O'Reilly, K.M., Allen, D.J., Fine, P., Asghar, H., 2020. The challenges of informative wastewater sampling for SARS-CoV-2 must be met: lessons from polio eradication. *The Lancet Microbe* 1, e189–e190.
- Ortmann, A.C., Suttle, C.A., 2009. Determination of Virus Abundance by Epifluorescence Microscopy, in: Clokie, M.R.J., Kropinski, A.M. (Eds.), *Bacteriophages, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 87–95.
- Otawa, K., Lee, S.H., Yamazoe, A., Onuki, M., Satoh, H., Mino, T., 2007. Abundance, Diversity, and Dynamics of Viruses on Microorganisms in Activated Sludge Processes. *Microb Ecol* 53, 143–152.
- Owen, A.T., Fawell, P.D., Swift, J.D., Farrow, J.B., 2002. The impact of polyacrylamide flocculant solution age on flocculation performance. *International Journal of Mineral Processing* 67, 123–144.
- Payne, S., 2017. Methods to Study Viruses, in: *Viruses*. Elsevier, pp. 37–52.

- Pecson, B.M., Darby, E., Haas, C.N., Amha, Y.M., Bartolo, M., Danielson, R., Dearborn, Y., Di Giovanni, G., Ferguson, C., Fevig, S., Gaddis, E., Gray, D., Lukasik, G., Mull, B., Olivas, L., Olivieri, A., Qu, Y., SARS-CoV-2 Interlaboratory Consortium, 2021. Reproducibility and sensitivity of 36 methods to quantify the SARS-CoV-2 genetic signal in raw wastewater: findings from an interlaboratory methods evaluation in the U.S. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 7, 504–520.
- 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.
- Pepper, I.L., Gerba, C.P., 2015. Environmental Sample Collection and Processing, in: *Environmental Microbiology*. Elsevier, pp. 157–175.
- Phan, T.G., Okame, M., Nguyen, T.A., Maneekarn, N., Nishio, O., Okitsu, S., Ushijima, H., 2004. Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. *Journal of Medical Virology* 73, 256–261.
- Pina, S., Jofre, J., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Girones, R., 1998. Characterization of a Strain of Infectious Hepatitis E Virus Isolated from Sewage in an Area where Hepatitis E Is Not Endemic. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 4.
- Polanco, J.A., Safarik, J., Dadakis, J.S., Johnson, C., Plumlee, M.H., 2023. Enteric virus removal by municipal wastewater treatment to achieve requirements for potable reuse. *PLOS Water* 2, e0000052.
- Polkowska, A., Räsänen, S., Al-Hello, H., Bojang, M., Lyytikäinen, O., Nuorti, J.P., Jalava, K., 2018. An outbreak of Norovirus infections associated with recreational lake water in Western Finland, 2014. *Epidemiol. Infect.* 146, 544–550.
- Pourcel, C., Midoux, C., Hauck, Y., Vergnaud, G., Latino, L., 2017. Large Preferred Region for Packaging of Bacterial DNA by phiC725A, a Novel *Pseudomonas aeruginosa* F116-Like Bacteriophage. *PLoS ONE* 12, e0169684.
- Prado, T., de Castro Bruni, A., Barbosa, M.R.F., Garcia, S.C., de Jesus Melo, A.M., Sato, M.I.Z., 2019. Performance of wastewater reclamation systems in enteric virus removal. *Science of The Total Environment* 678, 33–42.
- Prado, T., Gaspar, A.M.C., Miagostovich, M.P., 2014. Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods. *Braz. J. Microbiol.* 45, 343–349.
- Prado, T., Silva, D.M., Guilayn, W.C., Rose, T.L., Gaspar, A.M.C., Miagostovich, M.P., 2011. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. *Water Research* 45, 1287–1297.
- Prata, C., Ribeiro, A., Cunha, Â., Gomes, Newton.C.M., Almeida, A., 2012. Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. *J. Environ. Monit.* 14, 64–70.
- Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2016. Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Research* 91, 68–76.
- 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. *Environment International* 79, 42–50.
- Pulicharla, R., Kaur, G., Brar, S.K., 2021. A year into the COVID-19 pandemic: Rethinking of wastewater monitoring as a preemptive approach. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9, 106063.
- Qiu, Y., Lee, B.E., Neumann, N., Ashbolt, N., Craik, S., Maal-Bared, R., Pang, X.L., 2015. Assessment of human virus removal during municipal wastewater treatment in Edmonton, Canada. *J Appl Microbiol* 119, 1729–1739.
- Qiu, Y., Lee, B.E., Ruecker, N.J., Neumann, N., Ashbolt, N., Pang, X., 2016. A one-step centrifugal ultrafiltration method to concentrate enteric viruses from wastewater. *Journal of Virological Methods* 237, 150–153.
- Qiu, Y., Li, Q., Lee, B.E., Ruecker, N.J., Neumann, N.F., Ashbolt, N.J., Pang, X., 2018. UV inactivation of human infectious viruses at two full-scale wastewater treatment plants in Canada. *Water Research* 147, 73–81.
- Queiroz, A.P.S., Santos, F.M., Sassaroli, A., Hársi, C.M., Monezi, T.A., Mehnert, D.U., 2001. Electropositive Filter Membrane as an Alternative for the Elimination of PCR Inhibitors from Sewage and Water Samples. *Appl Environ Microbiol* 67, 4614–4618.
- Quignon, F., Sardin, M., Kiene, L., Schwartzbrod, L., 1997. Poliovirus-1 Inactivation and Interaction with Biofilm: a Pilot-Scale Study. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 63, 5.

