



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE DE LORRAINE
2012

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de PHARMACIE SPECIALISEE

Présentée et soutenue devant le jury Interrégional

le 13 juillet 2012

par **Sandra PELLEIEUX**
née le 03 février 1982

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE

Pour le DIPLOME D'ETAT

de DOCTEUR en PHARMACIE

*Les phages : un outil d'aide à l'évaluation du
comportement des virus entériques pathogènes en
réseau d'eau potable*

Membres du Jury

Président : Pr. Christophe GANTZER, PU, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Directeur : Dr Isabelle BERTRAND, MCU, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Juges : Dr. Nathalie DIGUIO, PH, Centre Hospitalier Emile Durkheim d'Epinal
Dr. Béatrice DEMORE, MCU-PH, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine
Dr. Pascal DRAKULOVSKI, MCU, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1

UNIVERSITE DE LORRAINE
2012

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de PHARMACIE SPECIALISEE

Présentée et soutenue devant le jury Interrégional

le 13 juillet 2012

par **Sandra PELLEIEUX**
née le 03 février 1982

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE

Pour le DIPLOME D'ETAT

de DOCTEUR en PHARMACIE

*Les phages : un outil d'aide à l'évaluation du
comportement des virus entériques pathogènes en
réseau d'eau potable*

Membres du Jury

Président : Pr. Christophe GANTZER, PU, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Directeur : Dr Isabelle BERTRAND, MCU, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Juges : Dr. Nathalie DIGUIO, PH, Centre Hospitalier Emile Durkheim d'Epinal
Dr. Béatrice DEMORE, MCU-PH, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine
Dr. Pascal DRAKULOVSKI, MCU, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier 1

UNIVERSITE DE LORRAINE, NANCY 1
FACULTE DE PHARMACIE
Année universitaire 2011-2012

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Référent de la Cellule de Formation Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS et Communication :	Francine KEDZIEREWICZ
Responsable de la filière officine :	Francine PAULUS
Responsable de la filière industrie :	Isabelle LARTAUD Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable du Collège d'Enseignement :	Jean-Michel SIMON
Pharmaceutique Hospitalier	
Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :	Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :	Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Marie-Madeleine GALTEAU
Gérard SIEST
Claude VIGENRON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
Francois MORTIER
Maurice PIERFITE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Marie-Andrée IMBS

Gérald CATAU

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Claude CHEVIN

Jean-Louis MONAL

Jocelyne COLLOMB

Dominique NOTTER

Bernard DANGIEN

Marie-France POCHON

Marie-Claude FUZELLIER

Anne ROVEL

Francoise HINZELIN

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSITANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

Faculté de Pharmacie

Enseignants	Section CNU*	Discipline d'enseignement
-------------	--------------	---------------------------

PROFESSEUR DES UNIVERSITES – PRACTICIENS HOSPITALIERS

Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Gilles AULAGNER	86	Pharmacie Clinique
Alain BAGREL		Biochimie
Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE		Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie environnementale
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU		Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie Physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie Galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie

Jean-Louis MERLIN	87	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON		Economie de la santé, législation Pharmaceutique

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie Cellulaire
Emmanuelle BENOÎT	86	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Arianne BOUDIER	85	Chimie physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	nanotechnologies pharmaceutiques
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie – Génie biologique
Adil FAIZ	85	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Expertise biopharmacologique
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédérique JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDIAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique

Anne SAPIN	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY		Santé publique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIOU	87	Biochimie et biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

ASSITANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Marie SOCHA		Pharmacie clinique
Julien PERRIN		Hématologie

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MATHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
---------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

Bibliothèque Universitaire Santé-Lionnois

Anne-Pascale PARRET		Directeur
---------------------	--	-----------

*Discipline du Conseil National des Universités

80^{ème} et 85^{ème} : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81^{ème} et 86^{ème} : Science du médicament et des autres produits dérivés de santé

82^{ème} et 87^{ème} : Sciences biologique, fondamentales et cliniques

32^{ème} : Chimie organique, minérale, industrielle

11^{ème} : Langues et littérature anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



"Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque. "



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION
AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE
CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR

Remerciements

Les résultats de la partie expérimentale ont été obtenus dans le cadre du programme de recherche Biofilm VIII, coordonné par l'Université de Lorraine (Nancy, France) et financé par, Veolia Environnement Recherche et Innovation (VERI), Veolia Eau, le Syndicat des Eaux d'Ile de France (SEDI) et l'Agence de l'Eau Seine Normandie (AESN).

En préambule à ce mémoire, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce travail ainsi qu'à la réussite de ce DES de Pharmacie Spécialisée.

A Melle Isabelle Bertrand, qui m'a fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail. Merci pour ton soutien tant sur le plan professionnel que personnel. Ton avis est toujours pertinent et ta disponibilité sans pareil. J'espère que tu garderas un bon souvenir de ta première thésarde. Tu trouveras ici le témoignage de mon profond respect, de ma reconnaissance et de ma sincère amitié.

A Mr Christophe Gantzer, qui me fait l'honneur de présider mon jury. Merci pour ta disponibilité, ta confiance et tes conseils avisés. Merci d'avoir fait de moi la première interne en pharmacie à être formée dans ce laboratoire et d'avoir la patience de poursuivre l'aventure pour quelques mois encore jusqu'à l'aboutissement d'un doctorat de sciences...

Trouve dans ces lignes l'expression de ma profonde reconnaissance. Bientôt le laboratoire redeviendra un lieu paisible.

A Melle Béatrice Demoré, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail malgré votre emploi du temps chargé. Veuillez croire en ma profonde reconnaissance.

A Mme Nathalie Diguio, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Merci pour l'enthousiasme avec lequel vous avez accepté de participer à mon jury. Veuillez croire en ma profonde reconnaissance.

A Mr Pascal Drakulovski. Qui aurait cru que notre rencontre Montpelliéraine t'aurait conduit jusqu'à Nancy en tant que membre de mon jury. C'est un honneur que tu aies accepté cette charge de travail supplémentaire pour moi. Trouve ici le témoignage de mes plus sincères remerciements ainsi que de ma profonde amitié.

A Jean-Claude Block, pour ta disponibilité, ton encadrement scientifique de qualité et pour m'avoir présenté les Propella™. Tu trouveras ici le témoignage de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A Erell, pour m'avoir initiée à la manipulation des Propella™ et encadrée pour l'analyse du biofilm présenté dans ce manuscrit. Merci également pour ta bonne humeur lors de chacune de nos réunions de travail.

A Aline et Christelle, mes compères de toujours. Merci pour ces précieux moments d'amitié que nous avons eu l'occasion de partager du nord au sud de la France mais également pour nos échanges scientifiques qui ont solutionné de nombreuses embûches. Une attention particulière pour Aline quant à son investissement dans ce travail, tu m'as fait gagner un temps précieux en peaufinant mes figures et corrigeant mes fautes... Tu me rends également un grand service en préparant le « gouter » post-soutenance (d'ailleurs pour toute

réclamation à ce sujet merci de s'adresser directement à elle !). C'est avec toute mon amitié que je vous remercie, soyez assurées que je ferais en sorte que nos chemins se recroisent régulièrement.

Aux membres du laboratoire, Sandrine L, David, Sandrine B, Laurence, Jean-Paul... Merci pour votre accueil, pour tous les services rendus et pour votre bonne humeur qui apportent une ambiance de travail chaleureuse et conviviale. Merci de supporter quotidiennement mon petit grain de folie, ce n'est pas encore tout à fait fini...

Un merci particulier à Joël, plombier de la faculté de Pharmacie, pour ta réactivité et ta disponibilité à chaque souci avec l'un de mes réacteurs.

Aux stagiaires, Chloé, Sandra, Nicolas et Carole que j'ai eu le plaisir d'encadrer et qui m'ont accompagnée dans la contribution de ce travail, mais également à Ludivine et Mathieu futures graines de chercheurs. Je vous souhaite à tous un parcours à la hauteur de vos espérances.

A mes co-internes, Perrine et Mathilde en particulier pour m'avoir si bien accueillie dès mon arrivée en novembre 2007 et pour m'avoir expliqué que même s'il fait froid à Nancy on ne porte pas un manteau de ski. Merci également à Emilie, Rémy, Amélie (pour ses « talents culinaires »)... pour leur bonne humeur et les fous rires partagés.

A mes amis. Jean-Louis avec qui j'aurai eu le plaisir de partager l'intégralité de mes études de pharmacie, de Montpellier à Nancy ta présence n'a jamais fait défaut dans les bons comme dans les moins bons moments. A mes amis Nancéens Muhamet, Sébastien, Sarah, Madeleine... Mes amis Niçois Thomas (alias Chtoko), Elodie (pour qui j'ai une pensée particulière), Stéphanie... Mais également à la « Pharmilly » bien trop nombreux pour que je ne me risque à citer des noms, j'espère perpétuer longtemps nos franches parties de rigolades et nos fréquentes retrouvailles aux quatre coins de la France! Et à ceux qui n'entrent dans aucune « case » mais qui sont une source de réconfort et de bonne humeur permanente, Sébastien (alias TDC), Yoann, Sylvain, Laure, Fanny, Mickaël (mon meuble préféré). Mille excuses à ceux que je n'ai pas cités, la place manque sur cette page mais pas dans mon cœur.

A Chantal et André, pour avoir débuté avec moi cette aventure, pour leurs précieux conseils, leurs encouragements et tous les bons moments partagés.

A mes parents, qui doivent être contents de voir enfin arriver un diplôme après tant d'années d'études. En ce vendredi 13, vos prières sont exhaussées. Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises, de m'avoir donné les moyens de faire ces longues études et pour être toujours là quand j'ai besoin de vous. Sans vous rien n'aurait été possible. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon amour. Ce travail vous est légitimement dédié.

Enfin à Stéphan, mon frère, mon ami. Qui n'hésite pas à traverser la France pour moi en toutes circonstances (déménagement, coup de mou...) et qui n'a jamais eu honte d'avoir une sœur un peu « originale ». Je trouve auprès de toi un réconfort et un bien être sans pareil. Merci pour tous les moments que nous partageons, nos fous rires, nos délires ainsi que nos longues discussions sur la vie, nos échanges sont toujours stimulants et tes conseils toujours bénéfiques. J'ai beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés...

Sommaire

Remerciements

Sommaire

Liste des figures

Liste des Tableaux

Abréviations

Introduction 1

Etude bibliographique 3

PREMIERE PARTIE : 3

Le risque microbiologique en réseau de distribution d'eau 3

1. Nature des polluants microbiologiques 3

1.1. Bactéries pathogènes 4

1.1.1. Les bactéries pathogènes préoccupantes courantes 4

1.1.2. Les bactéries pathogènes préoccupantes émergentes 7

1.2. Protozoaires pathogènes 9

1.3. Les virus entériques pathogènes 10

1.3.1. Structure des virus entériques pathogènes 11

1.3.2. Présentation des principaux virus entériques en fonction de leur pathogénicité 11

2. Les origines possibles des contaminations des systèmes de distribution d'eau 16

2.1. Contamination de la ressource en eau 16

2.2. Contamination consécutive à une défaillance lors du traitement de potabilisation
16

2.3. Contamination résultant d'un accident sur le réseau de distribution d'eau 17

3. Contrôle sanitaire de l'eau de distribution 17

3.1. Les critères d'un bon indicateur de pollution fécale 18

3.2. Les principaux indicateurs de pollution fécale utilisés en France 19

4. Moyens de prévention 20

DEUXIEME PARTIE : 24

Cas d'infections virologiques liées à la consommation d'eau 24

et prise en charge thérapeutique 24

1. Exemples de contaminations virales liées à la consommation d'eau contaminée ... 24

1.1. Exemples de contaminations virales consécutives à la consommation d'eau
contaminée en France 25

1.2. Exemples de contaminations virales consécutives à la consommation d'eau contaminée dans des pays développés	26
2. Un arsenal thérapeutique limité.....	27
2.1. La vaccination	27
2.2. Prise en charge thérapeutique des gastro-entérites virales	30
TROISIEME PARTIE :	33
Devenir des virus dans un réseau d'eau	33
1. La notion de biofilm.....	33
1.1. Formation d'un biofilm	33
1.2. Structuration d'un biofilm d'eau potable	34
2. Les phages en tant que modèles d'étude des virus entériques pathogènes	35
2.1. Structure des bactériophages ARN-F spécifiques	36
2.2. Les phages en tant que modèles d'étude des virus entériques pathogènes	38
3. Etat des connaissances sur le devenir des virus transmissibles par voie hydrique au sein d'un système de distribution d'eau	39
3.1. Adsorption des virus sur les biofilms.....	39
3.1.1. Détection des virus au sein des biofilms.....	40
3.1.2. Analyse virologique de biofilms environnementaux prélevés <i>in situ</i>	40
3.1.3. Analyse virologique de biofilms formés en laboratoire à l'aide de réacteurs	42
3.2. Persistance des virus dans les biofilms	46
3.2.1. Relargage des virus à partir du biofilm.....	48
4. Inactivation virale par l'hypochlorite de sodium	49
4.1. Inactivation virale dans l'eau par l'action de l'hypochlorite de sodium	49
4.2. Inactivation virale au sein d'un biofilm par l'hypochlorite de sodium	55
Matériels et Méthodes	56
1. Objectifs de l'étude	56
2. Production et dénombrement des bactériophages ARN F-spécifique.....	56
2.1. Production et contrôle de la bactérie hôte <i>Escherichia coli</i>	56
2.1.1. Production des cultures d'essai	56
2.1.2. Etalonnage des mesures de turbidité.....	56
2.2. Production des bactériophages	57
2.2.1. Mise en culture des bactériophages	57
2.2.2. Dénombrement des bactériophages	58
3. Quantification du génome viral.....	58
3.1. Extraction du génome viral	58

3.1.1.	Extraction à partir de phages en suspension	58
3.1.2.	Extraction d'ARN viral à partir de coupons	59
3.2.	Quantification du génome viral.....	59
3.2.1.	Rétro-transcription (RT)	60
3.2.2.	PCR en temps réel (qPCR)	62
4.	Détection des bactériophages infectieux dans les prélèvements d'eau et sur les coupons.....	62
4.1.	Elution des bactériophages.....	62
4.2.	Concentration des virus sur colonne	63
5.	Mesure de la taille des particules virales.....	64
5.1.	Purification des bactériophages.....	64
5.2.	Mesure de la taille des particules virales.....	64
6.	Dosage du chlore.....	64
6.1.	Principe du dosage	64
6.2.	Dosage du chlore libre.....	65
7.	Présentation du réacteur Propella™	66
8.	Protocoles expérimentaux	67
8.1.	Etude de l'influence du matériau et de la colonisation par un biofilm sur l'adhésion de deux bactériophages.....	68
8.2.	Evaluation de l'efficacité d'un nettoyage par chloration	68
9.	Etude du biofilm.....	70
9.1.	Marquage direct des coupons au SYBR Green II	70
9.2.	Comptage cellulaire après sonication.....	70
9.3.	Observation au microscope à épifluorescence	70
Résultats		72
1-	Etalonnage des méthodes de détection génomique des bactériophages.....	72
2.	Mesure de taille des particules phagiques dans l'eau.....	74
3.	Etude du comportement des phages au sein de réacteurs Propella™ colonisés par des biofilms de trois mois.....	75
3.1.	Analyse macroscopique et microscopique du biofilm	75
3.2.	Suivi de la concentration phagique dans l'eau	77
3.3.	Analyse de la concentration virale sur les coupons.....	79
4.	Impact de la chloration sur l'infectiosité et la détection génomique des phages	82
4.1.	Etablissement d'une droite étalon pour le dosage du chlore.....	82
4.2.	Suivi de la concentration en chlore dans le système	83
4.3.	Effet de la chloration sur les bactériophages en suspension dans l'eau	85
4.4.	Bactériophages associés au biofilm.....	87

4.5. Comparaison de l'action du chlore sur les deux génogroupes phagiques.....	89
Discussion.....	91
1. Adsorption virale sur les surfaces	92
2. Evaluation d'un protocole de nettoyage par chloration	95
Conclusion et perspectives.....	99
Bibliographie.....	101
Annexes	113
Annexe 1 : Milieux nécessaires à la production et au titrage des phages ARN F-spécifiques	113
Annexe 2 : Réactifs nécessaires au dosage du chlore	115

Liste des figures

Figure 1. Microscopie électronique des principaux virus entériques associés à une transmission liée à l'eau (Koopmans and Duizer, 2004)	12
Figure 2. Répartition de la mortalité par gastro-entérites virales, exemple du rotavirus (Parashar <i>et al.</i> , 2003).	25
Figure 3. Schéma d'un bactériophage ARN F-spécifique (Référence PDB using VIPERdB, the VIRus Particle ExploreR 2ms2) (Extrait de Langlet, 2008).	36
Figure 4. Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2 et Q β appartenant au genre <i>Levivirus</i> et <i>Allolevivirus</i> respectivement (Inokuchi <i>et al.</i> , 1986; Inokuchi <i>et al.</i> , 1988; Priano <i>et al.</i> , 1995; Bollback et Huelsenbeck, 2001).	37
Figure 5. Abattement viral obtenu pour différents virus entériques en fonction de différents C.t, dans des milieux sans demande en chlore, à 5°C, pour des pH de 6 à 7,8 et des concentrations en hypochlorite de sodium comprises entre 0,2 et 0,5 mg/L de chlore (Lim <i>et al.</i> , 2010 ; Sobsey <i>et al.</i> , 1988 ; Engelbrecht <i>et al.</i> , 1980 ; Cromeans <i>et al.</i> , 2010 ; Sobsey <i>et al.</i> , 1988 ; Thurston-Enriquez <i>et al.</i> , 2003)	53
Figure 6. Schéma de la qPCR	60
Figure 7. Courbe d'émission de fluorescence en qPCR.....	60
Figure 8 Eléments constitutifs d'une colonne de concentration Macrosep (PALL Life Sciences).....	63
Figure 9. Photographie d'un Propella TM (a), représentation schématique (b) moteur de l'hélice (c).	66
Figure 10. Schéma général des expérimentations effectuées en réacteur Propella TM pour l'évaluation de l'efficacité d'un nettoyage par chloration.	69
Figure 11. Gammes étalon réalisées à partir des suspensions stock des bactériophages MS2 et Q β (UFP : Unité Formant Plaque), n=3 pour chaque droite.	73
Figure 12. Mesure de la taille des particules phagiques dans de l'eau de distribution pour les phages MS2 et Q β analysés séparément ainsi que pour un mélange des deux phages.....	74
Figure 13. Vue macroscopique de coupons d'inox « abiotique » (A) ou après un temps de séjour de trois mois dans le pilote (B).	76
Figure 14. Marquage direct au SYBR Green II d'un coupon d'inox 316L après un temps de séjour dans le pilote de 24h (A) et trois mois (B) ainsi que d'un coupon de PVC présentant un biofilm de trois mois (C). Grossissement $\times 10$	77

Figure 15. Analyse de la concentration en phage MS2 et Q β dans l'eau après inoculation et après quatre heures de contact avec les Propella™, équipés de coupons en inox 316L (A) et PVC (B), (n=2).	78
Figure 16. Concentrations en bactériophages MS2 et Q β mesurées sur les coupons d'inox 316L et de PVC, après quatre heures, sur des coupons mis en place depuis 24h dits « abiotiques » (n=10) et des coupons présentant un biofilm de trois mois (n=10).	80
Figure 17. Droite étalon utilisée pour le dosage du chlore libre à la DPD (N,N-DiéthylPhénylène-1,4 Diamine) (n=3).	83
Figure 18. Suivi de la concentration en chlore libre (mg/L) dans l'eau des réacteurs Propella™ colonisés par des biofilms de 3 et 5 mois (n=2).	84
Figure 19. Quantification des bactériophages infectieux et du génome viral dans l'eau des réacteurs Propella™ avant et pendant la chloration à 5 mg/L. Les résultats sont exprimés en (éq) UFP/mL (n=2). ND= non détecté.	86
Figure 20. Abattement des bactériophages infectieux et du génome viral après 30 minutes de chloration sur les coupons de PEHD (Propella™) colonisés par un biofilm de trois mois et cinq mois.	88
Figure 21. Abattement du génome des bactériophages MS2 et Q β sur les coupons de PEHD (Propella™) avant et après 30 minutes de chloration, sur un biofilm de trois mois et un biofilm de 5 mois (n=5).	89

Liste des Tableaux

Tableau 1. Principaux microorganismes pouvant être transmis par l'eau de distribution (adapté de WHO, 2011)	5
Tableau 2. Caractéristiques des principaux virus entériques humains responsables de pathologies liées à l'eau (Koopmans and Duizer, 2004 ; Carter, 2005 ; Fauquet <i>et al.</i> , 2005)	12
Tableau 3. Limites de qualité microbiologique des eaux destinées à la production d'eau pour la consommation humaine (Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001).....	21
Tableau 4. Abattements bactériens, viraux et de protozoaires après application de traitements en station de potabilisation (Adapté de WHO, 2011).	22
Tableau 5. Conditions expérimentales des études traitant de l'adhésion de virus sur des biofilms constitués en réacteurs (adapté de Skrabber <i>et al.</i> , 2005).	43
Tableau 6. Inactivation de bactériophages et de virus entériques pathogènes par l'hypochlorite de sodium en fonction de la température, du pH de l'eau, de la concentration en chlore et du temps d'exposition.	51
Tableau 7. Protocole de rétro-transcription d'ARN viral (Ogorzaly et Gantzer, 2006)	61
Tableau 8. Protocole de PCR en temps réel (Ogorzaly et Gantzer, 2006).....	62
Tableau 9. Gamme de dilution d'iodate ioduré à réaliser pour l'étalonnage du dosage du chlore	65