- Rački, N., Dreo, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., Ravnikar, M., 2014. Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples. *Plant Methods* 10, 42.
- Rajal, V., Mcswain, B., Thompson, D., Leutenegger, C., Kildare, B., Wuertz, S., 2007. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. *Water Research* 41, 1411–1422.
- Rappaport, I., 1965. Some studies of the infectious process with MS2 bacteriophage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 103, 486–494.
- Raymond, P., Paul, S., Perron, A., Bellehumeur, C., Larocque, É., Charest, H., 2022. Detection and Sequencing of Multiple Human Norovirus Genotypes from Imported Frozen Raspberries Linked to Outbreaks in the Province of Quebec, Canada, in 2017. *Food Environ Virol* 14, 40–58.
- Redman, J.A., Grant, S., Olson, T.M., Adkins, J.M., Jackson, J.L., Castillo, M.S., Yanko, W.A., 1999. Physicochemical mechanisms responsible for the filtration and mobilization of a filamentous bacteriophage in quartz sand. *Water Research* 33, 43–52.
- Redman, J.A., Grant, S.B., Olson, T.M., Hardy, M.E., Estes, M.K., 1997. Filtration of Recombinant Norwalk Virus Particles and Bacteriophage MS2 in Quartz Sand: Importance of Electrostatic Interactions. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3378–3383.
- Réseau Sentinelles, 2022. <https://www.sentiweb.fr/?page=maladies&mal=6>
- Reuter, J.A., Spacek, D.V., Snyder, M.P., 2015. High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell* 58, 586–597.
- Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling Bacterial Biofilms. *ChemBioChem* 10, 2287–2294.
- Richter, Ł., Książczyk, K., Paszkowska, K., Janczuk-Richter, M., Niedziółka-Jönsson, J., Gapiński, J., Łoś, M., Hołyst, R., Paczesny, J., 2021. Adsorption of bacteriophages on polypropylene labware affects the reproducibility of phage research. *Sci Rep* 11, 7387.
- Rivadulla, E., Varela, M.F., Romalde, J.L., 2019. Epidemiology of Aichi virus in fecal samples from outpatients with acute gastroenteritis in Northwestern Spain. *Journal of Clinical Virology* 118, 14–19.
- Rock, C., Alum, A., Abbaszadegan, M., 2010. PCR Inhibitor Levels in Concentrates of Biosolid Samples Predicted by a New Method Based on Excitation-Emission Matrix Spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 76, 8102–8109.
- Rockx, B., De Wit, M., Vennema, H., Vinjé, J., De Bruin, E., Van Duynhoven, Y., Koopmans, M., 2002. Natural History of Human Calicivirus Infection: A Prospective Cohort Study. *CLIN INFECT DIS* 35, 246–253.
- Rockx, B.H.G., Vennema, H., Hoebe, C.J.P.A., Duizer, E., Koopmans, M.P.G., 2005. Association of Histo–Blood Group Antigens and Susceptibility to Norovirus Infections. *J INFECT DIS* 191, 749–754.
- Rodríguez-Lázaro, D., Cook, N., Ruggeri, F.M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M.S.J., D’Agostino, M., Santos, R., Saiz, J.C., Rzeżutka, A., Bosch, A., Gironés, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovač, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., Von Bonsdorff, C.-H., De Roda Husman, A.M., Hernández, M., Van Der Poel, W.H.M., 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev* 36, 786–814.
- Ryan, J.N., Harvey, R.W., Metge, D., Elimelech, M., Navigato, T., Pieper, A.P., 2002. Field and Laboratory Investigations of Inactivation of Viruses (PRD1 and MS2) Attached to Iron Oxide-Coated Quartz Sand. *Environ. Sci. Technol.* 36, 2403–2413.
- Saba, B., Hasan, S.W., Kjellerup, B.V., Christy, A.D., 2021. Capacity of existing wastewater treatment plants to treat SARS-CoV-2. A review. *Bioresource Technology Reports* 15, 100737.
- Sadeghi, G., Schijven, J.F., Behrends, T., Hassanizadeh, S.M., Gerritse, J., Kleingeld, P.J., 2011. Systematic Study of Effects of pH and Ionic Strength on Attachment of Phage PRD1. *Ground Water* 49, 12–19.
- Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H.L., Walsh, A., Ramsay, M., Morgan, D., on behalf of the Hepatitis E Incident Investigation Team, 2009. Hepatitis E Outbreak on Cruise Ship. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1738–1744.
- Sakai, Y., Nakata, S., Honma, S., Tatsumi, M., Numata-Kinoshita, K., Chiba, S., 2001. Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan: *The Pediatric Infectious Disease Journal* 20, 849–853.
- Sano, D., Fukushi, K., Yoshida, Y., Omura, T., 2003. Detection of enteric viruses in municipal sewage sludge by a combination of the enzymatic virus elution method and RT-PCR. *Water Research* 37, 3490–3498.
- Santé Publique France, Gastroentérites aiguës. 2022. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-hivernales/gastro-enterites-aigues>