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

CE : Communauté Européenne

C.t : Concentration (mg/L) x temps de contact (min)

C_T : Cycle threshold

CUGN : Communauté Urbaine du Grand Nancy

Db : Double brin

DMI : Dose Minimale Infectieuse

E : Efficacité ou rendement de PCR

FCV : calicivirus félin

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert

GG : Génogroupe

InVS : Institut de Veille Sanitaire

Kp : Kilo paire de base

log₁₀ éq.UFP : logarithme des équivalents UFP

Mac : Complexe *Mycobacterium avium*

MNT : Mycobactéries non tuberculeuses

MNV : norovirus murin

NPPUC : nombre le plus probable d'unités cytopathiques

NTR : non-translated terminal region

OMS : Organisation Mondiale pour la Santé

pb : paire de bases

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEHD : Polyéthylène haute densité

PV : poliovirus

PVC : Chlorure de Polyvinyle

qPCR : Quantitative PCR

rpm : rotations par minute

RT : Reverse Transcription

Sb : simple brin

SHU : Syndrome Hémolytique Urémique

TYGA : Tryptone Yeast Glucose Agar

TYGB : Tryptone Yeast Glucose Broth

UFC : Unité Formant Colonie

UFP : Unité Formant Plage

UTR : untranslated terminal region

VHA : virus de l'hépatite A

VHE : virus de l'hépatite E

WHO : World Health Organisation

VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine

Introduction

En France, la production d'eau destinée à l'alimentation représente environ 6 milliards de m³ par an. L'eau est une ressource sensible qui peut être soumise à différents types de pollution et notamment à des contaminations de nature chimique ou microbiologique ayant un impact direct sur la santé des populations exposées. Pour être considérée comme "propre à la consommation" une eau doit répondre à des critères microbiologiques, chimiques, physiques et gustatifs. Il existe à ce sujet des recommandations internationales émises par l'OMS (2004) et une directive européenne (98/83/CE) traduite en droit français (Décret N°2001-1220 du 20 décembre 2001). Les substances chimiques, autres que les sels minéraux, font l'objet de normes très strictes. Certaines substances telles que le fluor et les nitrates sont considérées comme indésirables, c'est-à-dire que leur présence est tolérée pour des concentrations de l'ordre du milligramme par litre. Pour d'autres substances chimiques dites toxiques telles que le plomb ou l'arsenic, les concentrations tolérées sont extrêmement faibles, de l'ordre du microgramme par litre. Les normes concernant les substances chimiques dans l'eau sont établies sur la base d'une consommation journalière normale, pendant toute la vie. D'un point de vue microbiologique, l'eau ne doit contenir ni parasite, ni virus, ni bactérie pathogène. Le risque microbiologique est particulièrement préoccupant car certains microorganismes présentent une faible dose minimale infectieuse, celle-ci est par exemple de l'ordre de 1 à 10 particules pour les virus entériques pathogènes. Les paramètres microbiologiques du contrôle sanitaire sont uniquement de nature bactérienne, ils ont été mis en place suite aux dernières grandes épidémies liées à l'eau, survenues en Europe occidentale à la fin du 19^{ème} siècle.

Les efforts des distributeurs d'eau potable pour fournir une eau de bonne qualité, ainsi que le contrôle réglementaire organisé par les autorités sanitaires apparaissent globalement efficaces compte tenu du faible nombre d'épidémies d'origine hydrique relevées depuis 1998 par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), avec en moyenne une seule situation épidémique relevée annuellement. Toutefois, il apparaît toujours nécessaire d'améliorer les connaissances sur le devenir des microorganismes et notamment des virus entériques dans le milieu hydrique. En effet, les virus sont à l'origine de plus de 80% des cas de gastro-entérites liés à la consommation d'eau de distribution dans les pays développés (Koopmans *et al.*, 2002). Les virus entériques transmissibles par l'eau sont de petite taille et très résistants aux traitements de potabilisation. La prédiction du devenir de virus accidentellement introduits dans un réseau d'eau reste délicate à l'heure actuelle au vue des connaissances sur le comportement de ces

particules dans un tel milieu. Pourtant, l'étude de leur devenir au sein d'un réseau de distribution d'eau est nécessaire pour obtenir les informations indispensables au développement de nouvelles approches préventives et de traitements contre ces microorganismes. Les différents éléments à considérer pour étudier le devenir de particules virales dans un réseau d'eau sont, l'adsorption virale sur les surfaces, l'éventuel effet protecteur résultant de cette adsorption notamment face aux tentatives de traitement, et enfin la possibilité d'un décrochement et d'un relargage de particules adsorbées dans l'eau. Toutes les surfaces composant un réseau de distribution d'eau (les conduites ainsi que les réservoirs de stockage) sont colonisées par un film biologique complexe appelé biofilm. Les biofilms sont composés de nombreuses colonies cellulaires, notamment bactériennes, disposées de façon irrégulière sur la surface (Martiny *et al.*, 2003), parfois de champignons filamenteux (Paris *et al.*, 2009) et dans tous les cas de structures hydratées, anioniques, visco-élastiques (Abe *et al.*, 2012). La présence de cette biomasse complexe sur les surfaces doit être prise en compte lors de l'appréhension du devenir des particules au sein d'un réseau. Les études *in situ* étant difficiles à mettre en œuvre, des réacteurs tels que les Propella™ sont couramment utilisés afin de reproduire des conditions expérimentales mimant les réseaux de distribution d'eau (Grandjean *et al.*, 2005 ; Lehtola *et al.*, 2007).

La partie bibliographique s'intéresse dans un premier temps à l'étude des principaux microorganismes pathogènes du milieu hydrique, ainsi qu'aux moyens mis en œuvre à l'heure actuelle pour évaluer la contamination microbiologique de l'eau. La deuxième partie est consacrée à la description de cas de contaminations virales liées à la consommation d'eau dans les pays développés ainsi qu'à la prise en charge médicale de ces infections. Enfin, la troisième partie, dresse l'état des connaissances en termes d'interactions virus-biofilm dans un réseau de distribution d'eau et argumente l'intérêt de l'utilisation des bactériophages ARN F-spécifiques en tant que modèles d'étude des virus entériques pathogènes.

La partie expérimentale de ce travail porte sur des expérimentations réalisées en réacteurs (Propella™) et s'intéresse plus particulièrement à l'influence de la présence d'un biofilm d'eau potable sur l'adsorption phagique ainsi qu'à l'effet d'un protocole de désinfection par le chlore sur les phages adsorbés sur des biofilms. Il s'agit d'améliorer les connaissances sur le devenir de virus au sein d'un réseau de distribution d'eau et par la suite d'améliorer les moyens de prévention ou de nettoyage des réseaux suite à une contamination.

Etude bibliographique

PREMIERE PARTIE :

Le risque microbiologique en réseau de distribution d'eau

Les exigences de qualité pour l'eau de distribution sont fixées par une directive européenne transposée dans le code de la santé publique. Elles se fondent sur les valeurs guides proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé. Cette dernière définit une valeur guide comme « étant une estimation de la concentration d'une substance dans l'eau de boisson qui ne présente aucun risque pour la santé d'une personne qui consommerait cette eau pendant toute sa vie ». Lors de notre étude, nous prendrons en considération uniquement les risques microbiologiques liés à la consommation d'eau de distribution. Malgré tous les efforts mis en œuvre pour produire et distribuer une eau de bonne qualité notamment d'un point de vue microbiologique, des microorganismes pathogènes ont déjà été responsables de pathologies directement liées à la consommation d'eau de distribution dans les pays développés. La plupart des microorganismes pathogènes transmissibles par voie hydrique pouvant être accidentellement introduits dans un système de distribution d'eau proviennent d'une contamination fécale d'origine animale ou humaine, l'eau constitue pour eux un moyen de transport et une voie de contamination. Leur persistance dans l'eau varie suivant les microorganismes et elle est influencée par de nombreux paramètres tels que la température ou la concentration résiduelle en chlore.

Dans le présent chapitre nous tenterons de décrire à travers une analyse qui n'a pas pour but d'être exhaustive, les principaux microorganismes pathogènes responsables d'infections humaines liées à la consommation d'eau de distribution dans les pays développés, les événements à partir desquels ces microorganismes peuvent être retrouvés dans l'eau d'un réseau de distribution, les moyens actuels utilisés pour détecter une telle pollution et enfin les traitements mis en place afin de produire une eau de qualité.

1. Nature des polluants microbiologiques

Les microorganismes responsables de maladies d'origine hydrique sont des bactéries, des parasites ou des virus. Ces derniers représentent l'étiologie la plus fréquente, notamment dans

les pays développés, où ils sont à l'origine de plus de 80% des gastro-entérites (Koopmans *et al.* 2002). Le **tableau 1** répertorie les principaux microorganismes responsables de pathologies d'origine hydrique ainsi que leurs caractéristiques générales.

1.1. Bactéries pathogènes

La plupart des bactéries pathogènes transmissibles par l'eau infectent le tractus gastro-intestinal et sont excrétées dans les matières fécales des personnes ou animaux contaminés. Certaines bactéries pathogènes telles *Legionella*, *Burkholderia pseudomallei* ou certaines mycobactéries atypiques peuvent infecter leurs hôtes par voie respiratoire et sont responsables de pathologies diverses. Seules les bactéries les plus couramment mises en cause lors d'épidémies liées à la consommation d'eau ainsi que quelques bactéries émergentes sont présentées ci-dessous.

1.1.1. Les bactéries pathogènes préoccupantes courantes

- ***Escherichia coli* O157:H7**

Escherichia coli est une bactérie que l'on trouve exclusivement dans le tractus digestif des mammifères, c'est pourquoi elle fait partie des indicateurs de contamination fécale lors du contrôle sanitaire. La plupart des *E. coli* ne sont pas pathogènes. Les *E. coli* pathogènes sont subdivisées en six groupes en fonction de leurs caractéristiques sérologiques et de leur virulence : entérohémorragique, entérotoxigène, entéroenvahissant, entéropathogène, entéroagglutinant et d'adhésion diffuse (APHA *et al.*, 1998 ; Rice, 1999). Les infections à *E. coli* ont une période d'incubation comprise entre trois et quatre jours et les symptômes durent entre sept et dix jours (Moe, 1997 ; Rice, 1999).

E. coli O157:H7 appartient au groupe des bactéries entérohémorragiques et bien qu'elle ne constitue habituellement pas une cause de préoccupation en ce qui concerne l'eau potable traitée, des cas la mettant en cause lors de la consommation d'eau potable contaminée par des eaux usées ou des matières fécales humaines ou animales ont été signalés (Swerdlow *et al.*, 1992). La complication redoutée suite à la contamination par cette bactérie est le Syndrome Hémolytique Urémique (SHU). On estime que 2 à 7% des infections à *E. coli* O157 :H7

Tableau 1. Principaux microorganismes pouvant être transmis par l'eau de distribution (adapté de WHO, 2011)

Pathogène	Impact sur la santé ^a	Persistance dans l'eau ^b	Résistance au chlore ^c	Infectiosité relative ^d	Source animale importante
Bactérie pathogène					
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Important	Multiplication possible	Faible	Faible	Non
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C.coli</i>	Important	Modérée	Faible	Modérée	Oui
<i>Escherichia coli</i> -pathogène	Important	Modérée	Faible	Faible	Oui
<i>E.coli</i> -entérohémorragique	Important	Modérée	Faible	Importante	Oui
<i>Francisella tularensis</i>	Important	Importante	Modérée	Importante	Oui
<i>Legionella</i> spp.	Important	Multiplication possible	Faible	Modérée	Non
<i>Leptospira</i>	Important	Importante	Faible	Importante	Oui
<i>Mycobacteria</i> (Mac)	Faible	Multiplication possible	Importante	Faible	Non
<i>Salmonella typhi</i>	Important	Modérée	Faible	Faible	Non
Autres salmonelles	Important	Multiplication possible	Faible	Faible	Oui
<i>Shigella</i> spp	Important	Courte	Faible	Importante	Non
<i>Vibrio cholerae</i>	Important	Variable	Faible	Faible	Non
Protozoaire					
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Important	Multiplication possible	Importante	Importante	Non
<i>Cryptosporidium hominis/parvum</i>	Important	Importante	Importante	Importante	Oui
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Important	Importante	Importante	Importante	Non
<i>Entamoeba histolytica</i>	Important	Modérée	Importante	Importante	Non
<i>Giardia intestinalis</i>	Important	Modérée	Importante	Importante	Oui
<i>Naegleria fowleri</i>	Important	Multiplication possible	Faible	Modérée	Non
Virus					
<i>Adenovirus</i>	Modéré	Importante	Modérée	Importante	Non
<i>Astrovirus</i>	Modéré	Importante	Modérée	Importante	Non
<i>Enterovirus</i>	Important	Importante	Modérée	Importante	Non
<i>Virus de l'hépatite A</i>	Important	Importante	Modérée	Importante	Non
<i>Virus de l'hépatite E</i>	Important	Importante	Modérée	Importante	Probable
<i>Norovirus</i>	Important	Importante	Modérée	Importante	Probable
<i>Rotavirus</i>	Important	Importante	Modérée	Importante	Non
<i>Sapovirus</i>	Important	Importante	Modérée	Importante	Probable

^a l'impact sur la santé publique reflète l'incidence et la gravité des maladies résultant de contamination de l'eau.

^b la persistance est liée à la détection de l'infectiosité dans l'eau à 20°C : courte = moins d'une semaine, modérée = de une semaine à un mois, importante = plus d'un mois.

^c la résistance au chlore correspond à l'extinction de la détection de l'infectiosité dans de l'eau traitée avec du chlore par des doses et des temps de contact conventionnels ainsi que des pH compris entre 7 et 8,99% d'inactivation à 20°C sont obtenus en moins d'une minute (Résistance faible), entre une et 30 minutes (Résistance modérée) et en plus de 30 minutes (Résistance importante).

^d Données obtenues d'après des expériences avec des volontaires humains, des données épidémiologiques et des expériences sur les animaux.

provoquent un SHU dû à la production de toxines (vérotoxines) qui détruisent les érythrocytes et entraînent une insuffisance rénale aiguë (Moe, 1997). La probabilité de tomber malade dépend du nombre de bactéries ingérées, de l'état de santé du sujet et de la résistance au microorganisme ou à la toxine, les enfants ainsi que les personnes âgées étant les personnes les plus vulnérables.

- ***Salmonella et Shigella***

Ces bactéries sont des agents étiologiques courant de gastro-entérites, elles sont présentes dans les matières fécales des sujets ou animaux contaminés. De nombreux cas de salmonellose et de shigellose ont été reliés à l'eau potable contaminée (Boring *et al.*, 1971 ; Taylor *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2001). Dans la plupart des cas, l'eau potable n'était pas convenablement traitée avant consommation.

Les shigelloses ou dysentéries bacillaires sont des maladies à déclaration obligatoire, leur période d'incubation est de 24 à 48 heures et l'incidence de la maladie en France est plus importante en septembre-octobre. Elles se traduisent par un début brutal avec de la fièvre et des douleurs abdominales, des diarrhées avec selles profuses, afécales et glairo-sanguinolantes.

Les salmonelloses provoquent des entérocolites dont l'incubation dure entre 6 et 36 heures. Elles se traduisent par des diarrhées fébriles caractérisées par plus de cinq selles liquides par jour, des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales.

L'évolution de ces deux pathologies est généralement spontanément résolutive en 2 à 7 jours.

- ***Campylobacter et Yersina***

De nombreux cas de gastro-entérites d'origine hydrique mettent en cause ces deux microorganismes (Eden *et al.*, 1977 ; Mentzing, 1981). A titre d'exemple, l'épidémie la plus importante d'origine hydrique au Canada était causée par une contamination du réseau par *Campylobacter jejuni* et *Escherichia coli* O157:H7 s'est produite à Walkerton en mai 2000 (Clark *et al.*, 2003 ; Hrudehy *et al.*, 2003). Le nombre de personnes touchées a été estimé à 2 300 avec 65 hospitalisations, 27 cas de SHU et sept décès. Cette épidémie a pu être reliée à de l'eau de puits, contaminée par des matières fécales et n'ayant pas reçue un traitement adéquat avant la consommation.

1.1.2. Les bactéries pathogènes préoccupantes émergentes

- *Legionella*

Contrairement à la plupart des autres agents pathogènes d'origine hydrique, les légionelles sont naturellement présentes dans les environnements hydriques, y compris les eaux de surface (Palmer *et al.*, 1993) et les eaux souterraines (Lieberman *et al.*, 1994) et ne sont pas assimilables à une contamination fécale de l'eau. Leur présence généralisée reflète leur capacité de survie dans des conditions hydriques variées, y compris des températures de 0 à 63 °C et des pH de 5,0 à 8,5 (Nguyen *et al.*, 1991). Des protozoaires (amibes) naturellement présents dans l'eau peuvent héberger des légionelles et les protéger contre les agressions environnementales. Au sein d'un réseau de distribution les légionelles peuvent contaminer l'eau, cependant leur croissance est plus importante au niveau des films biologiques, également appelés biofilms, présents sur les parois. En effet, les concentrations en légionelles peuvent être dix fois plus élevées dans les films biologiques provenant d'un robinet que dans l'eau recueillie au robinet en question (Ta *et al.*, 1995). *Legionella* est responsable de maladies appelées légionelloses, regroupant la maladie des légionnaires et la fièvre de Pontiac.

La maladie des légionnaires est une pneumonie sévère qui peut être conjuguée à des symptômes extra-pulmonaires. La période d'incubation est en général de deux à dix jours. C'est une maladie difficile à diagnostiquer notamment à cause de l'absence de tout symptôme spécifique qui la distingue d'autres pneumonies bactériennes. Dans l'ensemble, le taux de mortalité de la maladie des légionnaires est d'environ 15% (Nelson *et al.*, 1985).

La fièvre de Pontiac est une maladie fébrile non pulmonaire dont l'incubation dure 24 à 48 heures et se résorbe habituellement en deux à cinq jours, sans causer de complications (Glick *et al.*, 1978 ; Fallon *et al.*, 1993).

Legionella étant un agent pathogène respiratoire, les systèmes qui produisent des aérosols comme les tours de refroidissement, les systèmes de climatisation, les bassins d'eau thermale et les pommeaux de douche constituent les sources d'infection les plus souvent mises en cause et la contamination provient en général du réseau d'eau chaude. Des aérosols contenant des concentrations dangereuses de *Legionella* spp., en général *L. pneumophila* (Dufour et Jakubowski, 1982), posent particulièrement un problème dans les hôpitaux, où des personnes vulnérables (personnes âgées ou immunodéprimées) peuvent être exposées. *L. pneumophila* est divisée en 15 sérogroupes et est à l'heure actuelle l'agent responsable d'environ 90% des cas de maladie du légionnaire diagnostiqués en France. Le séro groupe 1 est le plus fréquent

(70 à 90% des cas) ainsi que le sérotype 6, les autres espèces sont généralement isolées chez des personnes immunodéprimées (Jarraud *et al.*, 2000).

- **Complexe *Mycobacterium avium* (Mac)**

Ce complexe regroupe 28 sérotypes de deux espèces distinctes, *Mycobacterium avium* et *Mycobacterium intracellulare*. Ces microorganismes, ainsi que beaucoup d'autres espèces mycobactériennes environnementales, constituent le groupe des mycobactéries non tuberculeuses (MNT). La dénomination MNT sert à distinguer ces microorganismes de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, qui sont les agents infectieux de la tuberculose et de la lèpre. Contrairement à leurs homologues MNT, aucun de ces deux derniers organismes n'est présent dans l'environnement. Ils ne constituent donc pas une préoccupation en matière d'eau potable.

Les bactéries du complexe *Mycobacterium avium* peuvent être retrouvées dans tous les types d'eau de par leur grande capacité de survie et de reproduction. Elles peuvent par exemple se multiplier dans l'eau à des températures allant jusqu'à 51°C (Sniadack *et al.*, 1992) ainsi qu'en milieu acide à des pH allant jusqu'à 4 (Kirschner *et al.*, 1999). Une personne peut être infectée par voie alimentaire, respiratoire ou cutanée.

Les manifestations cliniques d'infection par ces microorganismes peuvent inclure une toux productive, de la fatigue, de la fièvre ainsi qu'une perte de poids. Les sujets immunocompétents qui n'ont pas de maladies sous-jacentes ont un très faible risque de présenter des symptômes du fait de la faible pathogénicité de ces microorganismes.