- Scheid, P., Schwarzenberger, R., 2012. *Acanthamoeba* spp. as vehicle and reservoir of adenoviruses. *Parasitol Res* 111, 479–485.
- Schilling, K., Zessner, M., 2011. Foam in the aquatic environment. *Water Research* 45, 4355–4366.
- Schlindwein, A.D., Rigotto, C., Simões, C.M.O., Barardi, C.R.M., 2010. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Science and Technology* 61, 537–544.
- Schmidt, J.M., Stanier, R.Y., 1965. Isolation and Characterization of Bacteriophages Active against Stalked Bacteria. *Journal of General Microbiology* 39, 95–107.
- Schmitz, B.W., Kitajima, M., Campillo, M.E., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 2016. Virus Reduction during Advanced Bardenpho and Conventional Wastewater Treatment Processes. *Environ. Sci. Technol.* 50, 9524–9532.
- Schmitz, B., Wang, H., Schwab, K., Jacangelo, J., 2021. Selected Mechanistic Aspects of Viral Inactivation by Peracetic Acid. *Environ. Sci. Technol.* 55 (23),16120–16129
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 113, 1014–1026.
- Schwartzbrod, P.L., 1991. *Virologie des milieux hydriques (Lavoisier.)*. Paris.
- Schwartzbrod, P.L., 2000. Virus humains et sante publique : consequences de l'utilisation des eaux usees et des boues en agriculture et conchyliculture.
- Sdiri-Loulizi, K., Gharbi-Khelifi, H., De Rougemont, A., Hassine, M., Chouchane, S., Sakly, N., Pothier, P., Guédiche, M.N., Aouni, M., Ambert-Balay, K., 2009. Molecular epidemiology of human astrovirus and adenovirus serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. *Journal of Medical Virology* 81, 1895–1902.
- Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L., 2011. Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6884–6888.
- Sellami, M., Zarai, Z., Khadhraoui, M., Jdidi, N., Leduc, R., Ben Rebah, F., 2014. Cactus juice as bioflocculant in the coagulation–flocculation process for industrial wastewater treatment: a comparative study with polyacrylamide. *Water Science and Technology* 70, 1175–1181.
- Serra-Compte, A., González, S., Arnaldos, M., Berlendis, S., Courtois, S., Loret, J.F., Schlosser, O., Yáñez, A.M., Soria-Soria, E., Fittipaldi, M., Saucedo, G., Pinar-Méndez, A., Paraira, M., Galofré, B., Lema, J.M., Balboa, S., Mauricio-Iglesias, M., Bosch, A., Pintó, R.M., Bertrand, I., Gantzer, C., Montero, C., Litrico, X., 2021. Elimination of SARS-CoV-2 along wastewater and sludge treatment processes. *Water Research* 202, 117435.
- Servetas, S., Parratt, K., Brinkman, N., Shanks, O., Smith, T., Mattson, P. and Lin, N., 2022. Standards to Support an Enduring Capability in Wastewater Surveillance for Public Health: Where Are We? *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*.
- Shewa, W.A., Dagnew, M., 2020. Revisiting Chemically Enhanced Primary Treatment of Wastewater: A Review. *Sustainability* 12, 5928.
- Shieh, Y.-S.C., Wait, D., Tai, L., Sobsey, M.D., 1995. Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 54, 51–66.
- Shields, P.A., Farrah, S.R., 2002. Characterization of Virus Adsorption by Using DEAE-Sepharose and Octyl-Sepharose. *Appl Environ Microbiol* 68, 3965–3968.
- Shields, P.A., Farrah, S.R., 1986. Concentration of Viruses in Beef Extract by Flocculation with Ammonium Sulfate. *Journal of the Korean Geomorphological Association*. 2015;22(3):31–42.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Koriki, S., 2020. Suitability of pepper mild mottle virus as a human enteric virus surrogate for assessing the efficacy of thermal or free-chlorine disinfection processes by using infectivity assays and enhanced viability PCR. *Water Research* 186, 116409.
- Sidhu, J.P.S., Ahmed, W., Toze, S., 2013. Sensitive detection of human adenovirus from small volume of primary wastewater samples by quantitative PCR. *Journal of Virological Methods* 187, 395–400.
- Sidhu, J.P.S., Sena, K., Hodgers, L., Palmer, A., Toze, S., 2018. Comparative enteric viruses and coliphage removal during wastewater treatment processes in a sub-tropical environment. *Science of The Total Environment* 616–617, 669–677.

- Sidhu, J.P.S., Ahmed, W., Palmer, A., Smith, K., Hodgers, L., Toze, S., 2017. Optimization of sampling strategy to determine pathogen removal efficacy of activated sludge treatment plant. *Environ Sci Pollut Res* 24, 19001–19010.
- Sidstedt, M., Romsos, E.L., Hedell, R., Ansell, R., Steffen, C.R., Vallone, P.M., Rådström, P., Hedman, J., 2017. Accurate Digital Polymerase Chain Reaction Quantification of Challenging Samples Applying Inhibitor-Tolerant DNA Polymerases. *Anal. Chem.* 89, 1642–1649.
- Sidstedt, M., Rådström, P., Hedman, J., 2020. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem* 412, 2009–2023.
- Silva, H.D., Santos, S.F.O., Lima, A.P., Silveira-Lacerda, E.P., Anunciação, C.E., Garcíazapata, M.T.A., 2011. Correlation Analysis of the Seasonality of Adenovirus Gene Detection and Water Quality Parameters Based on Yearly Monitoring. *Water Qual Expo Health* 3, 101–107.
- Silverman, A.I., Akrong, M.O., Amoah, P., Drechsel, P., Nelson, K.L., 2013. Quantification of human norovirus GII, human adenovirus, and fecal indicator organisms in wastewater used for irrigation in Accra, Ghana. *Journal of Water and Health* 11, 473–488.
- Sima, L.C., Schaeffer, J., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Elimelech, M., Le Guyader, F.S., 2011. Calicivirus Removal in a Membrane Bioreactor Wastewater Treatment Plant. *Appl Environ Microbiol* 77, 5170–5177.
- Simmons, F.J., Xagorarakis, I., 2011. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Research* 45, 3590–3598.
- Smarzewska, S., Morawska, K., 2021. Handbook of Advanced Approaches Towards Pollution Prevention and Control. Chapter 1. Wastewater treatment technologies. Elsevier, Pages 3-32, ISBN 9780128221211.
- Smits, S.L., Rahman, M., Schapendonk, C.M.E., Van Leeuwen, M., Faruque, A.S.G., Haagmans, B.L., Endtz, H.P., Osterhaus, A.D.M.E., 2012. Calicivirus from Novel Recovirus Genogroup in Human Diarrhea, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1192–1195.
- Sobsey, M.D., Dean, C.H., Knuckles, M.E., Wagner, R.A., 1980. Interactions and Survival of Enteric Viruses in Soil Materials. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 40, 10.
- Somani, S.K., Aggarwal, R., Naik, S.R., Srivastava, S., Naik, S., 2003. A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. *Journal of Viral Hepatitis* 10, 446–449.
- Sousa, D., Dias, R., Lourinho, R., Maúrcio, R., 2023. Exploring the Potential of Peracetic Acid for Wastewater Disinfection: Insights from a Pilot-Scale Study. *J. Environ. Eng.* 150, 05023010.
- Staley, C., Gordon, K.V., Schoen, M.E., Harwood, V.J., 2012. Performance of Two Quantitative PCR Methods for Microbial Source Tracking of Human Sewage and Implications for Microbial Risk Assessment in Recreational Waters. *Appl Environ Microbiol* 78, 7317–7326.
- Storey, M.V., Ashbolt, N.J., 2001. Persistence of two model enteric viruses (B40-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms. *Water Science and Technology* 43, 133–138.
- Strubbia, S., Schaeffer, J., Oude Munnink, B.B., Besnard, A., Phan, M.V.T., Nieuwenhuijse, D.F., de Graaf, M., Schapendonk, C.M.E., Wacrenier, C., Cotten, M., Koopmans, M.P.G., Le Guyader, F.S., 2019. Metavirome Sequencing to Evaluate Norovirus Diversity in Sewage and Related Bioaccumulated Oysters. *Front. Microbiol.* 10, 2394.
- Stuart, A.D., Brown, T.D.K., 2006. Entry of Feline Calicivirus Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis and Acidification in Endosomes. *J Virol* 80, 7500–7509.
- Su, X., Zivanovic, S., D'Souza, D.H., 2009. Effect of Chitosan on the Infectivity of Murine Norovirus, Feline Calicivirus, and Bacteriophage MS2. *Journal of Food Protection* 72, 2623–2628.
- Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., Tait, K., 2004. The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 232, 1–6.
- Suttle, C.A., 2018a. Enumeration and Isolation of Viruses, in: Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. (Eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. CRC Press, pp. 121–134.
- Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., Król, M., 2018. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS ONE* 13, e0198943.
- Tamaki, H., Zhang, R., Angly, F.E., Nakamura, S., Hong, P., Yasunaga, T., Kamagata, Y., Liu, W., 2012. Metagenomic analysis of DNA viruses in a wastewater treatment plant in tropical climate. *Environmental Microbiology* 14, 441–452.