- ***Helicobacter pylori***

Helicobacter pylori a été détecté dans de l'eau de surface ainsi que dans de l'eau souterraine peu profonde (Hegarty *et al.*, 1999). L'estomac humain est jusqu'à présent le seul réservoir important connu de *H. pylori* (Dunn *et al.*, 1997). Des études montrent que cette bactérie peut coloniser l'estomac humain et produire une infection chronique associée à une réaction inflammatoire. Des liens ont été établis entre infection à *H. pylori* et la gastrite, les ulcères duodénaux et un risque accru d'adénocarcinome gastrique. L'eau et les aliments semblent avoir une importance moindre dans la transmission d'*H. pylori* dans les pays développés, par contre certaines études réalisées dans des pays en voie de développement ont montré que la

transmission de cette bactérie était attribuable à une hygiène médiocre ou à la consommation d'eau contaminée (Klein *et al.*, 1991 ; Hopkins *et al.*, 1993).

1.2. Protozoaires pathogènes

Les protozoaires pathogènes pour l'Homme sont particulièrement préoccupants car leur cycle parasitaire comporte une forme infectieuse appelée kyste ou oocyste qui présente une résistance élevée aux conditions environnementales en milieu hydrique et qui est également extrêmement résistante aux traitements de désinfection de l'eau.

Les principaux protozoaires d'intérêt dans le cadre de contaminations humaines par de l'eau de distribution dans les pays développés sont *Cryptosporidium* et *Giardia*. Les amibes seront également décrites bien qu'elles concernent plutôt les pays en voie de développement.

- ***Cryptosporidium***

Il s'agit d'un parasite intracellulaire transmis par l'eau sous forme d'oocyste rond, d'un diamètre de quatre à six μm , à paroi double et très résistant dans l'environnement. Après ingestion, le parasite poursuit son cycle de vie dans le tube digestif en se dékystant et libérant des sporozoïtes qui se multiplient dans les entérocytes. La période prépatente varie entre 2 et 25 jours (Dupont *et al.*, 1995). Le symptôme généralement associé à la maladie est la diarrhée, caractérisée par des selles très aqueuses et non sanglantes. Le volume de diarrhée peut être extrêmement important, 3 L/jour étant commun. Des valeurs atteignant 17 L/jour ont été rapportées chez des personnes immunodéprimées (Navin et Juranek, 1984). Ce symptôme peut s'accompagner de nausées, de vomissements (particulièrement chez les enfants), de température subfébrile (inférieure à 39 °C), d'anorexie et de déshydratation. La durée de l'infection dépend de l'état immunitaire (Juranek, 1995) et permet de distinguer trois catégories: (1) celle des personnes immunocompétentes qui se débarrassent de l'infection en 7 à 14 jours, (2) celle des personnes atteintes du SIDA ou dont le système immunitaire est fortement affaibli et qui, dans la plupart des cas signalés, ne se débarrassent jamais complètement de l'infection et (3) celle des personnes immunodéprimées à la suite d'une chimiothérapie, d'une dépression ou d'une maladie de courte durée (par exemple, la varicelle) ou d'une malnutrition pour lesquelles l'infection disparaît généralement dans les 10 à 15 jours qui suivent le retour à la normale du système immunitaire. Cette parasitose était notamment

très préoccupante avant l'apparition de la trithérapie anti-VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain).

- ***Giardia***

Ce protozoaire est transmissible par l'eau sous forme de kystes ovoïdes (de huit à 14 µm de longueur sur 7 à 10 µm de largeur) stables dans l'environnement et qui sont évacués dans les fèces, généralement en grand nombre. Lorsqu'un hôte ingère ces kystes, le dékystement est initié au niveau de l'estomac et les trophozoïtes qui constituent la forme infectante sont libérés au niveau du duodénum où ils se multiplient par division binaire. La période prépatente pour la giardiose est de 6 à 16 jours et la dose minimale infectieuse peut être de seulement un à dix kystes (Rendtorff, 1978). Les symptômes comprennent des nausées, une anorexie, des douleurs abdominales et des selles pâteuses (de couleur chamois chez les enfants), parfois associés à de la fièvre. La phase aiguë de l'infection se dissipe souvent de façon spontanée et certains patients deviennent alors des porteurs asymptomatiques.

- **Les amibes**

Les amibes ne sont pas, dans l'ensemble, considérées comme pathogènes à l'exception d'*Entamoeba histolytica* qui provoque des dysenteries, de certaines amibes comme *Naegleria fowleri* qui provoque des méningo-encéphalites mortelles et de certaines souches d'*Acanthamoeba* qui induisent des kératites chez les porteurs de lentilles, voire des encéphalites mortelles dans de très rares cas. Certaines bactéries comme *Legionella pneumophila* sont capables de se développer chez les amibes des genres *Acanthamoeba* et *Hartmannella*, elles sont ensuite expulsées de leurs hôtes et contaminent le milieu hydrique.

1.3. Les virus entériques pathogènes

Les virus excrétés par voie fécale et retrouvés dans le milieu hydrique peuvent être pathogènes pour l'homme (virus entériques pathogènes) ou vivre aux dépens de bactéries intestinales (bactériophages fécaux). Parmi les microorganismes pathogènes transmissibles par l'eau, les virus jouent un rôle important en raison de leur forte densité dans les eaux usées, de leur résistance aux traitements d'épuration (physiques ou chimiques) et de leur persistance dans l'environnement hydrique. La dose minimale infectieuse (D.M.I.) de ces virus est faible, de l'ordre de 1 à 10 particules infectieuses pour les entérovirus (Schwartzbrod et

Schwartzbrod, 1999). Ces virus sont excrétés pendant une à quatre semaines à des concentrations pouvant atteindre 10^{11} particules virales par gramme de selles (Leclerc *et al.*, 2002) et sont ensuite retrouvés dans les eaux usées. Les infections virales liées à la consommation d'eau potable sont certainement sous estimées car leur détection dans l'eau n'est pas intégrée dans le contrôle sanitaire.

1.3.1. Structure des virus entériques pathogènes

Les virus d'origine fécale susceptibles de persister dans l'environnement sont essentiellement des virus nus c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas d'enveloppe mais uniquement une capsid protéique et un génome. La majorité de ces virus entériques pathogènes présentent des similitudes structurales sur plusieurs points. Il s'agit essentiellement de virus dont la capsid mesure entre 20 et 40 nm de diamètre. La capsid est constituée d'une à quatre sous unités protéiques qui s'assemblent selon une symétrie cubique. Les adénovirus ont une capsid plus complexe mesurant de 80 à 110 nm de diamètre et les rotavirus mesurent environ 75 nm de diamètre. En microscopie électronique, les rotavirus ont l'aspect d'une roue, d'où leur nom (**Figure 1**). Le support de l'information génétique est majoritairement un ARN simple brin et la taille du génome est comprise entre sept et neuf kilobases. Cependant, les adénovirus ont un génome à ADN et les rotavirus ont, quant à eux, un génome à ARN double brin. La classification et les caractéristiques morphologiques de ces virus sont détaillées dans le **tableau 2**.

1.3.2. Présentation des principaux virus entériques en fonction de leur pathogénicité

Les virus entériques pathogènes sont généralement classés en fonction des pathologies dont ils sont responsables. Après une contamination de l'homme par voie orale ils sont en majorité responsables de gastro-entérites mais, provoquent également des hépatites ou d'autres pathologies comme des atteintes neuro-méningées (paralysies, méningites...).

Tableau 2 : Caractéristiques des principaux virus entériques humains responsables de pathologies liées à l'eau (Koopmans and Duizer, 2004 ; Carter, 2005 ; Fauquet *et al.*, 2005)

Maladie	Nom commun des virus	Famille	Genre	Morphologie des virus	Taille (nm)	Nature de génome	Taille du génome (kb ou kpb)	Configuration du génome
Gastroentérite	Norovirus	<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	icosaédrique	27 – 30	ARN sb	7-8	1 segment
	Sapovirus	<i>Caliciviridae</i>	<i>Sapovirus</i>	icosaédrique	27 – 30	ARN sb	7-8	1 segment
	Adénovirus	<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	icosaédrique	80 – 110	ADN db	26-45	linéaire
	Rotavirus	<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	icosaédrique	75	ARN db	19-32	11 segments
	Astrovirus	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	icosaédrique	28	ARN sb	6-7	1 segment
Hépatite	Virus de l'hépatite A	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepatovirus</i>	icosaédrique	25 – 28	ARN sb	7-9	1 segment
	Virus de l'hépatite E	<i>Hepeviridae</i>	<i>Hepevirus</i>	icosaédrique	30	ARN sb	7	1 segment
Autres*	Entérovirus	<i>Picornaviridae</i>	<i>Human enterovirus</i>	icosaédrique	27	ARN sb	7-9	1 segment

* les entérovirus sont responsables d'une grande variété de symptômes, notamment des symptômes neuroaux

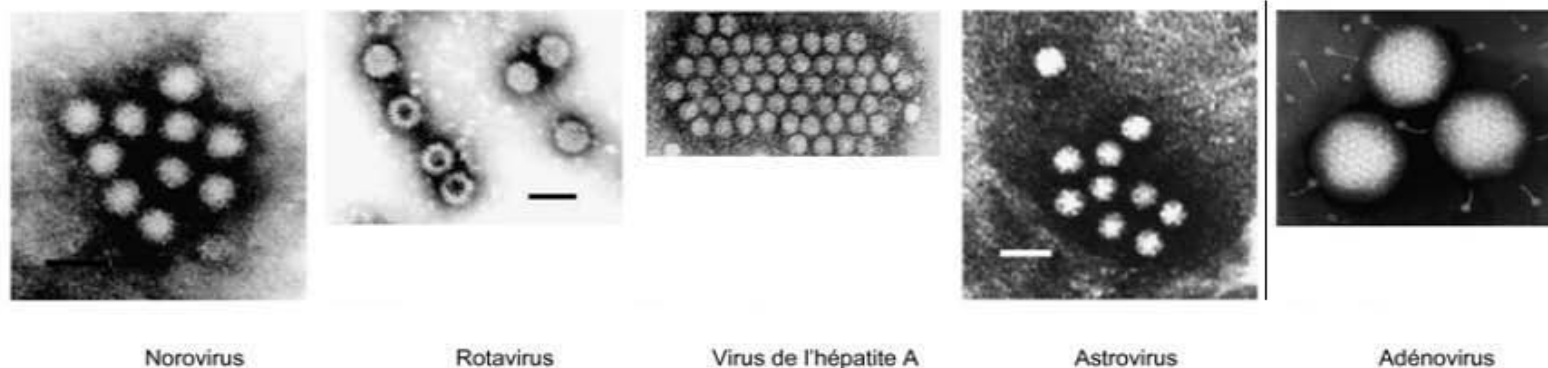


Figure 1 : Microscopie électronique des principaux virus entériques associés à une transmission liée à l'eau (Koopmans and Duizer, 2004)

- **Les virus des gastro-entérites**

Au moins quatre genres viraux (impliquant plusieurs espèces et génogroupes) peuvent provoquer des gastro-entérites :

- Le genre *Norovirus* appartient à la famille des *Caliciviridae* et comporte cinq génogroupes différents (GI à GV). Les génogroupes I, II (correspondant au virus de type Norwalk) et IV infectent l'homme. Le génogroupe III est associé aux infections des bovins et le génogroupe V a été récemment isolé chez des souris. Ces différents génogroupes peuvent eux-mêmes être divisés en différents génotypes. Ainsi, 17 génotypes sont actuellement distingués dans le génogroupe II, qui est le plus fréquemment isolé chez l'Homme. Les norovirus constituent la cause principale de gastro-entérites virales dans les pays développés (Carter, 2005) et touchent toutes les classes d'âge. La période d'incubation est de 24 à 48 heures, les symptômes sont spontanément résolutifs et durent généralement 24 à 48 heures. Les norovirus ont une faible dose minimale infectieuse et une grande résistance dans l'environnement d'où leur impact épidémiologique (Blanton *et al.*, 2006). Ces virus sont excrétés dans les matières fécales et les vomissures des personnes infectées. Les infections à norovirus sont saisonnières avec un pic épidémique en période hivernale (Mounts *et al.*, 2000 ; Maunula *et al.*, 2005).

- Le genre *Rotavirus* appartient à la famille des *Reoviridae* et comprend les génogroupes A, B et C qui provoquent des diarrhées pouvant être sévères surtout chez les enfants (Schwab, 2007). Les espèces des groupes D, E, F et G infectent uniquement les animaux. Le rotavirus du groupe A, responsable de diarrhées infantiles ou hivernales est retrouvé dans le monde entier et constitue le groupe le plus courant et le plus répandu. Les enfants de six mois à deux ans, les prématurés, les personnes âgées et les sujets immunodéficients sont plus susceptibles de présenter des diarrhées sévères. Les rotavirus seraient responsables de la moitié des hospitalisations dues aux gastro-entérites, notamment à cause de la déshydratation. La période d'incubation varie de quatre à sept jours (Carter, 2005) et les symptômes durent généralement de cinq à huit jours. L'atteinte peut être bénigne, et dure alors moins de 24 heures, ou plus grave voire mortelle. Chez les jeunes enfants, les manifestations extra-intestinales, telles que des symptômes respiratoires et des convulsions peuvent survenir du fait que l'infection est systémique plutôt que localisée à la muqueuse jéjunale (Candy, 2007). Le virus est excrété à des concentrations très élevées pouvant atteindre jusqu'à 10^9 particules virales/gramme de selles.

- Les adénovirus de la famille des *Adenoviridae* sont des virus de 70 à 100 nm de diamètre et sont divisés en quatre genres : *Siadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* et *Mastadenovirus*. Les génogroupes humains appartiennent tous au genre *Mastadenovirus*. Ils sont essentiellement responsables d'infections des voies aériennes supérieures comme des pharyngites, pneumonies et conjonctivites (Carter, 2005). Certains sérotypes (40 et 41) sont responsables de gastro-entérites surtout chez les enfants de moins de cinq ans, les infections étant le plus souvent asymptomatiques chez l'adulte (Jiang, 2006). La charge virale des personnes infectées est élevée (10^6 particules virales/gramme de matière fécale), la période d'incubation dure de trois à six jours et les symptômes peuvent durer une semaine.

- Les astrovirus humains sont des membres du genre *Mamastrovirus* et appartiennent à la famille des *Astroviridae*. Huit sérotypes d'astrovirus humains ont été identifiés. En microscopie électronique, ils présentent un motif en étoile au centre de leur capsid d'où leur nom. Ils sont essentiellement responsables de gastro-entérites chez l'enfant, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. L'infection provoque généralement une diarrhée moins sévère que celle causée par les rotavirus et ne provoque pas de déshydratation importante. Les infections à astrovirus sont plus fréquentes au cours de l'hiver et du printemps (Gofti-Laroche *et al.*, 2003).

- **Les virus des hépatites**

A ce jour, six virus provoquant des hépatites primitives, c'est-à-dire dont la cible principale voire unique est l'hépatocyte, ont été identifiés. Il s'agit des virus des hépatites A, B, C, D, E et G. Seulement deux d'entre eux sont transmis par voie oro-fécale et donc associés à la transmission d'origine hydrique, il s'agit des virus de l'hépatite A (VHA) et de l'hépatite E (VHE).

Le VHA appartient à la famille des *Picornaviridae* et se divise en six génotypes (I à VI) parmi lesquels seuls les génotypes I, II et III sont pathogènes pour l'Homme. La période d'incubation varie de 10 à 50 jours et la convalescence peut être longue (huit à dix semaines) et dans certains cas les personnes infectées peuvent avoir des rechutes pendant douze mois ou plus (Carter, 2005). Le VHA est responsable d'hépatites aiguës se traduisant généralement par une fatigue, une fièvre, des nausées, des malaises, une anorexie, suivis en quelques jours d'un ictère. La gravité de l'infection dépend en partie de l'âge de la personne infectée. En effet, les

enfants présentent généralement une forme asymptomatique, alors que les adultes développent majoritairement une forme ictérique (Pinto et Saiz, 2007). Les formes fulminantes constituent le principal risque. Le virus est excrété dans les selles des personnes infectées trois à dix jours et jusqu'à un mois après l'apparition des symptômes.

Le VHE a été découvert dans les années 1980. Sur le plan clinique, il est impossible de différencier les infections à VHA et VHE. La période d'incubation varie de deux à neuf semaines et l'infection se résorbe habituellement en une à six semaines. On distingue quatre génotypes majeurs, le I est retrouvé en Asie et en Afrique, le II au Mexique et en Asie, le III est ubiquitaire et le IV n'est retrouvé qu'en Asie. Il est maintenant démontré que l'hépatite E est une zoonose et que de nombreuses espèces animales domestiques et sauvages (porcs, cerfs, sangliers...) sont infectées par le VHE constituant ainsi le réservoir naturel du virus. Le VHE est responsable d'hépatites aiguës (Panda *et al.*, 2007) touchant le plus souvent les jeunes adultes et les adultes d'âge moyen (15 à 40 ans). Le problème majeur est le taux de mortalité élevé chez la femme enceinte (20 à 25%) (Matson, 2004). Les virions sont excrétés dans les selles pendant au minimum une semaine après l'apparition des symptômes (Percival *et al.*, 2004).

- **Les pathologies à *Enterovirus***

Les entérovirus constituent un grand groupe de virus appartenant au genre *Enterovirus* et à la famille des *Picornaviridae*. Ils regroupent les coxsackievirus A (23 sérotypes) et B (6 sérotypes), les poliovirus (trois sérotypes), les echovirus (31 sérotypes). Plus de 80 sérotypes différents ont déjà été identifiés et reportés par le Comité International de Taxonomie des Virus. Le réservoir de ces virus est strictement humain et on distingue généralement le poliovirus des autres entérovirus. Ce dernier est responsable de la poliomyélite correspondant à l'apparition brutale d'une paralysie mettant en jeu le pronostic vital. Les autres entérovirus provoquent des symptômes très variés tels que des irritations de la gorge, des maladies des voies respiratoires supérieures et les complications les plus graves comprennent des paralysies, méningites, atteintes cardiaques... Les infections à entérovirus atteindraient leur pic au cours de l'été et au début de l'automne (Nwachuku et Gerba, 2006).

2. Les origines possibles des contaminations des systèmes de distribution d'eau

Les matières fécales humaines constituent la principale source de microorganismes fécaux humains dans l'eau. Afin d'éviter le risque d'intrusion de contaminants biologiques dans un réseau de distribution d'eau, il convient de limiter l'intrusion de microorganismes pathogènes en appliquant une approche comportant l'évaluation du système d'approvisionnement en eau potable dans son ensemble : de la source d'eau jusqu'au consommateur, en contrôlant les techniques de traitement ainsi que le réseau de distribution. La présence de microorganismes pathogènes au robinet du consommateur peut être la résultante d'une contamination au niveau de la ressource en eau, d'une défaillance au niveau des traitements de potabilisation ou d'une contamination au niveau du réseau de distribution d'eau.

2.1. Contamination de la ressource en eau

La qualité de la source en eau utilisée pour approvisionner le système joue un rôle important. Les ressources en eau utilisées pour l'élaboration d'eau destinée à la consommation sont normalement protégées par un périmètre de sécurité visant à éviter le contact avec une éventuelle pollution microbiologique. Cependant, une contamination par une pollution fécale inhabituelle peut survenir si ce périmètre est inexistant, mal évalué ou en cas de crues, de contact accidentel avec des effluents de station d'épuration, des décharges de bassins de stabilisation eaux usées, des débordements de réseaux d'égout, ou des fuites de fosses septiques. Si une pollution virale d'origine fécale est bien entendue présente au niveau des eaux usées et des eaux de surface, elle peut également être détectée dans les eaux souterraines dans le monde entier. A titre d'exemple, des études rapportent des concentrations variables en virus entériques de l'ordre de 100 à 10 000 unités infectieuses/L dans les eaux usées (Sano *et al.*, 2004 ; Sedmark *et al.*, 2005), de 1 à 100 virions/L dans les eaux de surface contaminées (Gerba *et al.*, 1985 ; Dorner *et al.*, 2007) et les taux seraient très faibles (< 2/100 L) dans la plupart des eaux souterraines contaminées.

2.2. Contamination consécutive à une défaillance lors du traitement de potabilisation

Les traitements appliqués dans les stations de potabilisation peuvent être momentanément inefficaces ou inadaptés notamment lors d'une pollution accidentelle de la ressource en eau

supérieure aux valeurs habituelles. L'étape de clarification est notamment primordiale pour assurer une eau de qualité. En effet, une mauvaise hydraulique au niveau des décanteurs, des concentrations insuffisantes en coagulant, floculant, oxydant, ainsi qu'une filtration inadaptée peuvent être responsables de la présence de microorganismes inhabituels dans l'eau distribuée. Un fonctionnement discontinu de la filière de traitement peut également aboutir au non respect de la qualité microbiologique de l'eau par relargage de microorganismes, par exemple lors de la remise en service des filtres.

2.3. Contamination résultant d'un accident sur le réseau de distribution d'eau

La présence de fissures au niveau des réservoirs d'eau potable, des ruptures de canalisations, des accidents associés aux opérations de réparation et d'entretien du réseau peuvent également être responsables d'une contamination de l'eau. A titre d'exemple, une contamination extérieure peut entrer au sein d'un réseau de distribution d'eau au cours d'évènements provoquant une diminution de la pression dans une canalisation (Walski et Lutes, 1994 ; Qaqish *et al.*, 1995). Karim *et al.* (2003) ont analysé 66 échantillons de sol et d'eau directement en contact avec des canalisations d'arrivée d'eau potable dans des toilettes publiques. L'objectif était de déterminer l'éventuelle présence de microorganismes pathogènes en contact avec les tuyaux. Plus de la moitié des échantillons contenaient des coliformes fécaux indiquant la présence d'une pollution fécale. La présence de génome viral a été détectée dans 19% des échantillons de sol et 47% des échantillons d'eau et la présence de virus entériques infectieux a été détectée dans 12% des échantillons de sol et d'eau. La pollution virale était essentiellement composée d'entérovirus (souche vaccinale de poliovirus) mais également de norovirus ainsi que de VHA, prouvant clairement la présence de pollution fécale d'origine humaine en contact direct avec les canalisations du réseau de distribution.

3. Contrôle sanitaire de l'eau de distribution

Le code de la santé publique (Art. R1321-2) spécifie que « *Les eaux destinées à la consommation humaine, ne doivent pas contenir un nombre ou une concentration de microorganismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes* ». Il existe à ce sujet des recommandations au niveau international (recommandations de l'OMS révisées en 2004) et une réglementation

européenne (Directive 98/83/CE) traduite en droit français (Décret N°2001-1220 du 20 décembre 2001).

La recherche systématique de tous les microorganismes pathogènes serait techniquement et économiquement impossible. La stratégie du contrôle sanitaire des eaux repose sur la recherche de bactéries dites « germes témoins de contamination fécale », faciles à détecter, non directement pathogènes pour l'homme, mais dont la présence peut être considérée comme un indicateur de contamination par des germes indésirables. Afin de suivre la qualité microbiologique des eaux traitées et distribuées il est d'usage de chercher la présence de ces indicateurs comme marqueurs de pollution fécale dans le contrôle et la surveillance de la qualité de l'eau, comme témoins de l'efficacité de procédés comme la filtration ou la désinfection, comme témoins de l'intégrité et de la propreté des systèmes de distribution d'eau. Le dispositif de contrôle est basé sur la recherche de ces indicateurs microbiologiques couplée à l'analyse d'autres paramètres physiques et organoleptiques.

3.1. Les critères d'un bon indicateur de pollution fécale

Les critères à prendre en compte pour définir un bon indicateur de pollution fécale sont :

- sa **spécificité** : l'indicateur doit être présent dans une eau qui a été souillée par des matières fécales, de préférence en plus grande quantité que les pathogènes et absent d'une eau qui est exempte de toute contamination fécale.

- sa **résistance** : l'indicateur doit avoir les mêmes caractéristiques de résistance que le microorganisme dont il est l'indice. On préfère généralement, que l'indicateur soit légèrement plus résistant que le ou les microorganismes qu'il représente permettant ainsi d'introduire la notion de risque de contamination fécale.

- l'**accessibilité du contrôle** : l'indicateur doit pouvoir être contrôlé rapidement, spécifiquement et facilement en laboratoire pour un coût abordable en analyse de routine.

- l'**absence de multiplication** dans l'environnement : l'indicateur doit être incapable de se multiplier en dehors de son hôte.

- l'**absence de pathogénicité** : l'indicateur ne doit pas être pathogène pour l'homme.

3.2. Les principaux indicateurs de pollution fécale utilisés en France

Historiquement, ce sont les bactéries fécales qui ont été sélectionnées comme outils pour prédire la présence de pathogènes aussi bien d'origine bactérienne, que virale ou parasitaire. La législation française classe les indicateurs de pollution fécale en deux catégories, d'une part les bactéries indiquant des limites de qualité et d'autre part celles indiquant des références de qualité

Dans ce cadre, les indicateurs microbiologiques utilisés comme limites de qualité pour des eaux destinées à la consommation humaine doivent être absents dans 100 mL d'eau analysée. Ce sont :

- Escherichia coli* : cette bactérie appartient aux coliformes thermotolérants associés à la contamination fécale. *E. coli* est un hôte normal de notre intestin et de celui des animaux à sang chaud. A l'heure actuelle, *E. coli* est sans doute le plus utilisé des indicateurs de contamination fécale. Elle présente néanmoins l'inconvénient d'être peu résistante à certaines conditions environnementales. La présence d'*E.coli* est considérée comme un indicateur certain d'une pollution fécale récente.

- Les entérocoques : ce sont des bactéries de la flore digestive de l'homme et des animaux. *E. faecalis* est l'espèce la plus fréquemment isolée chez l'homme, suivie par *E. faecium*. Ces bactéries sont plus résistantes face à des conditions environnementales difficiles (par exemple pH élevé et forte concentration en sel) que les coliformes.

Les indicateurs microbiologiques utilisés comme références de qualité pour des eaux destinées à la consommation humaine sont présents en concentration plus importantes qu'*E. coli* et les entérocoques dans les ressources utilisées pour la production d'eau potable. Ils sont utilisés essentiellement pour évaluer l'efficacité des traitements de potabilisation et ne doivent pas être détectés dans 100 mL d'eau. Ces paramètres sont :

- Les bactéries coliformes : les coliformes totaux ne sont pas tous d'origine fécale, c'est pourquoi l'on utilise un sous-groupe de coliformes capables de survivre et de croître à 44°C également appelés "coliformes thermotolérants", dont l'origine fécale est plus nette.

- Les spores de bactéries sulfito-réductrices : l'intérêt de la recherche de tels indicateurs réside dans la détection de leurs spores particulièrement résistantes aux traitements de désinfection. *Clostridium perfringens* et plus particulièrement ses spores ont une résistance qui se rapproche de celle des microorganismes fécaux les plus résistants. Leur absence indique que le risque de contamination fécale est très faible. Leur inconvénient est qu'ils sont

très peu nombreux dans l'eau contaminée par des matières fécale. Les spores de ces bactéries sont actuellement considérées comme de bons indicateurs de l'efficacité des procédés de filtration de part leur forme et leur taille. Les procédés de filtration sont importants notamment pour l'élimination des parasites et en particulier de *Cryptosporidium*.

-La numération de germes aérobies revivifiables à 22 et 37°C ne doit pas présenter une variation dans un rapport supérieur à 10 par rapport à la valeur habituelle.

En France, comme dans la plupart des autres pays, il n'existe pas de recommandations spécifiques concernant les algues, *Legionella*, *Mycobacterium* atypiques, *Giardia*, *Cryptosporidium* ou les virus. Cependant, des analyses spécifiques peuvent être mises en place pour les virus entériques, *Cryptosporidium* et *Giardia*, en cas d'alerte de niveau 2 correspondant à la présence confirmée d'indicateurs de contamination fécale dans l'eau.

4. Moyens de prévention

S'il est impossible d'éliminer complètement le risque de maladie d'origine hydrique, l'adoption d'une approche à barrières multiples, de la source au robinet, permet de réduire le nombre de microorganismes dans l'eau potable. Cette approche englobe la protection de la source d'eau, l'emploi de méthodes de traitement appropriées et efficaces, des réseaux de distribution bien entretenus et la vérification régulière de la qualité de l'eau distribuée. En dehors des eaux souterraines très profondes qui sont relativement bien protégées des contaminations, la majorité des ressources utilisées pour la production d'eau potable est susceptible de contenir des microorganismes. Il faut en priorité caractériser les risques inhérents à la ressource en eau et s'assurer que des procédés de traitement efficaces sont mis en œuvre pour obtenir une eau potable de bonne qualité. Ainsi, en fonction de leur qualité microbiologique les ressources en eau sont classées en trois catégories A1, A2 et A3. Le **tableau 3** donne les caractéristiques microbiologiques permettant de classer les eaux de ressource.

Le but du traitement de potabilisation n'est pas de produire une eau stérile, mais une eau ne présentant pas de risque du point de vue de la santé publique. Dans la plupart des cas, l'adoption d'une approche à barrière multiple inclut des traitements tels que la coagulation, la floculation, la sédimentation, la filtration et la désinfection.

Tableau 3. Limites de qualité microbiologique des eaux destinées à la production d'eau pour la consommation humaine (Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001).

<i>Paramètres</i>	<i>Traitements appliqués</i>		
	A1	A2	A3
Coliformes totaux (37°C) /100mL	50	5 000	50 000
<i>Escherichia coli</i> /100mL	20	2 000	20 000
Entérocoques /100mL	20	1 000	10 000
Salmonelles	Absent dans 5L	Absent dans 1L	

Le **tableau 4** (adapté de WHO, 2011) présente une synthèse des traitements généralement appliqués dans un but d'élimination microbienne.

Les abattements des concentrations en microorganismes sont indiqués en valeur logarithmiques ($\log_{10}$) de la concentration en microorganismes. Les abattements minimums sont retrouvés en cas de défaut de traitement et les abattements maximums en conditions optimales de traitement. Ce tableau décrit séparément les abattements obtenus pour les bactéries, parasites et virus car l'efficacité des traitements varie en fonction du groupe microbien considéré.

Les prétraitements sont des procédés physiques destinés à retenir les gros déchets par de simples grilles et les déchets plus fins sur des tamis à fines mailles.

La clarification inclut des étapes de coagulation/floculation, de décantation et de filtration. La coagulation est un procédé physico-chimique destiné à provoquer l'agrégation des particules en suspension afin de former une masse appelée « floc ». Les réactifs utilisés sont généralement des sels de fer ou d'aluminium. La décantation se produit dans un décanteur, elle permet aux « floccs » de sédimenter afin de récupérer de l'eau clarifiée. Enfin la filtration permet de retenir physiquement les matières en suspension n'ayant pas été piégées lors des étapes de coagulation et de décantation. La plus répandue est la filtration sur lit de sable, cette dernière nécessite un nettoyage périodique du sable afin d'éliminer les matières retenues entre les grains. La filtration peut également être réalisée sur des membranes comportant des pores de très petites dimensions (microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, osmose inverse). Ces dernières méthodes de filtration présentent cependant l'inconvénient d'être onéreuse.

Tableau 4. Abattements bactériens, viraux et de protozoaires après application de traitements en station de potabilisation (Adapté de WHO, 2011).

Procédé de traitement	Pathogène	A _{min}	A _{max}	Commentaires
Prétraitement				
Préfiltres	Bactéries	0,2	2,3	Dépend du filtre intermédiaire, coagulant
Réservoirs de stockage	Bactéries	0,7	2,2	Durée de résistance >40 jours
	Protozoaires	1,4	2,3	Durée de résistance : 160 jours
Filtration sur berges	Virus	>2,1	8,3	Dépend de la distance parcourue, du type de sol, du type de pompage, du pH, de la force ionique
	Bactéries	2	>6	
	Protozoaires	>1	>2	
Coagulation, floculation et sédimentation				
Clarification conventionnelle	Virus	0,1	3,4	Dépend des conditions de coagulations
	Bactéries	0,2	2	
	Protozoaires	1	2	
Clarification poussée	Protozoaires	>2	2,8	Dépend du polymère de couverture
Flottation à l'air dissous	Protozoaires	0,6	2,6	Dépend de la dose de coagulant
Adoucissement à la chaux	Virus	2	4	Dépend du pH et du temps de stabilisation
	Bactéries	1	4	
	Protozoaires	0	2	
Filtration				
Filtration granulaire à haut débit	Virus	0	3,5	Dépend du filtrant et de la coagulation comme prétraitement
	Bactéries	0,2	4,4	
	Protozoaires	0,4	3,3	
Filtration lente sur lit de sable	Virus	0,25	4	Dépend de la taille des grains, du débit, les conditions d'exploitation (température, pH)
	Bactéries	2	6	
	Protozoaires	0,3	>5	
Filtration par couches	Virus	1	1,7	
	Bactéries	0,2	2,3	
	Protozoaires	3	6,7	
Filtration sur membranes, microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, osmose inverse	Virus	<1	>6,5	Varie avec la taille des pores de la membrane (microfiltres, ultrafiltres, nanofiltres et filtres d'osmose inverse), l'intégrité du préfiltre et sa fixation, et sa résistance à la dégradation chimique et biologique.
	Bactéries	1	>7	
	Protozoaires	2,3	>7	
Désinfection primaire				
Chlore	Virus	2 (Ct ₉₉ 2-30 min.mg/l; 0-10°C; pH 7-9)		Le chlore libre x temps prédit l'efficacité; pas applicable sur les oocystes de <i>Cryptosporidium</i> .
	Bactéries	2 (Ct ₉₉ 0,04-0,08 min.mg/l; 5°C; pH 6-7)		
	Protozoaires	2 (Ct ₉₉ 25-245 min.mg/l; 0-25°C;pH 7-8; principalement <i>Giardia</i>)		
Dioxyde de chlore	Virus	2 (Ct ₉₉ 2-30 min.mg/l; 0-10°C;pH 7-9)		
	Bactéries	2 (Ct ₉₉ 0,02-0,3 min.mg/l; 15-25°C;pH 6.5-7)		
	Protozoaires	2 (Ct ₉₉ 100 min.mg/l)		
Ozone	Virus	2 (Ct ₉₉ 0,006-0.2 min.mg/l)		Les virus sont généralement plus résistants que les bactéries
	Bactéries	2 (Ct ₉₉ 0,02 min.mg/l)		
	Protozoaires	2 (Ct ₉₉ 0,5-40 min.mg/l)		
UV	Virus	4 (7-186 mJ/cm ²)		Dépend de la température; <i>Cryptosporidium</i> varie largement
	Bactéries	4 (0,65-230 mJ/cm ²)		
	Protozoaires	4 (< 1-60 mJ/cm ²)		

Ct, produit de la concentration en désinfectant et du temps de contact; LRV, log₁₀ valeur de réduction

L'affinage fait intervenir des procédés d'ozonation, de filtration sur charbon actif ou de filtration sur membranes et a pour but l'élimination de certains micropolluants et l'amélioration des qualités organoleptiques de l'eau.

Enfin, l'étape de désinfection est la plus importante. Elle n'est efficace que si l'eau est préalablement bien traitée. Elle est le plus souvent effectuée par des procédés chimiques tels que l'oxydation par des agents chlorés, de l'ozone ou des rayonnements ultraviolets. Il existe également des procédés physiques de désinfection par l'utilisation de membranes de filtration. La chloration est actuellement le procédé de désinfection le plus appliqué de par son faible coût et sa simplicité de mise en œuvre. De plus, cet oxydant présente l'avantage de pouvoir maintenir une concentration résiduelle en oxydant dans le réseau de distribution. L'ozone est très fréquemment utilisé par les usines qui produisent de l'eau à partir d'eaux de surface pour son grand pouvoir désinfectant notamment vis-à-vis des virus et des spores bactériennes. Cependant sa production est coûteuse et sa mise en œuvre relativement complexe. Enfin les rayonnements ultraviolets ainsi que la filtration sur membrane empêchent théoriquement tout microorganisme de pénétrer dans le réseau de distribution, cependant tout comme l'ozone, ces traitements ont une action limitée dans le temps et leur utilisation nécessite donc l'utilisation de désinfectant chloré en aval afin de limiter les conséquences d'une contamination ultérieure dans les réseaux de distribution.

Les ressources en eaux du groupe A1 ne subissent qu'un traitement physique simple associé à une désinfection. Les ressources du groupe A2 subissent un traitement physique, chimique et une désinfection. Enfin, les eaux du groupe A3 doivent subir un traitement physique et chimique poussé en association avec des opérations d'affinage et de désinfection.

DEUXIEME PARTIE :

Cas d'infections virologiques liées à la consommation d'eau

et prise en charge thérapeutique

Les gastro-entérites virales surviennent souvent chez les enfants de moins de trois ans et représentent l'un des premiers motifs de consultation en médecine, principalement en pédiatrie. Dans les pays tempérés ces infections surviennent dans un contexte épidémique et saisonnier et sont surtout observées pendant l'hiver. La prise en charge précoce et adaptée a permis de réduire la gravité de ces infections qui restent cependant d'un coût économique important. Ainsi, aux USA le coût médical direct et indirect est estimé entre 400 et 600 millions de dollars (Tucker *et al.*, 1998).

1. Exemples de contaminations virales liées à la consommation d'eau contaminée

Les gastro-entérites représentent un problème de santé publique mondial avec une morbidité et une mortalité importante (**Figure 2**). L'OMS reporte que chaque année environ 500 000 enfants de moins de cinq ans meurent des suites d'une infection à rotavirus, la plupart de ces enfants vivants dans les pays en voie de développement (WHO, 2009). En France, comme dans les autres pays industrialisés, les infections virales sont la cause d'une importante morbidité ayant des répercussions financières directes sur les budgets de santé et indirectes par les coûts induits.

Les contaminations virales humaines liées à l'eau du robinet sont peu fréquentes dans les pays développés. Des réseaux tels que l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), NoroNet, CaliciNet, ViroNet sont chargés de suivre, de surveiller et répertorier les infections liées à des virus entériques dans ces pays. Quelques exemples de contaminations en France, issus de rapports de l'InVS ainsi que dans d'autres pays développés et reliées à la consommation d'eau contaminée illustreront cette partie.

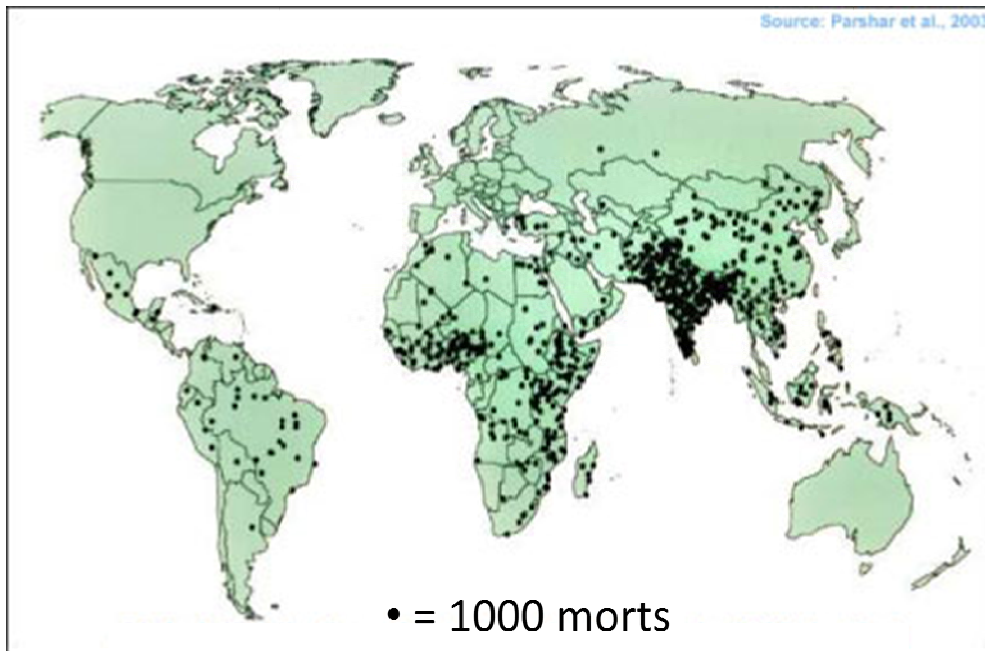


Figure 2. Répartition de la mortalité par gastro-entérites virales, exemple du rotavirus (Parashar *et al*, 2003).

1.1. Exemples de contaminations virales consécutives à la consommation d'eau contaminée en France

En août-septembre 2000, 1037 personnes présentant des symptômes de gastro-entérites ont eu recours à une consultation médicale à Gourdon (Lot). Des analyses d'eau ont été effectuées et ont révélé une non-conformité microbiologique. Une enquête a mis en évidence un dysfonctionnement dans le système de chloration du réseau d'adduction pouvant être responsable de la présence de microorganismes pathogènes dans l'eau. Les analyses de selles de patients malades ont révélé la présence de rotavirus dans 71% des échantillons, de calicivirus dans 21% des échantillons et de *Campylobacter coli* dans 3% des échantillons.

En septembre 2001, une défaillance de la station d'épuration d'eau de Dracy-le-Fort (Saône et Loire) a entraîné 397 cas certains et 86 cas probables de contaminations liées à la consommation d'eau. L'analyse des selles des patients a révélé la présence de *Cryptosporidium parvum* (31,6%), de rotavirus (20%), d'enterovirus (14%), de *Campylobacter jejuni* (14%), d'*E. coli* entéro-pathogène (12%) et d'adenovirus (6%) dans les échantillons.

En 2002, plusieurs communes d'Isère ont été victimes d'une épidémie à norovirus (génogroupe II) suite à la contamination du réseau d'eau de distribution par de l'eau de rivière. L'enquête a révélé plusieurs problèmes, tout d'abord un dysfonctionnement d'une

station d'épuration en amont du captage d'eau, associé à une inondation du périmètre de protection immédiate de la station par de fortes pluies et à un mauvais état du puits de captage. La présence de norovirus a été retrouvée à la fois dans les selles des patients et dans les prélèvements d'eau confirmant ainsi l'implication du réseau.

1.2. Exemples de contaminations virales consécutives à la consommation d'eau contaminée dans des pays développés

En 2002, en Irlande, deux avions atterrissent avec à leur bord de nombreuses personnes présentant simultanément des diarrhées et vomissements d'apparition soudaine. Une enquête a révélé que ces personnes provenaient toutes de Soldeu (Andorre) et avaient probablement consommé des glaçons fabriqués à partir d'eau contaminée par un norovirus.

Une contamination d'un puits privé à la suite d'un débordement du réseau d'égout à Stockholm (Suède) a provoqué l'apparition de 200 cas de gastro-entérite entre mai et juin 2001 (Nygard *et al.*, 2003).