- Tandukar, S., Ghaju Shrestha, R., Malla, B., Sthapit, N., Sherchand, J.B., Sherchan, S.P., Haramoto, E., 2021. Virus reduction at wastewater treatment plants in Nepal. *Environmental Challenges* 5, 100281.
- Teh, C.Y., Budiman, P.M., Shak, K.P.Y., Wu, T.Y., 2016. Recent Advancement of Coagulation–Flocculation and Its Application in Wastewater Treatment. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55, 4363–4389.
- Tei, S., Kitajima, N., Ohara, S., Inoue, Y., Miki, M., Yamatani, T., Yamabe, H., Mishiro, S. and Kinoshita, Y. (2004) Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: An age-and sex-matched case-control study. *J Med Virol* 74(1), 67-70.
- Teixeira, P., Costa, S., Brown, B., Silva, S., Rodrigues, R., Valério, E., 2020. Quantitative PCR Detection of Enteric Viruses in Wastewater and Environmental Water Sources by the Lisbon Municipality: A Case Study. *Water* 12, 544.
- Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., E. Miller, S., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology* 80, 1468–1476.
- Thongprachum, A., Fujimoto, T., Takanashi, S., Saito, H., Okitsu, S., Shimizu, H., Khamrin, P., Maneekarn, N., Hayakawa, S., Ushijima, H., 2018. Detection of nineteen enteric viruses in raw sewage in Japan. *Infection, Genetics and Evolution* 63, 17–23.
- Tian, P., Yang, D., Quigley, C., Chou, M., Jiang, X., 2013. Inactivation of the Tulane Virus, a Novel Surrogate for the Human Norovirus. *Journal of Food Protection* 76, 712–718.
- Tortajada, C., 2020. Contributions of recycled wastewater to clean water and sanitation Sustainable Development Goals. *npj Clean Water* 3, 22.
- Tran, A., Talmud, D., Lejeune, B., Jovenin, N., Renois, F., Payan, C., Leveque, N., Andreoletti, L., 2010. Prevalence of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, and Astrovirus Infections and Coinfections among Hospitalized Children in Northern France. *J Clin Microbiol* 48, 1943–1946.
- Truchado, P., Garre, A., Gil, M.I., Simón-Andreu, P.J., Sánchez, G., Allende, A., 2021. Monitoring of human enteric virus and coliphages throughout water reuse system of wastewater treatment plants to irrigation endpoint of leafy greens. *Science of The Total Environment* 782, 146837.
- Tunçal, T., 2009. Determination of microbial responses to seasonal variations of wastewater composition in the izmir wastewater treatment plant. *Fresenius Environmental Bulletin* 18.
- United Nations, 2023. *Blueprint for Acceleration: Sustainable Development Goal 6 Synthesis Report on Water and Sanitation 2023*. United Nations.
- US EPA 1601, 2001. Method 1601: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure. [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/method\\_1601\\_2001.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/method_1601_2001.pdf)
- Van Den Berg, H., Lodder, W., Van Der Poel, W., Vennema, H., De Roda Husman, A.M., 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology* 156, 532–540.
- Verani, M., Di Giuseppe, G., Tammara, C., Carducci, A., 2016. Investigating the role of *Acanthamoeba polyphaga* in protecting Human Adenovirus from water disinfection treatment. *European Journal of Protistology* 54, 11–18.
- Verbyla, M.E., Mihelcic, J.R., 2015. A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Research* 71, 107–124.
- Veschetti, E., Cutilli, D., Bonadonna, L., Briancesco, R., Martini, C., Cecchini, G., Anastasi, P., Ottaviani, M., 2003. Pilot-plant comparative study of peracetic acid and sodium hypochlorite wastewater disinfection. *Water Research* 37, 78–94.
- Victoria, M., Guimarães, F.R., Fumian, T.M., Ferreira, F.F.M., Vieira, C.B., Shubo, T., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., 2010. One year monitoring of norovirus in a sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Water and Health* 8, 158–165.
- Victoria, M., Tort, L.F.L., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Cristina, J., Colina, R., 2014. Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol* 6, 116–124.
- Villalva, C., Touriol, C., Seurat, P., Tremat, P., Delsol, G. and Brousset, P. (2001) Increased yield of PCR products by addition of T4 gene 32 protein to the SMART PCR cDNA synthesis system. *Biotechniques* 31(1), 81-83, 86.
- Vincent-Hubert, F., Morga, B., Renault, T., Le Guyader, F.S., 2017. Adsorption of norovirus and ostreid herpesvirus type 1 to polymer membranes for the development of passive samplers. *J Appl Microbiol* 122, 1039–1047.

- Vincent-Hubert, F., Wacrenier, C., Desdouits, M., Jousse, S., Schaeffer, J., Le Mehaute, P., Nakache-Danglot, F., Le Guyader, F.S., Bertrand, I., Boni, M., Gantzer, C., Maday, Y., Marechal, V., Mouchel, J.-M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2022. Development of passive samplers for the detection of SARS-CoV-2 in sewage and seawater: Application for the monitoring of sewage. *Science of The Total Environment* 833, 155139.
- Vogelstein, B., Gillespie, D., 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 615–619.
- Wade, M.J., Lo Jacomo, A., Armenise, E., Brown, M.R., Bunce, J.T., Cameron, G.J., Fang, Z., Farkas, K., Gilpin, D.F., Graham, D.W., Grimsley, J.M.S., Hart, A., Hoffmann, T., Jackson, K.J., Jones, D.L., Lilley, C.J., McGrath, J.W., McKinley, J.M., McSparron, C., Nejad, B.F., Morvan, M., Quintela-Baluja, M., Roberts, A.M.I., Singer, A.C., Souque, C., Speight, V.L., Sweetapple, C., Walker, D., Watts, G., Weightman, A., Kasprzyk-Hordern, B., 2022. Understanding and managing uncertainty and variability for wastewater monitoring beyond the pandemic: Lessons learned from the United Kingdom national COVID-19 surveillance programmes. *Journal of Hazardous Materials* 424, 127456.
- 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 Research* 44, 1255–1269.
- Wang, H., Qi, J., Xiao, D., Wang, Z., Tian, K., 2017. A re-evaluation of dilution for eliminating PCR inhibition in soil DNA samples. *Soil Biology and Biochemistry* 106, 109–118.
- Wang, H., Tao, Z., Li, Y., Lin, X., Yoshida, H., Song, L., Zhang, Y., Wang, S., Cui, N., Xu, W., Song, Y., Xu, A., 2014. Environmental Surveillance of Human Enteroviruses in Shandong Province, China, 2008 to 2012: Serotypes, Temporal Fluctuation, and Molecular Epidemiology. *Appl Environ Microbiol* 80, 4683–4691.
- Wang, J., Chen, W., Wang, T., Reid, E., Krall, C., Kim, J., Zhang, T., Xie, X., Huang, C.-H., 2023. Bacteria and Virus Inactivation: Relative Efficacy and Mechanisms of Peroxyacids and Chlor(am)ine. *Environ. Sci. Technol.* 57, 18710–18721.
- Ward, R.L., Bernstein, D.I., Young, E.C., Sherwood, J.R., Knowlton, D.R., Schiff, G.M., 1986. Human Rotavirus Studies in Volunteers: Determination of Infectious Dose and Serological Response to Infection. *Journal of Infectious Diseases* 154, 871–880.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63, 3741–3751.
- Wingender, J., Flemming, H.-C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 417–423.
- Wobus, C.E., Thackray, L.B., 2006. Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis 80, 10.
- Wolf, S., Reetz, J., Hoffmann, K., Gründel, A., Schwarz, B.-A., Hänel, I., Otto, P.H., 2012. Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. *Arch Virol* 157, 1499–1507.
- Wolf, S., Reetz, J., Otto, P., 2011. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch Virol* 156, 1143–1150.
- Wong, K., Onan, B.M., Xagorarakis, I., 2010. Quantification of Enteric Viruses, Pathogen Indicators, and Salmonella Bacteria in Class B Anaerobically Digested Biosolids by Culture and Molecular Methods. *Appl Environ Microbiol* 76, 6441–6448.
- Wood, S.A., Biessy, L., Latchford, J.L., Zaiko, A., Von Ammon, U., Audrezet, F., Cristescu, M.E., Pochon, X., 2020. Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Science of The Total Environment* 704, 135314.
- Wu, F.-T., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K., Hansman, G.S., Muo, C.-H., Liang, S.-Y., Hung, C.-H., Jiang, D.D.-S., Chang, J.H., Yang, J.-Y., Wu, H.-S., Yang, C.-F., 2007. Acute Gastroenteritis Caused by GI/2 Sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1169–1171.
- Wu, Q., Liu, W.-T., 2009. Determination of virus abundance, diversity and distribution in a municipal wastewater treatment plant. *Water Research* 43, 1101–1109.
- Wu, Q., Xuan, Z., Liu, J., Zhao, X., Chen, Y., Wang, C., Shen, X., Wang, Y., Wang, L., Hu, Y., 2019. Norovirus shedding among symptomatic and asymptomatic employees in outbreak settings in Shanghai, China. *BMC Infect Dis* 19, 592.