Payment *et al.* (1991 et 1997) ont conduit deux études épidémiologiques qui ont suggéré que des contaminations de réseaux de distribution d'eau potable étaient en partie responsables de l'augmentation des maladies entériques. Ces études ont été menées en comparant la santé de personnes consommant de l'eau de distribution avec celle de personnes consommant cette même eau traitée par osmose inverse et en analysant les éventuels épisodes de gastro-entérites. Les deux études soulignent que les personnes consommant de l'eau de distribution présentent des épisodes de pathologies intestinales plus souvent que le groupe de personnes consommant de l'eau traitée par osmose inverse. De plus, les personnes vivant le plus loin de la station de potabilisation présentent un risque plus fort de contracter des maladies gastro-intestinales. Des modélisations de la pression au sein du réseau de distribution d'eau (Kirmeyer *et al.*, 2001) ont également montré que le tronçon de réseau analysé par Payment *et al.* (1991 ; 1997) était fortement sujet aux diminutions de pression avec plus de 90% des nœuds de connexion de ce système présentant des pressions négatives. De plus, le système situé dans les environs de Montréal a subi de nombreuses ruptures de canalisation notamment durant l'hiver et l'automne à cause de fortes variations de température. Enfin, il a également été montré que l'eau contenait une très faible concentration en désinfectant résiduel particulièrement à la fin du système. Ces différents éléments ont permis de faire un lien entre

la présence de pollution fécale à proximité des canalisations distribuant de l'eau potable, les faiblesses du système de distribution et l'occurrence de maladies gastro-intestinales chez les consommateurs d'eau potable.

Au Québec, une vingtaine de cas d'hépatite A ont pu être mis en relation avec la contamination d'un puits (de Serres *et al.*, 1999).

Enfin, en Finlande à Nokia, suite à une erreur d'un employé, 450 000 litres d'eau usée ont été déversés dans le réseau de distribution d'eau potable. Plus de 1 000 personnes présentant des symptômes de gastro-entérite ont eu recours à une consultation médicale. La présence de différents virus a été détectée à la fois dans les selles des patients, dans l'eau contaminée et dans les eaux usées responsables de la contamination. Ainsi, il a été possible d'identifier par biologie moléculaire, des norovirus, des astrovirus, des rotavirus, des adénovirus et des entérovirus.

Un réseau de distribution peut également être incriminé à tort. A titre d'exemple, en juillet-octobre 2004, dans le département des Landes, plusieurs cas d'hépatites A sont détectés dans cinq communes limitrophes, desservies par le même réseau de distribution d'eau. Près de la moitié des cas avaient participé à des fêtes de village et consommé l'eau de distribution. Cependant l'enquête n'a révélé ni dysfonctionnement, ni anomalies au niveau du réseau de distribution d'eau qui a été mis hors de cause. La contamination provenait de la nourriture distribuée lors de ces fêtes, en effet deux personnes infectées par l'hépatite A avaient participé à la préparation des repas.

2. Un arsenal thérapeutique limité

Les infections dues à des virus entériques sont pour la plupart connues depuis longtemps. Cependant, très peu d'entre elles bénéficient, à l'heure actuelle, d'une vaccination préventive et il n'existe pas de traitements curatifs spécifiques. Les traitements restent bien souvent symptomatiques.

2.1. La vaccination

Des vaccins sont actuellement disponibles pour certains génogroupes de rotavirus, le VHA et le poliovirus.

- **Vaccins contre le rotavirus**

Les infections à rotavirus touchent principalement les enfants et se produisent en hiver. Contre ces virus, un premier vaccin (RotaShield®) avait été commercialisé aux USA en 1998, mais il avait été rapidement retiré du marché après la constatation d'une augmentation du nombre d'invaginations intestinales aiguës. En prévention des infections à rotavirus, deux vaccins oraux sont disponibles en France depuis 2006, RotaRix® (GlaxoSmithKline) et Rotareq® (Sanofi Pasteur, MSD). Les deux vaccins sont remboursés pour les nouveau-nés de moins de 6 mois.

- Le RotaRix® est un vaccin vivant affaibli monovalent dérivé de la souche humaine la plus fréquente G1P[8] (ou sérotype G1P1A). Mais une protection croisée procure également une protection contre des souches en circulation à travers le monde. En effet, l'efficacité a été démontrée dans les essais cliniques, contre les gastro-entérites à rotavirus des génotypes les plus courants G1P [8], G2P [4], G3P [8], G4P [8] et G9P [8]. L'efficacité contre des génotypes peu fréquents de rotavirus G8P [4] (gastro-entérites sévères) et G12P [6] (autres gastro-entérites) a également été démontrée. Le vaccin se présente sous la forme d'une poudre lyophilisée qui doit être mélangée au solvant. Le schéma de vaccination comporte l'administration orale de deux doses. La première dose peut être administrée à partir de l'âge de six semaines. L'intervalle entre les doses doit être au moins de quatre semaines. Le schéma de vaccination doit préférentiellement être administré avant l'âge de 16 semaines minimum, et doit être terminé avant l'âge de 24 semaines.

- Le Rotareq® est composé de virus bovins vivants, exprimant les protéines de surface de rotavirus humains, notamment les 4 types du génogroupe G les plus fréquents (GP1 à GP4) et le type P le plus fréquent P1A[8]. Le schéma vaccinal se fait par l'administration de trois doses par voie orale. La première dose peut être administrée à partir de 6 semaines et jusqu'à 12 semaines. Les trois doses doivent de préférence être toutes administrées avant l'âge de 20 à 22 semaines et au plus tard avant 26 semaines, avec un minimum de 4 semaines entre chaque dose.

L'administration de ces vaccins a entraîné une chute drastique du nombre de cas de gastro-entérites à rotavirus que ce soit dans la communauté ou à l'hôpital. En effet, une diminution

d'environ 60% du nombre d'hospitalisations dues au rotavirus a été observée dans un hôpital pédiatrique américain en 2007-2008 par rapport aux hivers 2003 à 2006, le vaccin anti-rotavirus ayant été commercialisé en 2006. Aucune diminution notable des hospitalisations dues aux VRS et/ou aux virus de la grippe n'ayant été observée sur cette période, la diminution semblait être corrélée à l'apparition de la vaccination plutôt qu'à un meilleur suivi des règles d'hygiène (Anderson *et al.*, 2011).

- **Vaccins contre l'hépatite A**

Il n'existe pas de traitement curatif spécifique de l'hépatite A. Une transplantation hépatique en urgence peut être nécessaire en cas de forme fulminante. En revanche il existe un vaccin efficace qui est recommandé pour les personnes professionnellement exposées telles que les médecins, le personnel de soins, les éboueurs, les personnels de service d'entretien des réseaux d'eau usées, les plombiers... La vaccination contre l'hépatite A est également conseillée aux voyageurs se rendant dans une zone endémique et aux employés dans le domaine de la restauration et du secteur alimentaire.

Les vaccins Havrix 720 U[®] destinés aux enfants de plus de un an et Havrix 1440 U[®] pour les adultes (GlaxoSmithKline) ainsi que Avaxim 160 U[®] (Sanofi pasteur MSD) pour les personnes de plus de 16 ans, sont des vaccins inactivés adsorbés préparés à partir de la souche HM 175 (virus sabin) du virus de l'hépatite A. Ils sont administrés par injection d'une dose en intramusculaire suivi d'un rappel six à douze mois après la première injection, puis d'une injection de rappel tous les 10 ans.

- **Vaccins contre le poliovirus**

Avant la mise en place de la vaccination, la poliomyélite était l'un des plus terribles fléaux de l'enfance touchant plus de 600 000 enfants dans le monde par an (Institut Pasteur). L'incidence de la maladie a diminuée de 99% depuis 1988 grâce à la campagne de vaccination « L'initiative Mondiale pour l'Eradication de la Poliomyélite » lancée par l'OMS. Depuis la maladie n'est plus considérée comme endémique que dans quatre pays : Nigéria, Inde, Afghanistan et Pakistan. Son « élimination certifiée » a été obtenue dans la région OMS des Amériques depuis 2000 et dans la région pacifique ouest, en Chine et en Europe depuis 2002.

Il existe à l'heure actuelle deux types de vaccins contre la poliomyélite :

- Le Vaccin Poliomyélitique Inactivé Injectable (VPI) Imovax polio[®] (Sanofi Pasteur MSD), contient les 3 sérotypes du virus sous forme inactivée. Le vaccin est conseillé à partir de l'âge de deux mois et il est obligatoire avant l'âge de 18 mois. Il consiste en trois injections intramusculaires ou sous-cutanées espacées d'un mois, suivies d'un rappel un à deux ans après la troisième injection, puis tous les cinq ans jusqu'à l'âge adulte et enfin tous les dix ans chez l'adulte. La vaccination contre la poliomyélite existe également sous forme de vaccin plurivalent, le DT-Polio[®] ou Revaxis[®] (tétanos, poliomyélite, diphtérie), l'Infanrix Tetra[®] ou Tetravac[®] (tétanos, poliomyélite, diphtérie, coqueluche), l'Infanrix Quinta[®] ou Pentavac[®] (tétanos, poliomyélite, diphtérie, coqueluche, *Haemophilus* de type B) et enfin l'Infanrix Hexa[®], vaccin hexavalent, qui protège contre le tétanos, la diphtérie, la poliomyélite, la coqueluche, l'*Haemophilus* de type b et l'hépatite B.

- Le Vaccin Poliomyélitique Oral (VPO) n'est plus commercialisé en France depuis 1999 mais reste largement utilisé dans les pays en voie de développement. Ce vaccin contient les trois sérotypes de virus vivants, atténués par mutations. Ce vaccin possède de multiples avantages ce qui explique qu'il ait été jusqu'à maintenant l'outil privilégié du programme d'éradication : il est facile à utiliser car il ne nécessite pas d'injection, il confère rapidement une bonne immunité générale et une immunité locale au niveau de l'intestin, réduisant par conséquent la transmission du poliovirus sauvage. Ce vaccin est, de plus, d'un coût très abordable. Ses principaux inconvénients sont sa mauvaise conservation aux températures ambiantes et l'existence de cas extrêmement rares de « poliomyélite paralytique associée au vaccin » apparaissant quelques jours après la vaccination chez les sujets vaccinés ou leurs proches non vaccinés.

2.2. Prise en charge thérapeutique des gastro-entérites virales

La gastro-entérite infectieuse est définie comme une inflammation des muqueuses gastriques et intestinales causée par des agents pathogènes et résultant en une diarrhée aiguë, c'est-à-dire l'apparition soudaine d'au moins trois selles liquides par 24 heures. Cette diarrhée peut être associée ou non à des vomissements, des nausées, une perte d'appétit et de la fièvre. La gastro-entérite est le plus souvent une maladie spontanément résolutive et plus de 90% des patients ne présentent plus de symptômes après 10 jours. La déshydratation est la

complication majeure potentiellement mortelle de la gastro-entérite et les nourrissons ainsi que les personnes âgées font partie des personnes à risque. Il est conseillé d'adopter un régime alimentaire adapté comprenant notamment des boissons sucrées abondantes ainsi qu'une alimentation salée. Le traitement préventif repose sur les mesures d'hygiène visant à limiter la transmission (lavage des mains, ne pas échanger les couverts...). Le principal traitement de la gastro-entérite vise à prévenir la déshydratation. Les autres traitements visent essentiellement à améliorer le confort du patient.

- **Sels de réhydratation orale (SRO) et parentérale**

Dans les cas de déshydratation très sévère, l'administration d'un soluté de réhydratation par voie intraveineuse est effectuée en milieu hospitalier. Au cours du siècle dernier, la découverte du transport couplé de sodium et de glucose par la muqueuse de l'intestin grêle a entraîné l'élaboration de sels de réhydratation orale, apportant sel et hydrates de carbone dans une proportion déterminée (Fontaine *et al.*, 2007). L'utilisation de sels de réhydratation orale est conseillée chez les patients présentant des signes de déshydratation modérée et chez les patients avec des risques élevés de développer une déshydratation.

- **Thérapie médicamenteuse adjuvante**

- Lors des infections virales les antibiotiques sont inutiles. Leur utilisation pourrait même prolonger les symptômes en perturbant l'équilibre de la flore intestinale.

- Les antiseptiques intestinaux (nifuroxazide, colistine) n'ont pas montré d'effet bénéfique sur l'évolution de la diarrhée.

- Les ralentisseurs du transit intestinal (diphénoxylate, lopéramide) et anti-sécrétoires intestinaux (racécadotril) peuvent également être utilisés. Le racécadotril est un inhibiteur de l'enképhalinase qui freine la dissolution d'opioïdes endogènes son administration diminuerait la durée de la diarrhée aiguë chez les adultes. Le lopéramide freine le tractus gastro-intestinal et réduirait la durée de la diarrhée chez les adultes, il présente cependant pour inconvénient de provoquer une constipation. Il est utilisé comme médication de confort chez les adultes mais est déconseillé chez les enfants ainsi que chez les personnes de plus de 75 ans ou en cas de diarrhées sanguinolentes avec fièvre.

- Les adsorbants (smecta, kaolin, pectine, charbon actif) ne sont pas conseillés pour le manque d'évidence sur leur efficacité ou l'effet très limité sans pertinence clinique.

- Les probiotiques, flores levuriques et bactériennes (lactéol[®], ultra-levure[®], bacilor[®]), pourraient avoir un effet lorsqu'ils sont utilisés dès les phases précoces de la diarrhée. Ils auraient la propriété de diminuer la durée de la diarrhée, cependant l'usage systématique de probiotiques lors de gastro-entérites aiguës n'est pas conseillé.

- Les antiémétiques (dompéridone, metoclopramide, métopimazine, alizapride) peuvent être utilisés en cas de nausées et de vomissements.

TROISIEME PARTIE :

Devenir des virus dans un réseau d'eau

1. La notion de biofilm

Les réseaux de distribution d'eau sont continuellement exposés à un flux de matière, dont des microorganismes naturellement présents dans l'eau et ne présentant aucun danger pour la santé humaine. Cependant des incidents au niveau des stations de traitements des eaux ou survenant sur les réseaux peuvent être à l'origine de microorganismes indésirables dans l'eau et ceci malgré la présence d'une concentration résiduelle en biocide circulant.

La plus forte densité de microorganismes se rencontre à la surface des matériaux constituant les réseaux de distribution d'eau. La résistance et la prolifération des bactéries dans ce milieu sont dues à leur organisation en biofilm, correspondant à des associations de microorganismes inclus dans une matrice d'exopolymères contenant également des débris particulaires et des produits de corrosion à la surface des différents matériaux. Des champignons, algues et protozoaires sont également retrouvés dans les biofilms.

1.1. Formation d'un biofilm

La prolifération bactérienne sous forme de biomasse fixée sur les réseaux de distribution d'eau potable est le résultat d'un ensemble de processus physique, chimique et biologique qui se produit en plusieurs étapes faisant intervenir différents processus :

- Adsorption de biomolécules qui vont très rapidement modifier la surface et formation d'un film conditionnant par dépôt de protéines, lipides, minéraux... Ce film est potentiellement favorable à l'adsorption des microorganismes circulant dans l'eau.
- Dépôt des microorganismes, qui peut se produire par sédimentation, mouvement brownien, résulter de turbulences dans le flux de l'eau ou tout simplement par mobilité des microorganismes éventuellement couplée avec des phénomènes de chimiotactismes.
- Attachement des microorganismes à la surface des conduites du réseau, qui peut être divisé en deux étapes principales : l'adhérence puis l'adhésion. L'adhérence correspond à une adsorption réversible des cellules, par le biais d'interactions électrostatiques, hydrophobes et d'interactions de Van Der Waals. Cette étape est souvent aspécifique et de courte durée (5 à

10 heures) (Gauthier et Isoard, 1989). L'étape d'adhérence est suivie de l'étape d'adhésion qui est la fixation irréversible des bactéries. Elle fait appel au métabolisme bactérien par sécrétion d'exopolymères qui consolident leur attachement au support.

- Colonisation du support par multiplication des bactéries, formation de colonies et structuration d'une matrice d'exopolymères.

- Maturation du biofilm jusqu'à atteindre un équilibre entre d'une part le taux d'accumulation et de croissance du biofilm et d'autre part le taux de détachement de matière par relargage de portions superficielles dans l'eau circulante. Deux phénomènes de régulation de l'épaisseur du biofilm sont observés, des phénomènes d'érosion (pertes localisées à la surface du biofilm) et des phénomènes de dépouillement, correspondant à des pertes de portions entières de biofilm.

1.2. Structuration d'un biofilm d'eau potable

La densité bactérienne fréquemment retrouvée « à l'équilibre » sur les parois est généralement comprise entre 10^6 et 10^7 cellules /cm² dont 6 à 9% sont cultivables sur gélose après 15 jours, ceci pour une biomasse bactérienne circulant dans l'eau comprise entre 10^3 et 10^6 cellules/mL (Block *et al.*, 1993 ; Servais *et al.*, 1995 ; Sibille *et al.*, 1997). La structure des biofilms présents dans les réseaux de distribution d'eau potable présente encore de nombreuses incertitudes, en partie en raison de leur inaccessibilité sans endommager le réseau. Les principales informations connues sont obtenues à partir de biofilms générés en laboratoire à l'aide de pilotes d'étude également appelés réacteurs. Ces informations sont ensuite extrapolées à des biofilms *in situ* (Block et Appenzeller, 2001). Le biofilm des réseaux de distribution apparaît globalement comme une structure hétérogène et discontinue, composée d'agrégats dispersés à la surface du matériau. Le biofilm est composé d'une biomasse stratifiée qui doit être appréhendée comme une structure à trois dimensions. Les agrégats sont entourés de canaux qui peuvent occuper jusqu'à 50% du volume total du biofilm et qui permettent la circulation d'eau, de nutriments, de particules et éventuellement de microorganismes. L'activité des microorganismes composant le biofilm varie en fonction de leur localisation dans le biofilm. En effet, lorsque le biofilm présente une faible épaisseur (< 40µm) le transfert d'oxygène et de nutriments ne serait pas limité. Par contre, lorsque le biofilm est plus épais (> 80µm) l'activité respiratoire est plus faible au niveau des couches

profondes. Par contre, les bactéries présentes dans les couches profondes sont protégées de la présence de biocides résiduels circulant dans l'eau.

La présence d'un biofilm bactérien au sein des réseaux de distribution d'eau potable peut-être à l'origine de non-conformité lors du décrochage de la biomasse fixée et peut également constituer un environnement protecteur pour des microorganismes potentiellement pathogènes.

2. Les phages en tant que modèles d'étude des virus entériques pathogènes

Depuis le développement des méthodes de coloration négative en 1959, 5568 phages ont été répertoriés et observés par microscopie électronique (Ackermann, 2007). Selon l'ICTV (Comité International sur la Taxonomie des Virus), un seul ordre est reconnu pour les bactériophages : les *Caudovirales* ou phages à queue. Cet ordre regroupe trois familles, *Myoviridae*, *Podoviridae* et *Siphoviridae* représentant respectivement 24 %, 14 % et 59 % des phages.

Les autres phages sont regroupés sous l'appellation PFP en raison de leur morphologie (Polyèdre, Filamenteux, Pléomorphe). Ils sont au nombre de 208 et représentent moins de 4 % des phages identifiés. Ils ne font pas partie de l'ordre des *Caudovirales* et sont dispersés dans 17 familles et 20 genres différents (banque de données de l'ICTV) (Ackermann, 2007).

Tous les bactériophages dits fécaux - dont la bactérie hôte colonise le tractus intestinal de l'homme - sont susceptibles d'être retrouvés dans les matières fécales humaines. Ils se multiplient aux dépens de bactéries du tractus digestif, sont excrétés en très grande quantité dans les matières fécales puis disséminés dans l'environnement comme les virus entériques pathogènes. Actuellement, environ 1000 phages d'entérobactéries ont été répertoriés (906 phages à queue et 76 phages PFP). Trois catégories de bactériophages ont été proposées en tant qu'indicateurs de pollution fécale d'origine virale dans le milieu hydrique : les coliphages somatiques, les bactériophages ARN-F spécifiques et les phages de *Bacteroides fragilis* (Kott *et al.*, 1974; Dutka *et al.*, 1987; Tartera et Jofre 1987; Tartera *et al.*, 1988; Cornax *et al.*, 1991; IAWPRC, 1991).

Les coliphages somatiques forment un groupe très hétérogène de phages à ADN appartenant à quatre familles différentes à savoir les *Myoviridae*, les *Siphoviridae*, les *Podoviridae* et les

Microviridae. Ils infectent *Escherichia coli* par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques localisés au niveau de la membrane bactérienne.

Les phages de *Bacteroides fragilis* constituent, à l'inverse des coliphages somatiques, un groupe plus homogène puisque qu'ils appartiennent tous à la famille des *Siphoviridae*. L'infection de la bactérie hôte, *Bacteroides fragilis*, s'effectue de la même manière que pour les coliphages somatiques, c'est-à-dire à partir d'un récepteur situé au niveau de la membrane bactérienne. *Bacteroides fragilis* est une bactérie qui fait partie de la flore anaérobie dominante du tractus intestinal de l'homme et des animaux.

Les bactériophages ARN-F spécifiques et ADN-F spécifiques regroupent quant à eux des phages appartenant respectivement à la famille des *Leviviridae* et des *Inoviridae*. Ces phages infectent spécifiquement les bactéries possédant des pili sexuels ou F-pili dont *E. coli*. MS2, GA, Q β et SP sont des bactériophages ARN F-spécifiques appartenant respectivement aux génogroupes I, II, III et IV ils sont fréquemment utilisés en virologie du milieu hydrique.

2.1. Structure des bactériophages ARN-F spécifiques

Les bactériophages ARN F-spécifiques mesurent de 20 à 30 nm de diamètre et font partie des plus petits virus connus (**Figure 3**). Ces phages appartiennent à la famille des *Leviviridae* qui contient deux genres : les *Levivirus* (exemple des phages MS2 et GA) et les *Allolevivirus* (exemple des phages Q β et SP). Ils ne possèdent pas d'enveloppe et sont constitués d'une capsidie icosaédrique de nature uniquement protéique à l'intérieur de laquelle se trouve le génome à ARN monocaténaire de polarité positive qui est le support de l'information génétique et dont la taille varie de 3466 à 4276 bases en fonction du genre (**Figure 4**).

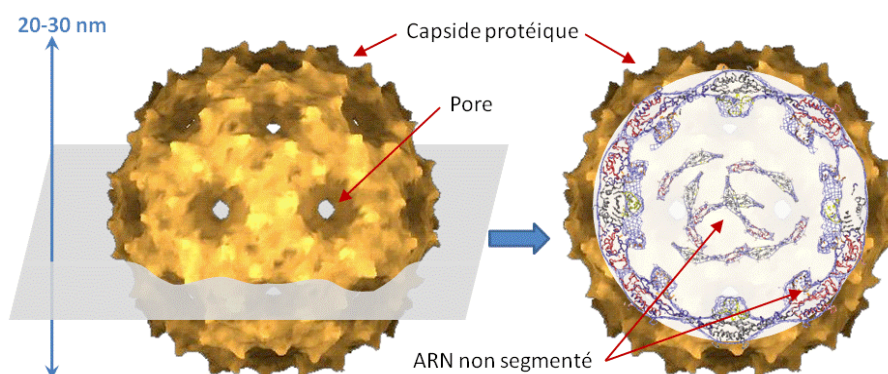


Figure 3. Schéma d'un bactériophage ARN F-spécifique (Référence PDB using VIPERdB, the Virus Particle ExploreR 2ms2) (Extrait de Langlet, 2008).

Le génome de ces bactériophages comporte quatre gènes dont trois sont communs à la famille de *Leviviridae* alors que le dernier est dépendant du genre auquel appartient le phage (**Figure 4**).

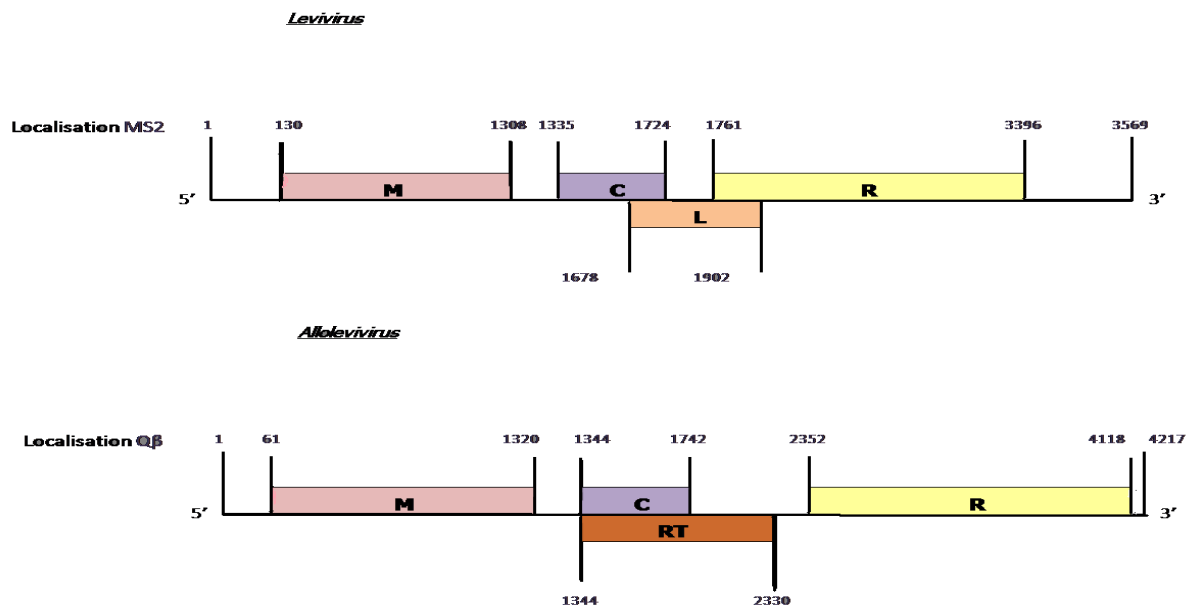


Figure 4. Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2 et Qβ appartenant au genre *Levivirus* et *Allolevivirus* respectivement (Inokuchi *et al.*, 1986; Inokuchi *et al.*, 1988; Priano *et al.*, 1995; Bollback et Huelsenbeck, 2001).

M : gène de la protéine de maturation, C : gène de la protéine de capsid, R : gène de la réplicase, L : gène de la protéine de lyse, RT : gène de la protéine « readthrough ».

Les gènes communs sont représentés au-dessus du génome et le gène différent en-dessous. Les séquences sont issues de la base de données Genbank avec les références suivantes : MS2 (NC_001417) et Qβ (AY099114) (extrait de Ogorzaly, 2009).

Les gènes communs aux deux genres *Levivirus* et *Allolevivirus* sont ceux codant :

- La protéine de maturation (ou protéine A) qui est indispensable à l'interaction entre le phage et le récepteur cellulaire.
- La protéine constitutive de la capsid.
- La réplicase, qui est une ARN polymérase ARN dépendante, nécessaire à la réplication du génome viral dans la cellule bactérienne.

Le dernier gène est, soit une protéine de lyse impliquée dans la lyse bactérienne pour le genre *Levivirus*, soit une protéine « readthrough » pour les *Allolevivirus*. Dans ce dernier cas, la lyse

de la cellule est assurée par la protéine de maturation et la protéine « readthrough » intervient au niveau de l'infectivité des bactériophages (Klovins *et al.*, 2002).

Les deux genres se différencient aussi par la taille du génome, celui des *Allolevivirus* étant plus grand que celui des *Levivirus*. Ceci est principalement dû à une taille plus importante des intercistrons et du gène codant pour la protéine de maturation (Klovins *et al.*, 2002). Pour tous ces bactériophages une partie du génome est en contact avec la face interne de la capside protéique (**Figure 3**).

La capside est une « coque » de nature uniquement protéique qui entoure et protège l'acide nucléique viral. Pour les virus nus, elle intervient également dans l'attachement du virus à la cellule hôte. Elle est constituée de l'assemblage d'unités structurales protéiques qui se répètent et sont regroupées en unités morphologiques : les capsomères. La protéine de capside, constituée de 130 acides aminés pour les *Levivirus* et 132 pour les *Allolevivirus*, présente trois conformations différentes A, B et C. L'assemblage des conformations A, B et C forme un capsomère. 60 capsomères s'associent entre eux pour former un icosaèdre. Chaque particule virale possède ainsi 180 copies de la protéine de capside.

Une copie de la protéine de maturation est également présente, en plus des 180 copies de la protéine de capside, au niveau de la capside. Les protéines de capside et la protéine de maturation présentent de nombreuses régions hydrophobes, hydrophiles et chargées, qui ont une influence sur les propriétés de surface des virus.

2.2. Les phages en tant que modèles d'étude des virus entériques pathogènes

Les bactériophages dont la structure s'approche le plus des virus entériques pathogènes sont les bactériophages ARN-F spécifiques. En effet, les phages de la famille des *Leviviridae* ont une capside polyédrique et un génome à ARN simple brin, et présentent une structure et une taille similaire à celles des virus entériques pathogènes. Ils sont d'ailleurs souvent utilisés comme modèles d'étude du devenir des virus dans le milieu hydrique (Bales *et al.*, 1993). De plus, de par leur incapacité à se reproduire dans l'environnement, ils sont considérés comme des particules inertes. Ce sont des virus relativement résistants dans l'environnement hydrique du fait qu'ils sont non enveloppés comme les virus entériques pathogènes. La présence des phages ARN F-spécifiques peut être associée à une pollution virale d'origine fécale et permet de discriminer l'origine animale ou humaine de cette pollution (Ogorzaly *et al.*, 2009).

A notre connaissance, aucune étude ne décrit les propriétés de surface des virus entériques pathogènes, à part quelques informations, sur leur point isoélectrique, très variables en fonction de la méthode d'étude (Michen et Graule, 2010).

Par contre, une étude a permis de caractériser les propriétés de surfaces de quatre phages ARN F-spécifiques en termes de charge de surface et d'hydrophobicité (Langlet *et al.*, 2008). Les phages MS2, GA, Q β et SP présenteraient une charge de surface négative et relativement similaire à pH 7 dans du NaNO₃. La séquence d'hydrophobicité serait de type MS2<Q β <GA<SP, MS2 étant le phage le moins hydrophobe. De plus, des méthodes de détection rapides, faciles à mettre en œuvre, peu coûteuses, efficaces et spécifiques existent pour détecter et quantifier les phages ARN F-spécifiques infectieux ou leur génome (Ogorzaly et Gantzer, 2006).

C'est dans ce contexte que les bactériophages ARN F-spécifiques sont couramment utilisés comme indicateurs viraux pour l'étude des virus entériques pathogènes dans l'environnement, (Yates *et al.*, 1985; Yahya *et al.*, 1993; Nasser et Oman, 1999; Ballester *et al.*, 2005) et comme modèles pour l'étude du transport des virus entériques pathogènes dans les sols et les aquifères (DeBorde *et al.*, 1999; Schijven et Simunek, 2002; Collins *et al.*, 2006).

3. Etat des connaissances sur le devenir des virus transmissibles par voie hydrique au sein d'un système de distribution d'eau

3.1. Adsorption des virus sur les biofilms

Comme vu dans le premier paragraphe, les réseaux de distribution d'eau sont très rapidement colonisés, après leur mise en service, par une biomasse complexe appelée biofilm. L'introduction accidentelle et le devenir de particules colloïdales inertes telles que les virus entériques pathogènes au sein d'un tel système restent très peu étudiés. Dans les conditions environnementales, la probabilité de multiplication de ces virus au sein du réseau de distribution et des biofilms peut être considérée comme nulle. Ainsi, seules les questions d'adhésion/relargage et de survie de la particule virale au sein du biofilm seront étudiées. Les propriétés de surface des matériaux jouent un rôle clé dans l'adhésion des virus. Toutefois, lorsqu'un biofilm se forme sur un matériau, il constitue de nouveaux sites de sorption dont les propriétés sont différentes du matériau initial (Paris *et al.*, 2009). Les biofilms sont des structures complexes et différentes en fonction du type d'eau à partir de laquelle ils se sont

formés (eaux usées, eaux de distribution, eaux de mer...), de leur âge, et de la nature de la surface colonisée (fonte, plastique, ciment...) pour ne citer que quelques exemples évidents. Ces différences de conditions expérimentales engendrent une grande variabilité des biofilms d'une étude à l'autre. A l'heure actuelle, très peu d'études ont été consacrées à l'interaction des virus avec les biofilms.

3.1.1. Détection des virus au sein des biofilms

Avant d'analyser plus en détails les publications traitant de l'interaction des virus avec un biofilm, il est important d'évoquer un élément purement méthodologique. En effet, pour déterminer la concentration virale d'un biofilm la première étape consiste à éluer ou extraire les virus de ce biofilm. Toutefois, les protocoles et par voie de conséquence les rendements obtenus sont différents pour chaque étude mais aussi très variables en fonction du virus ciblé. Par exemple, Quignon *et al.* (1997) estiment qu'ils récupèrent, dans un biofilm de 30 jours formé à partir d'eau de distribution, 18 % du poliovirus 1 souche vaccinale. Storey et Ashbolt (2001) ont estimé l'efficacité de récupération du phage MS2, dans un biofilm de 70 jours formé à partir d'eau de distribution, à 83 %. Hock et Botzenhart (2002) ont quant à eux étudié l'impact de différents tampons d'élution sur le rendement de récupération des virus dans les biofilms. Les taux de récupération obtenus varient de 5 à 60 %. Ainsi, les rendements de récupération sont très variables et parfois faibles. Ceci est lié à la nécessité de récupérer les virus sous leur forme infectieuse pour les détecter en utilisant une méthode de culture. Une alternative méthodologique basée sur la détection du génome viral permet d'obtenir des rendements plus importants et plus reproductibles car l'extraction des acides nucléiques permet de lyser totalement la matrice (Helmi *et al.*, 2008).

3.1.2. Analyse virologique de biofilms environnementaux prélevés *in situ*

La concentration en virus de la phase aqueuse impacte celle du biofilm selon un coefficient de partage indéterminé. Les données obtenues sur des biofilms prélevés *in situ* illustrent bien cet aspect. Le cas le plus simple concerne les eaux usées car leurs concentrations en virus sont relativement élevées. Skrabber *et al.* (2007 et 2009) ont déterminé la concentration en virus d'une eau usée et du biofilm correspondant. Pour cela un réacteur équipé de coupons en polyéthylène ou en PVC a été placé à l'entrée de stations de traitement des eaux usées sur des périodes allant de un mois à plus de 24 mois. Les auteurs ont ensuite recherché le génome de

norovirus, d'entérovirus et de bactériophages ARN F-spécifiques dans les biofilms et les eaux usées correspondantes. La concentration virale de l'eau a été déterminée uniquement de façon ponctuelle, le jour du prélèvement du biofilm. La détection de génome viral dans le biofilm devrait traduire la présence de ces virus dans la phase eau tout au long de sa formation. Les résultats montrent que tous les virus retrouvés dans l'eau ont également été mis en évidence au niveau du biofilm, soulignant bien le transfert possible des particules virales en suspension dans l'eau vers la surface.

La détection de virus est plus rarement décrite pour des biofilms prélevés *in situ*. Ainsi, Skrabber *et al.* (2005) reportent les données d'une étude réalisée par Vanden Bossche (1994) au cours de laquelle des entérovirus infectieux auraient été détectés par culture cellulaire dans la totalité des échantillons ($n = 4$) provenant d'une station de potabilisation. Cet auteur aurait mis en évidence la présence d'échovirus et de coxsackievirus B infectieux dans 10 g de biofilms prélevés sur des filtres à sable et à charbon actif, ainsi que sur une conduite de sortie de l'usine de traitement. Hock et Botzenhart (2002) ont analysé par RT-PCR des biofilms prélevés sur des conduites d'eau potable âgées de 1 à 100 ans composées de PVC, acier ou fonte. Aucun échantillon n'a été positif pour la recherche de génome d'entérovirus ($n = 18$), de rotavirus ($n = 7$) et de norovirus ($n = 5$). Enfin, lors de l'analyse d'échantillons obtenus après nettoyage par un jet d'eau et d'air sous pression d'une conduite d'eau potable âgée de 40 ans, Lehtola *et al.* (2004) ne détectent pas de génome de norovirus par RT-PCR.

Quelques études ont été réalisées sur des réacteurs connectés à des réseaux de distribution. Ainsi, Hock et Botzenhart (2002) ont placé des réacteurs à la sortie de trois stations de potabilisation pendant six semaines à 24 mois. Ces réacteurs étaient équipés de coupons en polyéthylène, PVC, inox ou cuivre ($n = 92$). La présence de génome d'entérovirus, de rotavirus et de norovirus ainsi que la présence d'entérovirus, de coliphages somatiques et de phages ARN F-spécifiques infectieux a été recherchée sur ces coupons. Un seul coupon s'est avéré positif concernant la présence de coliphages somatiques. De même, Lehtola *et al.* (2004) ont alimenté deux boucles d'une longueur de 100 m constituées de cuivre ou d'un matériau composite polyéthylène-aluminium-polyéthylène, avec de l'eau d'un réseau de distribution pendant 308 jours. Ils ont ensuite décroché le biofilm par un traitement physique (agitation en présence de billes de verre) et filtré la suspension à travers une membrane de porosité 0,2 μm . Après marquage au SYBR Green I, les auteurs ont observés des particules fluorescentes dans le filtrat. Ils ont conclu à la présence de «virus like particles» dans ces

biofilms d'eau potable. Cependant, les auteurs n'ont vérifié cette hypothèse par aucune des techniques spécifiques aux virus (RT-PCR, culture cellulaire...).

3.1.3. Analyse virologique de biofilms formés en laboratoire à l'aide de réacteurs

Ces études réalisées *in situ* démontrent certes un transfert des virus de la phase eau vers la phase biofilm, mais ne permettent pas d'estimer des pourcentages d'adhésion des virus sur ces supports complexes et encore moins de définir des cinétiques d'adhésion. Pour avoir accès à ces paramètres, il est nécessaire de travailler avec des pilotes dans lesquels sont introduites des concentrations virales maîtrisées. Même si, évidemment, les caractéristiques du biofilm dépendront du pilote utilisé (conditions hydrodynamiques, nature des supports, surface colonisable...) et de la durée (semaines, mois...) choisie pour sa formation. Un état des lieux des connaissances obtenues à l'aide d'expérimentations réalisées sur des pilotes est présenté dans le **tableau 5**.

Pour une souche vaccinale de poliovirus 1, Quignon *et al.* (1997) ont observé des concentrations comprises entre 0 et 52 NPPUC/cm², après un temps de contact de six minutes, sur un support en PVC colonisé par un biofilm de un mois. Ces auteurs ont ensuite estimé, à l'aide d'un modèle de calcul, que le taux d'adhésion variait de 2,2 à 81,1 %. Storey et Ashbolt (2003) ont inoculé les phages ΦX174, MS2 et B40-8, à des concentrations de 10⁹ UFP/mL. Après un temps de contact de 24 heures, les auteurs ont conclu que ces trois virus présentaient des taux d'adhésion relativement similaires correspondent à 1 % de la concentration initialement inoculée dans le milieu. Enfin, une étude concernant le phage 28B de *Salmonella typhimurium*, indique que pour un apport de 10⁹ à 10¹¹ UFP/mL dans une eau en contact avec un biofilm de huit semaines, moins de 0,001 % du phage 28B (4 à 21 UFP/cm²) est retrouvé dans le biofilm (Langmark *et al.*, 2005).

Tableau 5. Conditions expérimentales des études traitant de l'adhésion de virus sur des biofilms constitués en réacteurs (adapté de Skrabber *et al.*, 2005). UFP : Unité Formant Plage; NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes ; C : conductivité ; uPVC : unplasticized PVC ; PV-1 : Poliovirus 1 ; B40-8 :phage de *Bacteroides fragilis* ; 28B : phage de *Salmonella typhimurium*.