- Wu FZ, Zhang J, Xiao AG, Gu X., Lee WL, Armas F, Kauffman K, Hanage W, Matus M, Ghaeli N, Endo N, Duvallet C, Poyet M, Moniz K, Washburne AD, Erickson TB, Chai PR, Thompson J, Alm EJ, 2020. SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases. *ASM*, Vol.5, No. 4.
- Wurtz, N., Revol, O., Jardot, P., Giraud-Gatineau, A., Houhamdi, L., Soumagnac, C., Annessi, A., Lacoste, A., Colson, P., Aherfi, S., Scola, B.L., 2021. Monitoring the Circulation of SARS-CoV-2 Variants by Genomic Analysis of Wastewater in Marseille, South-East France. *Pathogens* 10, 1042.
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J.-M., Maday, Y., Teysou, R., Richard, E., Almayrac, J.L., Moulin, L., 2020. Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters (preprint). *Epidemiology*.
- Xing, L., Li, T.-C., Mayazaki, N., Simon, M.N., Wall, J.S., Moore, M., Wang, C.-Y., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T., Cheng, R.H., 2010. Structure of Hepatitis E Virion-sized Particle Reveals an RNA-dependent Viral Assembly Pathway\*. *Journal of Biological Chemistry* 285, 33175–33183.
- Xue, Y., Liu, Z., Li, A., Yang, H., 2019. Application of a green coagulant with PACl in efficient purification of turbid water and its mechanism study. *Journal of Environmental Sciences* 81, 168–180.
- Xue, Y., Guo, X., Cao, J., Yang, S., Qiu, Z., Wang, J., Shen, Z., 2023. The occurrence, ecological risk, and control of disinfection by-products from intensified wastewater disinfection during the COVID-19 pandemic. *Science of The Total Environment* 900, 165602.
- Yamada, Y., Guillemette, R., Baudoux, A.-C., Patel, N., Azam, F., 2020. Viral Attachment to Biotic and Abiotic Surfaces in Seawater. *Appl Environ Microbiol* 86, e01687-19.
- Yamashita, T., Sakae, K., Tsuzuki, H., Suzuki, Y., Ishikawa, N., Takeda, N., Miyamura, T., Yamazaki, S., 1998. Complete Nucleotide Sequence and Genetic Organization of Aichi Virus, a Distinct Member of the *Picornaviridae* Associated with Acute Gastroenteritis in Humans. *J Virol* 72, 8408–8412.
- Yamashita, Y., Ootsuka, Y., Kondo, R., Oseto, M., Doi, M., Miyamoto, T., Ueda, T., Kondo, H., Tanaka, T., Wakita, T., Katayama, K., Takeda, N., Oka, T., 2010. Molecular characterization of sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. *Journal of Medical Virology* 82, 720–726.
- Yang, J., Zhang, M., Chen, C., Zhao, D., Chen, Y., An, S., 2023. Effect of Tubifex tubifex on the purification function of saturated vertical flow constructed wetlands for effluents with varying Chemosphere 340, 139872.
- Yates, M., V., 2014. *Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition)*, Chapter Twenty-Five Enterovirus. Academic Press, Pages 493-504, ISBN 9780124158467.
- Yoshida, T., Kasuo, S., Azegami, Y., Uchiyama, Y., Satsumabayashi, K., Shiraishi, T., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N., Oka, T., 2009. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *Journal of Clinical Virology* 45, 67–71.
- Zhuang, J., Jin, Y., 2003. Virus Retention and Transport as Influenced by Different Forms of Soil Organic Matter. *J. Environ. Qual.* 32, 8.

## Résumé

Les virus entériques humains (VEH), responsables de la majorité des gastroentérites aiguës, sont rejetés en grande quantité dans l'environnement hydrique à travers les fèces. L'analyse des charges en VEH dans les eaux usées représente donc un réel enjeu de santé publique, aussi bien à l'entrée de station d'épuration (STEP) (1ère niveau d'alerte d'épisodes épidémiques) qu'à la sortie (contamination des milieux situés en aval).

A travers ce travail, nous avons souhaité participer à l'effort d'amélioration de l'analyse des VEH dans les eaux usées, qui, confrontée à un milieu complexe et changeant, est encore trop contrainte par les limites des techniques employées. Nous avons également voulu apporter des éléments d'interprétation de la contribution des acteurs de la rétention des virus au sein des STEPs.

Dans un **1er chapitre**, une méthode d'analyse des charges virales des eaux usées de STEP, a été optimisée dans le respect des moyens humains et matériels dont dispose un laboratoire d'analyses environnementales. Le protocole a été appliqué dans la suite des travaux de la thèse. Sur le plan de l'échantillonnage, nos essais se sont inscrits dans la recherche de techniques innovantes d'extraction des virus par l'utilisation de matériaux adsorbants : charbon actif et chitosan. Ils ont conduit au développement d'échantillonneurs prototypes, à partir desquels un capteur passif de terrain sera mis au point.