Virus	Concentrations inoculées log NPPUC ou UFP.mL ⁻¹	Concentration dans les biofilms log MPNCU ou UFP .cm ⁻²	Pourcentages	Coupons	Eau	Biofilm âge / surface	Temps de contact Heures	Débit d'eau L.h-1	Type de réacteur	Références
PV-1	3.10 ³ à 9.10 ³ NPPUC/mL	0 à 52 NPPUC/cm ²	2,2 à 81,8 %	PVC	Chlore libre <0,04 mg.L ⁻¹ C = 0,6 mS.cm ⁻¹	30 jours/1 cm ²	0,1	500	Longueur = 90 m Volume = 50 L Surface = 75000 cm ²	Quignon <i>et al.</i> , (1997 a, b)
MS2 B40-8	1.10 ⁸ UFP/mL	> 10 ⁷ UFP/µg de protéines /cm ² > 10 ⁴ UFP/µg de protéines /cm ²		PVC inox	pH = 8,7 (± 0,14) chlore libre = 0,56 (± 0,12)mg.L ⁻¹	70 jours/6 cm ²	24	1152	Modified Robbins' device (MRDs)	Storey et Ashbolt (2001)
PV-1 ΦX174 MS2	1,3.10 ⁶ ; 5,0.10 ⁶ ; 7,2.10 ⁴ NPPUC/mL 1,2.10 ⁶ UFP/mL 1,6.10 ⁶ UFP/mL	35; 27; 367 NPPUC/cm ² 16 UFP/cm ² 6 UFP/cm ²		verre	Eau de distribution	2 à 9 semaines	60	3	100 mL	Hock et Botzenhart (2002)
ΦX174 MS2 B40-8	1.10 ⁸ à 1.10 ¹⁰ UFP/mL	1.10 ⁷ UFP/cm ² 1.10 ⁸ UFP/cm ² 1.10 ⁸ UFP/cm ²	approximativement 1% pour les phages	verre inox PVC	Eau de distribution	90 jours/6 cm ²	24	360	Modified Robbins' device (MRDs) puis Biofilm Reactor	Storey et Ashbolt (2003 a, b)
sphères latex 20 nm		< limite de détection								
billes hydrophobes billes hydrophiles (1µm) 28B	1.10 ⁹ à 1.10 ¹¹ billes ou UFP/mL	32 ± 8 à 411 ± 311 billes/cm ² 110 ± 37 à 2860 ± 1580 billes /cm ² 4 ± 6 à 7 ± 2 UFP/cm ²	0,1 à 0,2% 0,3 à 1,1% < 0,001 %	verre	Eau de distribution traitée par chloration chlore libre 0,05 à 0,26 mg.L ⁻¹	8 semaines	24		conduite de 1 km	Langmark <i>et al.</i> (2005)
billes hydrophobes billes hydrophiles (1µm) 28B	1.10 ⁹ à 1.10 ¹¹ billes ou UFP/mL	91 ± 66 à 151 ± 31 billes/cm ² 172 ± 113 à 713 ± 108 billes /cm ² 6 ± 2 à 21 ± 13 UFP/cm ²	0,2 à 0,3 % 0,5 à 0,6 % < 0,001 %	verre	Eau de distribution traitée par Ultra violets chlore libre 0,05 à 0,26 mg.L ⁻¹	8 semaines	24		conduite de 1 km	Langmark <i>et al.</i> (2005)
PV-1 ΦX174 MS2	2,04 log NPPUC 2,58 log UFP/mL 3,11 log UFP/mL	1,49 ± 0,16 log NPPUC/cm ² 1,81 ± 0,02 log UFP/cm ² 2,04 ± 0,15 log UFP/cm ²		Polycarbonate	C = 385 µS.cm ⁻¹ pH=7,67 température = 15 °C Chlore libre <0,02 mg.L ⁻¹	218 jours/18,75 cm ²	1 24 48	6	Rotating annular reactor Volume = 1 L	Helmi <i>et al.</i> (2008)
PV-1	3,57 log UFP/mL	2,65 ± 0,21 log NPPUC/cm ²		Polycarbonate	Usée traitée biologiquement Température 4 °C	14 jours/18,75 cm ²	1	6	Rotating annular reactor Volume = 1 L	Helmi <i>et al.</i> (2008)

Hock et Botzenhart (2002) ont injecté des phages MS2, Φ X174 (coliphage somatique), ainsi qu'une souche vaccinale de poliovirus 1 à des concentrations de l'ordre de 10^4 UFP/mL dans un pilote équipé de coupons en verre. Après un temps de contact d'une heure, 35, 16 et 6 UFP/cm² de poliovirus, de phages Φ X174 et de phage MS2 sont retrouvés au niveau du biofilm, le phage MS2 apparaît donc comme le virus le moins adhérent. Helmi *et al.* (2008) ont utilisé un réacteur annulaire rotatif pour créer un biofilm et ont inoculé la souche vaccinale du poliovirus 1, ainsi que les phages Φ X174 et MS2 à des concentrations similaires de 2 à 3,1 log UFP/mL. Après un temps de contact de 1 à 48 heures, les concentrations atteignaient 1,49 ; 1,81 et 2,04 log UFP/cm² pour le coliphage Φ X174, le poliovirus 1 et le phage MS2, respectivement. Dans cette étude, le phage MS2 apparaît par contre comme étant le virus le plus adhérent.

La vitesse d'adhésion des particules virales est un autre aspect qui peut être étudié. Les données présentées dans le **tableau 3** nous permettent d'avoir un aperçu de la vitesse d'adhésion des virus sur les biofilms qui semble être relativement rapide. En effet, Quignon *et al.* (1997) observent des virus adhérents sur le biofilm dès six minutes. L'étude de Helmi *et al.* (2008) portant sur le poliovirus type 1, les phages Φ X174 et MS2, ainsi que sur des oocystes ou des kystes de protozoaires (*Cryptosporidium parvum* et *Giardia intestinalis*) fournit des informations intéressantes. En effet, si ces auteurs observent un taux d'adhésion final de MS2 similaire à celui des protozoaires, ils constatent également que les virus adhèrent au biofilm dès une heure alors que l'adhésion maximale des parasites est obtenue en 24 heures. La taille des microorganismes est un des paramètres pouvant influencer la vitesse d'adhésion au biofilm.

Ces données obtenues en pilote nous confirment ainsi l'existence d'un coefficient de partage des virus entre la phase eau et le biofilm. Même si les taux d'adhésion ne sont comparables qu'à l'intérieur d'une même étude, il est possible de souligner qu'ils sont extrêmement variables (moins de 0,001 % à 81,1 %). Quant à la comparaison des capacités d'adhésion des différents virus, les conclusions entre les études sont discordantes. Ainsi, le phage MS2 peut adhérer sur les biofilms dans des proportions similaires au phage Φ X174 (Storey and Ashbolt, 2003), plus élevées (Helmi *et al.*, 2008), ou plus faibles (Hock et Botzenhart, 2002).

Dans ces différentes études il est fait mention de l'adhésion des virus sur le biofilm sans que ce processus n'ait réellement été démontré. En effet, dans le cas de biofilms épais (formés à partir d'eaux usées, biofilms mono-espèce...) et hydratés, les virus peuvent être simplement

présents dans l'eau composant le biofilm. Pour les biofilms d'eau potable, le recouvrement de la surface peut ne pas être total, le virus peut alors adhérer sur le support au niveau de zones non colonisées par de la biomasse. Briandet *et al.* (2008) renforcent le questionnement de la réelle adhésion des virus sur le biofilm puisqu'ils observent une capacité du phage de *Lactococcus* c2 à diffuser en profondeur dans des biofilms mono-espèce de *Lactococcus lactis* (bactérie hôte du phage c2) ou de *S. maltophilia*. Or une capacité d'adhésion importante devrait en théorie s'opposer à une diffusion rapide en profondeur.

Des arguments en faveur d'une adhésion virale réelle sur les biofilms ont toutefois été amenés dans d'autres conditions expérimentales. Ainsi, Storey et Ashbolt (2003) ont inoculé des billes de latex fluorescentes de 20 nm ainsi que des phages B 40-8 dans de l'eau en contact pendant 24 heures avec un biofilm d'eau potable de 90 jours. Les billes fluorescentes et les phages ont été observés par fluorescence dans les profondeurs du biofilm et dans les micropores, de façon similaire à ce qui a été observé par Briandet *et al.* (2008). Mais les auteurs (Storey et Ashbolt, 2003) ont également observé une accumulation de billes et de virus sur les micro-colonies bactériennes du biofilm. Cette observation réalisée par microscopie à fluorescence confirme ainsi l'adhésion virale sur le biofilm. Une autre étude démontre, elle aussi, l'adhésion des virus sur les biofilms en utilisant une stratégie totalement différente. Helmi *et al.* (2008) ont décroché un biofilm d'eau potable de sept mois. Après une centrifugation de la phase aqueuse à vitesse faible (1250 g pendant 15 min, ne permettant pas la sédimentation des virus), les virus ont été retrouvés uniquement dans le culot. La sédimentation des virus serait due à leur adhésion au biofilm. Ainsi, ces études (Storey et Ashbolt, 2003 ; Helmi *et al.*, 2008) mettent en avant une potentielle adhésion des virus aux biofilms plutôt qu'un simple partage entre les phases eau et biofilm.

En résumé, l'extrême variabilité des résultats décrits dans ces études souligne la complexité des phénomènes intervenant dans l'interaction virus-biofilms. En considérant les variations imposées par l'utilisation de systèmes et de protocoles différents (réacteurs, virus, méthodes de calcul, protocoles de récupération des virus, composition physico-chimique de l'eau et nature du biofilm), il est toutefois possible d'observer que l'adhésion des virus aux biofilms est possible selon une cinétique plutôt rapide. Cette adhésion n'interdit pas de considérer comme possible la diffusion des virus dans des biofilms épais. De façon générale, le taux de recouvrement du support par les biofilms, les conditions de formation de celui-ci, la structure

des virus et les propriétés de surface des différents virus sont des paramètres encore trop souvent négligés dans les discussions des résultats expérimentaux.

3.2. Persistance des virus dans les biofilms

Après une phase d'adhésion, la persistance des virus au sein du biofilm dépend d'une part de leur résistance aux facteurs susceptibles de les dégrader (protéases, nucléases...) et d'autre part de leur relargage dans la phase aqueuse. Il est généralement très difficile de dissocier complètement ces deux phénomènes. Par ailleurs, l'étude de la dégradation d'une particule virale peut s'envisager selon deux référentiels. Le premier prend uniquement en compte le caractère infectieux des virus qui ne peut être estimé qu'à partir de systèmes utilisant des méthodes de culture. La perte d'infectivité peut résulter d'une altération soit de la capsid, soit du génome. On parlera alors d'inactivation ou de survie des virus. Le deuxième référentiel ne prend en compte que la persistance du génome viral détecté par les techniques de biologie moléculaire. Dans ce cas, le signal peut demeurer constant alors même que le virus est inactivé. Ainsi, à l'heure actuelle il est largement reconnu dans la communauté scientifique que la persistance d'un signal moléculaire (RT-PCR) ne peut pas être reliée à l'état infectieux du virus (Gassilloud *et al.*, 2003).

Hock et Botzenhart (2002) ont étudié la persistance de virus infectieux (poliovirus 1, phages MS2 et Φ X174) dans un biofilm en fonction du temps. Après inoculation d'une quantité connue de virus dans des réacteurs de laboratoire comportant des biofilms d'eau potable à leur surface, les concentrations initiales en poliovirus 1, en phage MS2 et en phage Φ X174 sont respectivement de 27 à 267 UFP/cm², 6 UFP/cm² et 16 UFP/cm² après une heure de contact. Les auteurs ont retrouvé du phage Φ X174 jusqu'à 24 heures, du phage MS2 jusqu'à 48 heures et du poliovirus infectieux jusqu'à 14 jours après leur inoculation dans ces réacteurs. Helmi *et al.* (2008) ont constitué un biofilm d'eau potable de 218 jours à 10°C dans un réacteur annulaire rotatif (le volume de la phase aqueuse est de 1 litre) sous un régime laminaire, puis ont mis ce biofilm en contact avec différents virus. A partir de concentrations initiales en poliovirus 1 infectieux, génome de poliovirus 1, phages Φ X174 et MS2 infectieux atteignant respectivement 1,49 log NPPUC/cm², 1,74 log NPPUC/cm², 1,81 log UFP/cm² et 2,04 log UFP/cm² de biofilm, la persistance au sein de ce biofilm est étudiée au cours du temps. La phase aqueuse, d'un volume de un litre, est renouvelée tous les sept jours. Dans ces conditions, le poliovirus infectieux et les deux bactériophages sont retrouvés dans le biofilm

jusqu'à six jours et du génome de poliovirus a été détecté pendant les 34 jours d'expérimentation. Storey et Ashbolt (2003) ont réalisé un biofilm d'eau potable de trois mois avant de le mettre en contact avec des phages B40-8 et MS2. A partir d'une concentration initiale dans le biofilm d'environ 10^6 UFP/cm² ces virus ont été retrouvés dans le biofilm durant 30 jours même en présence de chlore (0,19 mg/L). Pour modéliser la persistance virale, les auteurs, plutôt qu'une simple régression linéaire, ont préféré appliquer à leurs résultats un modèle biphasique. En fait une sub-population virale représentant 0,01 % des virus initialement retrouvés dans le biofilm, aurait la capacité de persister dans ce biofilm durant une longue période, estimée à plus de 100 jours par extrapolation du modèle.

Des données obtenues en conditions naturelles semblent confirmer cette capacité de persistance dans les biofilms. En effet, Skraber *et al.* (2009) ont observé des phénomènes saisonniers dans la composition en virus de l'eau usée. Par exemple, le génome de norovirus (génogroupes I et II) décrit un pic hivernal dans les eaux usées tandis que le génome des entérovirus est détecté principalement en juillet. Ceci n'est pas surprenant puisque les épidémies de gastro-entérites à norovirus sont observées en hiver et les épidémies à entérovirus sont estivo-automnales. Par contre, dans les biofilms d'eaux usées, ces auteurs observent une concentration en entérovirus et en norovirus génogroupe II quasiment constante durant une grande partie de l'année (neuf mois) sauf pour les norovirus génogroupe I qui sont significativement plus nombreux dans le biofilm en hiver. Ces observations confortent l'hypothèse selon laquelle les virus sont, ou du moins leur génome, capables de persister dans le biofilm en dehors des pics épidémiques.

L'ensemble de ces études souligne la possible persistance des virus au sein des biofilms même en présence de chlore libre. Il est cependant difficile de comparer ces études entre elles car les conditions expérimentales sont totalement différentes. Par ailleurs, le nombre d'études est encore trop restreint pour avoir une idée de l'impact du type de virus et de la nature du biofilm sur la persistance au sein du biofilm, d'autant plus que celle-ci est multiparamétrique. Certaines études ont pourtant tenté d'isoler certains paramètres tels que l'inactivation virale et le relargage. Ainsi, Skraber *et al.* (2007 et 2009) ont placé des biofilms d'eaux usées naturelles dans un tampon et ont suivi l'inactivation des coliphages somatiques et des phages ARN F-spécifiques à 4°C et 20°C. Parallèlement ils ont suivi l'inactivation phagique dans l'eau usée correspondante. L'inactivation est entre 2,3 et 15 fois plus importante dans l'eau

quels que soient le phage et la température. Ainsi les biofilms, pourraient avoir un rôle protecteur sur les virus, en particulier les biofilms issus d'eaux usées.

3.2.1. Relargage des virus à partir du biofilm

En ce qui concerne le relargage des virus à partir du biofilm, quelques données de la littérature évoquent une libération virale par érosion du biofilm. Il est très difficile d'étudier le relargage de biofilms dans l'eau potable *in situ*, les expériences en laboratoire représentent alors une alternative intéressante pour tenter d'appréhender ce qui se produit en conditions réelles. C'est le cas dans l'étude de Helmi *et al.* (2008) évoquée précédemment où un système rotatif a été mis en place pour permettre la croissance d'un biofilm d'eau potable pendant sept mois sous un régime laminaire (30 rpm). Après contamination par du poliovirus 1, le biofilm contenait $1,74 \pm 0,17 \log_{10}$ unité génomique/cm² ($1,49 \pm 0,16 \log_{10}$ NPPUC/cm²). Des vidanges successives de l'eau du réacteur avec un renouvellement par de l'eau de distribution tous les sept jours (passage de 50 L d'eau de distribution en huit heures puis arrêt) montrent que du génome de poliovirus est encore retrouvé dans l'eau après la deuxième vidange (7^{ème} jour d'expérimentation) alors que le biofilm n'en contient qu'environ $1 \log_{10}$ unité génomique/cm². Aucun génome n'est détecté dans l'eau lors des vidanges suivantes alors qu'il est toujours détecté dans le biofilm jusqu'à la 5^{ème} vidange (28^{ème} jour d'expérimentation). Ces résultats démontrent qu'un transfert de virus du biofilm à l'eau est possible selon vraisemblablement les principes de l'équilibre. Lorsque les auteurs appliquent un régime turbulent (380 rpm) au 42^{ème} jour d'expérimentation, le génome du virus est à nouveau détecté dans la phase aqueuse. Ainsi, l'érosion du biofilm a également permis le « décrochage » des virus et leur passage dans la phase aqueuse.

Certains auteurs émettent l'hypothèse d'un relargage possible des virus du biofilm vers la phase eau via l'érosion du biofilm en conditions naturelles. Cette érosion serait provoquée par les forces de cisaillement dues à l'écoulement de l'eau.

En résumé, les virus peuvent persister dans les biofilms pendant des durées variables suivant les virus considérés, le type de biofilm, les conditions expérimentales et être relargués dans la phase aqueuse. Des études ont également montré l'effet protecteur du biofilm par une augmentation de la survie des virus adhérents.

4. Inactivation virale par l'hypochlorite de sodium

Le phénomène d'inactivation virale a été largement décrit et étudié dans la littérature quel que soit l'oxydant considéré. L'analyse de ces publications apporte souvent des données convaincantes mais leur comparaison est rendue difficile du fait d'approches expérimentales mal contrôlées et d'un manque d'informations techniques. En effet, l'efficacité des traitements de désinfection est directement liée aux caractéristiques physiques de l'eau potable, en particulier la température, le pH, la turbidité, l'aggrégation/dispersion des microorganismes, et la présence de matière organique (Barbeau *et al.* 2005). Dans la plupart des cas, ces caractéristiques ne sont pas décrites. Parfois, même la vitesse de consommation du désinfectant n'est pas mesurée, ce qui interdit l'estimation de la véritable durée d'exposition (ou la concentration d'exposition) des microorganismes d'intérêt. La concentration en oxydant (C) et le temps de contact (t) sont des paramètres importants lors d'une désinfection. C'est pourquoi le paramètre C.t est empiriquement utilisé pour caractériser les conditions de désinfection. Pour évaluer les C.t théoriques correspondant à une inactivation virale, il est impératif de faire référence à des milieux sans demande en oxydant. Aussi, l'expression pragmatique des données expérimentales sous la forme d'un C.t – expression qui ne représente en rien une prédiction – reste à utiliser avec précaution. De fait, une même valeur de C.t peut être obtenue avec des conditions de temps et de concentration en chlore très différentes et très souvent les auteurs ne donnent que la quantité de désinfectant ajoutée à t_0 sans suivi de sa consommation au cours de l'essai.

4.1. Inactivation virale dans l'eau par l'action de l'hypochlorite de sodium

Une solution d'eau de javel est composée d'acide hypochloreux (HClO), en équilibre avec l'ion hypochlorite ClO^- (température et pH dépendant). L'acide hypochloreux est le principal agent de l'action désinfectante de l'eau de javel en milieux aqueux. La plus faible action désinfectante de ClO^- serait due à sa charge qui limiterait sa diffusivité dans les structures biologiques (Scarpino *et al.*, 1974).

Quelques résultats d'inactivation observés sur différents virus entériques pathogènes ainsi que sur des bactériophages ARN F-spécifiques en suspension dans l'eau sont présentés dans le **tableau 6**. Les taux d'inactivation correspondent à des mesures de l'infectiosité virale, sauf mention contraire, en fonction de différents paramètres tels que la température, le pH, la concentration en chlore et le temps d'exposition. Les abréviations utilisées dans ce tableau

sont les suivantes : FRNAPH : bactériophages ARN F-spécifiques, CVB : virus Coxsackie B, VHA : virus de l'hépatite A, GG : génogroupe, BDF : tampon sans demande en chlore, T : température, NS : non spécifié, * modélisation des données expérimentales, ^a valeurs estimées des graphiques.

Lors des études présentées dans le **tableau 6**, les températures de l'eau varient de 5°C (Cromeans *et al.*, 2010 ; Kahler *et al.*, 2010 ; Lim *et al.*, 2010) à 25°C (Abad *et al.*, 1994) et les valeurs de pH de 7 (Cromeans *et al.*, 2010 ; Kahler *et al.*, 2010 ; Lim *et al.*, 2010) à 8,2 (Thurston-Enriquez *et al.*, 2003). Les concentrations en chlore varient de 0,17 mg/L (Lim *et al.*, 2010) à 1,2 mg/L (Schaper *et al.*, 2002) et les temps d'exposition de 0,2 min (Cromeans *et al.*, 2010 ; Kahler *et al.*, 2010) à 105 min (Abad *et al.*, 1994). Le **tableau 6** illustre bien la variabilité des conditions expérimentales et, par voie de conséquence, la difficulté à comparer les résultats. On peut cependant extraire plusieurs informations de cette littérature.

Tableau 6. Inactivation de bactériophages et de virus entériques pathogènes par l'hypochlorite de sodium en fonction de la température, du pH de l'eau, de la concentration en chlore et du temps d'exposition.