Avant d'entrer dans le détail des effets des traitements sur les charges virales, il convenait d'examiner la réalité de leur abattement dans les conditions réelles d'une STEP. Le **2ème chapitre** présente le fonctionnement de l'UDEP Grand Chambéry à travers une partie des analyses d'autosurveillance de l'établissement, complétées par des quantifications de norovirus (NoV) et d'adénovirus (AdV). Une analyse de corrélations multiples a permis d'éclairer les relations mutuelles entre les concentrations et les taux d'abattement des VEH, mais également leurs relations avec quelques-unes des variables explicatives de leur environnement physique et chimique.

Le traitement primaire de l'UDEP repose sur l'élimination des matières en suspension par décantation, assistée par l'ajout de polymères. Le **3ème chapitre** aborde la comparaison des effets de différents polymères, sélectionnés selon leur propriétés physiques et chimiques, en termes de rétention et de viabilité des charges virales. Dans leur ensemble, les résultats font apparaître qu'une grande part des VEH traverse cette étape sans être retenue. Les mesures d'infectivité montrent que la plupart conservent un caractère infectieux mais sont toutefois retenus majoritairement dans les floccs.

Les contributions relatives des différents acteurs de la rétention des virus – relevant de processus physiques, chimiques ou biologiques – au niveau des réacteurs biologiques, sont encore mal connues. C'est à ce sujet que nous avons souhaité apporter des connaissances, avec les essais décrits dans un **4ème chapitre**, et qui se sont donc inscrits dans une logique de premières approches. La rétention des VEH a été conduite à l'échelle de pilotes de laboratoire simulant les biofiltres de l'UDEP, et à celle de microcosmes représentés par des grains de pouzzolane colonisés par des biofilms. Les résultats ont mis en évidence l'amplitude et la temporalité des processus physiques et biologiques impliqués dans la rétention des VEH.

En conclusion, le travail souligne l'intérêt d'une approche détaillée, des processus qui participent à l'élimination des charges virales dans les eaux usées dans les STEPs pour mieux en comprendre les performances et dans la perspective de leur apporter des améliorations.

## Abstract

Human enteric viruses (HuEV), which are responsible for the majority of acute gastroenteritis, are released in large quantities into the water environment via faeces. Analysis of HuEV loads in wastewater therefore represents a real public health issue, both at the treatment plant inlet (1st epidemic alert level) and at the outlet (contamination of downstream environments).

Through this work, we wanted to contribute to the effort to improve the analysis of HuEVs in wastewater, which, faced with a complex and changing environment, is still too constrained by the limits of the techniques used. We also wanted to provide elements for interpreting the contribution of the players involved in virus retention in WWTPs.

In the **1st chapter**, a methodology for the analysis of viral loads in wastewater was optimised in terms of human and material resources available to an environmental analysis laboratory. The protocol was subsequently applied throughout the remainder of the thesis. With regard to the sampling process, our research was conducted as part of an investigation into the potential of innovative techniques for the extraction of viruses using adsorbent materials, namely activated carbon and chitosan. These have resulted in the creation of prototype samplers, from which a field passive sensor will be developed.

Before going into detail about the effects of treatments on viral loads, it was necessary to examine the reality of their abatement under real conditions in a WWTP. The **2nd chapter** presents the operation of the Grand Chambéry UDEP through some of the plant's self-monitoring analyses, supplemented by quantifications of norovirus (NoV) and adenovirus (AdV). A multiple correlation analysis shed light on the mutual relationships between concentrations and abatement rates of HuEVs, as well as their relationships with some of the variables that explain their physical and chemical environment.

The primary treatment of the UDEP is the removal of suspended solids through decantation, facilitated by the addition of polymers. The **3<sup>rd</sup> chapter** presents a comparative analysis of the effects of different polymers, selected on the basis of their physical and chemical properties, in terms of retention and viability of viral loads. In general, the findings indicate that a significant number of HuEVs pass through this phase without being retained. Infectivity measurements indicate that the majority of the particles retain their infectious nature, although the majority are retained in the flocs.

The relative contributions of the various processes involved in virus retention in biological reactors, whether physical, chemical or biological, remain poorly understood. In this context, we aim to contribute to the existing body of knowledge by presenting the tests described in the **4<sup>th</sup> chapter**, which represent a preliminary approach to the subject matter. The retention of HuEVs was conducted at two distinct scales: firstly, at the laboratory pilot level, which simulated the biofilters of the UDEP; and secondly, at the microcosm level, represented by grains of pozzolan colonised by biofilms. The results elucidated the extent and temporality of the physical and biological processes involved in HuEV retention.

In conclusion, the work emphasises the value of a comprehensive approach to the processes involved in eliminating viral loads from wastewater in WWTPs in order to gain a deeper understanding of their performance and to inform improvements.