Famille	Genre	Virus étudié	Milieu	T °C	pH	Concentration initiale en chlore (mg/L)	Temps d'exposition (min)	C.t (mg.min/L)	Taux d'inactivation (log ₁₀)	Référence	
Picornaviridae	<i>Hepatovirus</i>	HVA	Eau de distribution auto-clavée	25 °C	7,5	0,5	1,5 ^a		2	Abad <i>et al.</i> , 1994	
	<i>Enterovirus</i>	Polio virus 1	Eau de distribution auto-clavée	25 °C	7,5	1	15 ^a		2		
						0,2	<1 ^a				
						0,5	<1 ^a				
		CVB 3	BDF	5 °C	7	0,2	3,6 ^a	0,97*	2	Cromeans <i>et al.</i> , 2010	
					8		2,8 ^a	0,65*			
		CVB5	BDF	5 °C	7	0,2	12	3,6	2	Cromeans <i>et al.</i> , 2010	
					8		20	4,7			
					7		17 ^a	3,5			
			Eau souterraine	5 °C	8	0,2		2,3	3	Kahler <i>et al.</i> , 2010	
					7			1,2			
					8			0,73			
		Echo virus 1	Eau souterraine	5 °C	7	0,2	3,4 ^a	0,84	3	Kahler <i>et al.</i> , 2010	
					8			0,8			
					7			0,4			
			BDF	15 °C	8		0,3*				
					7	0,2	2,5 ^a	0,96*	2	Cromeans <i>et al.</i> , 2010	
	8				4,0 ^a		0,99*				
	Echo virus II	BDF	15 °C	7	0,2		4,0 ^a	0,82*			2
8				2,4 ^a		0,54*					
Caliciviridae	<i>Norovirus</i>	Norovirus murin	Eau souterraine	5 °C	7	0,2		0,1 ^a	0,023	3	Kahler <i>et al.</i> , 2010
				8	7						
				15 °C	8						
			BDF	5 °C	7	0,2	0,1 ^a	< 0,07	2	Cromeans <i>et al.</i> , 2010	
							8	< 0,08			
							5 °C	7,2			0,75 ^a
	20 °C		0,4 ^a	0,061*							
	<i>Vesivirus</i>	FCV	Eau souterraine déchlorée	15 °C	8-8,2	0,18	1	0,21*	2	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> , 2003	
Leviviridae	<i>Levivirus</i>	Phage MS2	BDF	5°C	7,2	0,172-0,174	1,5 ^a	0,242*	2	Lim <i>et al.</i> , 2010	
			20°C		0,5 ^a		0,080*				
		<i>Allolevivirus</i>	FRNAPH - GGI	Eau minérale	21°C		NS	1,2	5		0,6
	10								3,7		
	FRNAPH - GGII		5						1,2		
			10						5,2		
	FRNAPH - GGIII		5						2,4		
			10						5,9		
			FRNAPH - GGV			5				4,3	
		10			6,2						
Adenoviridae	<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus 40	Eau souterraine déchlorée	15°C	8–8,2	0,5	2,5	1.51*	2	Thurston-Enriquez <i>et al.</i> , 2003	
			BDF	5°C	7-8	0,2		<0.02*	2	Cromeans <i>et al.</i> , 2010	
		Adenovirus 2	Eau souterraine	5°C	7-8	0,2	0,2 ^a	0,02-0,04	2		Kahler <i>et al.</i> , 2010
					7		0,2 ^a	0,035			
					8			0,037			
					7			<0,040			
					8			<0,020			

Parmi les bactériophages ARN F-spécifiques, le phage MS2 (génogroupe I) est le phage le plus étudié comme modèle de prédiction de l'efficacité de désinfection pour les virus entériques pathogènes pour l'homme. Schaper *et al.* (2002) ont analysé le taux d'inactivation de MS2 dans l'eau minérale à 21°C - et ont constaté, pour une concentration en chlore ajouté de 1,2 mg/L, un abattement de 0,6 log₁₀ après 5 minutes et de 3,7 log₁₀ après 10 minutes. Lim *et al.* (2010) ont constaté une moins grande résistance du phage MS2 lors la chloration dans un tampon sans demande de chlore. En effet, un abattement de 2 log₁₀ est obtenu après avoir appliqué une concentration en chlore de 0,17 mg/L pendant 30 secondes environ (pH 7,2 ; 20°C). Cependant, le fait de travailler dans une solution tampon sans demande de chlore, implique une meilleure disponibilité du chlore étant donné qu'il n'est pas consommé par des éléments en suspension dans l'eau. L'étude de Schaper *et al.* (2002) compare les différents génogroupes (I, II, III et IV) et met en évidence une sensibilité différente des phages face à une dose de chlore de 1,2 mg/L. La séquence de sensibilité au chlore serait du type : G I < G II < G III < G IV, G I (comprenant le phage MS2) étant le génogroupe le moins sensible à la chloration et G IV (comprenant le phage SP) étant le plus sensible.

Afin de comparer plus simplement la résistance à la chloration des virus entériques pathogènes pour l'homme, nous avons présenté les abattements de différents virus entériques obtenus par des études réalisées dans des conditions comparables : milieu sans demande de chlore, pH compris entre 6 et 7,8 et température de 5°C pour des concentrations en chlore ajoutées comprises entre 0,2 et 0,5 mg/L sur la **figure 5**.

L'analyse des informations présentées dans cette bibliographie peut s'envisager de deux façons. Une comparaison des résultats obtenus dans les conditions très proches (présentés dans la **figure 5**) ou une confrontation des informations figurant dans la **figure 5** avec celles du **tableau 6** présentant des conditions expérimentales plus hétérogènes.

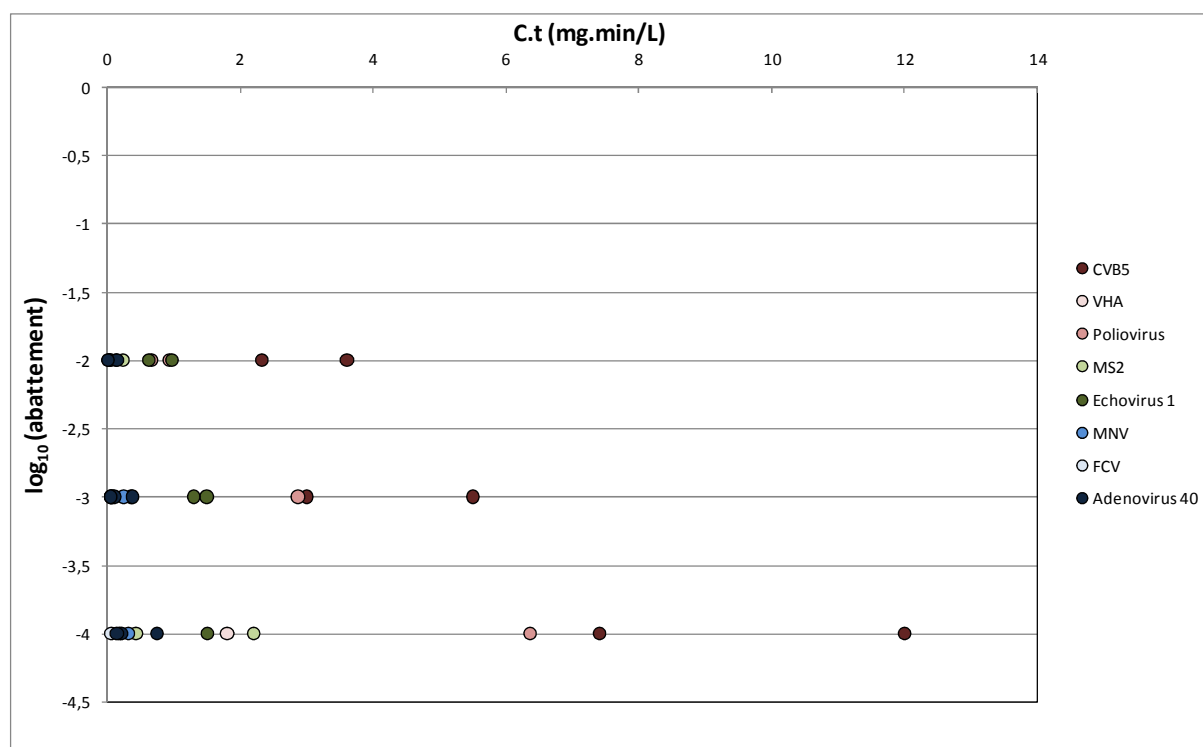


Figure 5. Abattement viral obtenu pour différents virus entériques en fonction de différents C.t, dans des milieux sans demande en chlore, à 5°C, pour des pH de 6 à 7,8 et des concentrations en hypochlorite de sodium comprises entre 0,2 et 0,5 mg/L de chlore (Lim *et al.*, 2010 ; Sobsey *et al.*, 1988 ; Engelbrecht *et al.*, 1980 ; Cromeans *et al.*, 2010 ; Sobsey *et al.*, 1988 ; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003).

L'analyse de la **figure 5** ne montre aucune tendance particulière dans l'élimination virale par chloration. Il est toutefois possible d'observer que d'après ces données le virus le plus résistant à la chloration est le coxsackievirus B5, suivi du poliovirus-1 et de l'échovirus 1. Le VHA, le bactériophage MS2 ainsi que l'adénovirus 40 semblent avoir une position intermédiaire et les virus les plus sensibles à la chloration sont les norovirus murins (MNV) et félins (FCV). Ces résultats peuvent être tempérés avec certains travaux de Abad *et al.* (1994) (**tableau 6**) qui, bien que conduits dans des conditions différentes, laissent apparaître le VHA comme un virus extrêmement résistant à la chloration. En effet, ces auteurs ont observé un abattement de 2 log₁₀ pour une concentration en chlore de 0,5 mg/L et un temps d'exposition de 105 minutes dans de l'eau de distribution autoclavée (pH 7,5 ; 25°C). Toujours selon le **tableau 6** le deuxième virus le plus résistant à la chloration apparaît être le coxsackievirus B5. Cromeans *et al.* (2010) ainsi que Kahler *et al.* (2010) ont travaillé à 5°C et pH 7 et ont appliqué 0,2 mg/L de chlore pour obtenir un abattement viral de 2 log₁₀ en 12 minutes et de 3 log₁₀ en 17 minutes, respectivement. Le coxsackievirus B3 présente une sensibilité plus

élevée à la chloration puisque dans les mêmes conditions un abattement de 2 log₁₀ est obtenu après seulement 3,6 minutes de contact avec le chlore (Cromeans *et al.*, 2010).

MNV et l'adénovirus 2 semblent être les virus les moins résistants à l'hypochlorite de sodium. Dans des conditions comparables (5°C, pH 7) trois études ont montré que pour une concentration en chlore d'approximativement 0,2 mg/L, il fallait moins de 0,75 minutes pour obtenir un abattement viral du MNV de 2 log₁₀ (Cromeans *et al.*, 2010 ; Lim *et al.*, 2010) et 3 log₁₀ (Kahler *et al.*, 2010). Dans les mêmes conditions, il faut moins de 0,2 minutes pour inactiver 2 log₁₀ (Cromeans *et al.*, 2010) ou 3 log₁₀ (Kahler *et al.*, 2010) d'un adénovirus 2. Enfin les échovirus, le poliovirus 1, l'adénovirus 40 et le coxsackievirus B3 présentent une sensibilité au chlore intermédiaire en comparaison avec les virus cités ci-dessus puisque une concentration en chlore de 0,2 à 0,5 mg/L abouti à un abattement de 2 à 3 log₁₀ en 1 à 4 minutes pour des températures comprises entre 5 et 15 °C et des pH de 7 à 8,2 (Abad *et al.*, 1994 ; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003 ; Cromeans *et al.*, 2010 ; Kahler *et al.*, 2010).

L'effet du chlore peut être influencé par une augmentation de la température et/ou du pH. Cromeans *et al.* (2010) montrent que pour le coxsackievirus B5 le même abattement viral est obtenu après 12 et 20 minutes respectivement pour des pH de 7 et 8. Kahler *et al.* (2010) montrent que pour un coxsackievirus B5 un abattement de 3 log₁₀ est obtenu après application d'un C.t de 3,5 et 1,2 mg/L.min si la température est augmentée de 5 à 15°C respectivement. Lim *et al.* (2010) montrent également qu'une augmentation de la température (de 5 à 20° C) permet une diminution du C.t (de 0,242 à 0,080 mg.min/L) pour obtenir un abattement de 2 log₁₀ du bactériophage MS2. Toutefois, aucune hypothèse mécanistique n'a été proposée pour expliquer cette observation.

Bien qu'il soit difficile de tirer des conclusions claires concernant l'inactivation virale par le chlore de par l'hétérogénéité des protocoles expérimentaux et l'importance que peut avoir chacun des paramètres (pH, température, type d'eau...) sur l'action de l'hypochlorite de sodium, il est néanmoins possible de conclure sur le fait que les différents génogroupes de bactériophages ARN F-spécifiques présentent une sensibilité variable au chlore bien qu'ils aient une structure très proche (Schaper *et al.*, 2002). Il en est de même pour les virus entériques pathogènes qui présentent en plus des différences structurales pouvant renforcer les différences de sensibilité à l'hypochlorite de sodium. Il ressort tout de même que le coxsackievirus B5 et le VHA seraient les virus les plus résistants à un traitement par

l'hypochlorite de sodium tandis que le norovirus murin serait le virus le plus sensible. Le bactériophage MS2 aurait une position intermédiaire au même titre que le poliovirus ou que l'échovirus.

4.2. Inactivation virale au sein d'un biofilm par l'hypochlorite de sodium

L'effet de la chloration sur des virus adsorbés sur/dans des biofilms reste peu étudié. Quignon *et al.* (1997) ont constaté qu'en présence de 0,02 à 0,04 mg/L de chlore, le taux de récupération viral estimé – c'est à dire le nombre de virus récupérés dans l'eau à la sortie du simulateur / le nombre de virus initialement inoculés – pour le poliovirus adsorbé au biofilm est de 8,9% en présence de chlore alors qu'il est de 69,8% en absence de chlore. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une protection des virus par le biofilm face aux méthodes de désinfection. Storey et Ashbolt (2003) ont étudié la persistance des phages B40-8 et MS2 dans un biofilm d'eau potable de trois mois formé en réacteur. La modélisation de leurs données suggère que 0,01% des phages initialement introduits dans l'eau pourraient persister au sein du biofilm durant une période estimée à plus de 100 jours pour B40-8 et 1000 jours pour MS2 et ceci en présence d'une quantité de chlore dans l'eau de $0,19 \pm 0,29$ mg/L et un pH de 8,7.

Ces études sont encore trop peu nombreuses pour tirer des conclusions quand à l'impact du biofilm et du type de virus sur la protection des virus face à la chloration. Le biofilm semble toutefois avoir un effet protecteur pour les virus lorsque ceux-ci s'y retrouvent piégés par rapport à des virus restés en suspension dans la phase aqueuse.

Matériels et Méthodes

1. Objectifs de l'étude

L'objectif de ce projet de recherche était de répondre à deux grandes questions :

- Combien et comment des virus modèles tels que les bactériophages ARN F-spécifiques MS2 et Q β peuvent-ils s'accumuler sur des matériaux colonisés par des biofilms.
- Evaluation de la persistance de ces virus modèles, à la fois dans l'eau et adsorbés au biofilm, soumis à un protocole de nettoyage chimique par chloration.

2. Production et dénombrement des bactériophages ARN F-spécifique

La production et le contrôle des bactériophages ARN F-spécifiques et de leur bactérie hôte (*Escherichia coli*) sont effectués selon la norme ISO 10705-1 (Water Quality : Detection and enumeration of bacteriophages, 2001). La préparation des réactifs nécessaires à la production et au dénombrement des phages se trouve en **annexe 1**.

2.1. Production et contrôle de la bactérie hôte *Escherichia coli*

2.1.1. Production des cultures d'essai

Une culture mère d'*E. coli* K12 Hfr estensemencée sur trois boîtes de milieu MacConkey. Après 18 heures d'incubation à 37°C, cinq colonies rouges (lactose-positives) sont sélectionnées et inoculées dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. Après cinq heures d'incubation à 37°C et sous agitation (100 rpm), 10 mL de glycérol stérile sont ajoutés dans le milieu. La culture d'essai est aliquotée et conservée à -80°C.

2.1.2. Etalonnage des mesures de turbidité

La bactérie hôte *E. coli* K12 Hfr doit être en phase exponentielle de croissance lors de la réalisation du dénombrement des phages infectieux. Le contrôle suivant vise à déterminer la densité optique ($\lambda = 600$ nm) correspondant à ce stade.

500 μ L de culture d'essai sont inoculés dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. Le milieu est incubé à 37°C sous agitation (100 rpm) et un échantillon de culture est prélevé toutes les 30 minutes pendant 3 heures 30. Sur chaque échantillon est réalisée une mesure de densité optique ($\lambda = 600$ nm) et un dénombrement des bactéries revivifiables (en UFC : Unité Formant Colonie) sur milieu TYGA solide. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, le nombre total de colonies est compté pour chaque temps de culture afin d'établir le rapport avec la valeur de densité optique.

La mesure de densité optique sera ensuite utilisée pour déterminer si la bactérie est en phase exponentielle de croissance. Selon la norme ISO 10705-1 (2001), une densité optique à $\lambda = 600$ nm comprise entre 0,3 et 0,5 correspondrait à ce stade.

Lors de notre étude des valeurs de turbidité comprises entre 0,25 et 0,5, obtenues entre 150 et 200 minutes de temps de culture, correspondent à la phase de croissance exponentielle de la bactérie. Pour ces valeurs de densité optique, les concentrations en bactéries cultivables sont comprises entre $1,2 \cdot 10^7$ et $2,6 \cdot 10^7$ UFC/100 μ L. Lors des étapes de production et de titrage des bactériophages, les cultures bactériennes seront systématiquement prélevées entre 150 et 200 minutes et la densité optique sera contrôlée afin de se situer dans la fenêtre optimale pour l'infection des bactéries par les phages.

2.2. Production des bactériophages

2.2.1. Mise en culture des bactériophages

Les deux stocks de phages MS2 (ATCC, réf. 15597-B1) et Q β (fourni par J. Jofre, Université de Barcelone) sont produits selon le même protocole (ISO 10705-1, 2001), sans étape de traitement au chloroforme.

500 μ L d'une suspension d'*E. coli* K12 Hfr sont inoculés dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. La culture est incubée à 37°C sous agitation pendant 18 heures afin d'obtenir une pré-culture en phase stationnaire avancée. Une seconde culture est alors réalisée en inoculant 500 μ L de la pré-culture dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. Après 90 minutes d'incubation à 37°C sous agitation, le phage est ajouté pour obtenir une concentration finale de 10^7 UFP/mL dans le milieu TYGB. Après 5 heures d'incubation à 37°C, sous agitation, le milieu est centrifugé à 3000 g pendant 20 minutes. Le surnageant est filtré sur un filtre-seringue de porosité 0,22 μ m (Millipore, Millex GP, réf. 5CG033RS). La suspension phagique ainsi obtenue est stockée à 4°C, à l'obscurité.

2.2.2. Dénombrement des bactériophages

Le dénombrement des plages de lyse s'effectue par la méthode en double couche, toujours selon la norme ISO 10705-1 (2001).

500 μ L d'une culture d'*E. coli* K12 Hfr sont inoculés dans 50 mL de milieu liquide TYGB à 1% de glucose-calcium. La culture est incubée à 37°C sous agitation. Une série de dilutions d'ordre 10 du stock phagique est préparée dans du tampon PBS stérile (Gibco, réf. 18912-014). Dans des tubes à hémolyse, sont déposés 2,5 mL de milieu semi-solide TYGA à 1% de glucose-calcium en surfusion (50°C), 1 mL de suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance et 1 mL d'une dilution phagique précédemment préparée. Le contenu de chaque tube est coulé sur boîte de milieu solide TYGA puis incubé à l'étuve à 37°C pendant 18 heures. Le décompte des plages de lyse est réalisé afin de déterminer le titre du stock phagique en UFP/mL (UFP : Unité Formant Plage).

Ce protocole est utilisé pour le titrage des bactériophages infectieux pour les stocks de phages, ainsi que pour les expérimentations en réacteur. Les stocks phagiques obtenus après la production titraient à 10^{11} UFP/mL pour MS2 ainsi que pour Q β .

3. Quantification du génome viral

3.1. Extraction du génome viral

3.1.1. Extraction à partir de phages en suspension

L'extraction du génome viral est effectuée avec le kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, réf. 52906) selon le protocole défini par le fournisseur.

Les échantillons sont tout d'abord traités au tampon de lyse AVL, avec une homogénéisation au vortex et un temps d'incubation de 10 minutes à température ambiante, afin de lyser les particules virales. L'ARN viral est ensuite précipité par ajout d'éthanol absolu et homogénéisation au vortex. L'échantillon est déposé sur colonne QIAamp, en deux dépôts et deux centrifugations (1 minute à 6000 g). Deux lavages sont réalisés, un avec le tampon AW1 (6000 g, 1 minute), puis un avec le tampon AW2 (14000 g, 3 minutes). L'ARN viral est récupéré par ajout de tampon d'élution (AVE) sur la colonne, après un temps d'incubation d'1

minute et une dernière centrifugation (1 minute à 6000 g). Les ARN viraux sont immédiatement congelés à -80°C.

3.1.2. Extraction d'ARN viral à partir de coupons

Dans le cadre d'une expérimentation en réacteur, l'extraction de l'ARN viral se réalise directement sur les coupons, et une adaptation du protocole a été nécessaire.

Les coupons sont récupérés dans des tubes en polypropylène de 50 mL (Dutscher, réf. 227261) contenant 4 mL de tampon de lyse AVL. Après homogénéisation au vortex et incubation pendant 10 minutes à température ambiante, l'ARN viral est précipité par ajout de 4 mL d'éthanol absolu. Après homogénéisation au vortex, l'échantillon est transféré sur colonne QIAamp et le passage de l'échantillon à travers la colonne se fait à l'aide d'une pompe à vide (QIAGEN). La suite du protocole d'extraction est identique à celui du paragraphe 2.1.1, à partir de l'étape de lavage avec le tampon AW1.

3.2. Quantification du génome viral

La quantification du génome se fait suivant le protocole développé par Ogorzaly et Gantzer (2006). La méthode consiste en l'amplification d'une séquence spécifique du génome du bactériophage que l'on recherche. Les gènes cibles de la quantification par PCR sont les gènes de la protéine de capsid et de la protéine de maturation pour le génogroupe I (phage MS2) et le gène de la protéine de capsid pour le génogroupe III (phage Q β). L'étape de rétro-transcription (RT) permet la synthèse du brin complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN viral par une reverse transcriptase. L'étape de PCR en temps réel permet ensuite d'amplifier le fragment d'ADNc. Les produits amplifiés sont directement révélés au cours de l'amplification grâce à la mesure de la fluorescence émise lors de la PCR qui est proportionnelle au nombre de copies d'ADN synthétisées (**Figure 6**). Une sonde et deux amorces (sens et anti-sens) sont utilisées ainsi que des nucléotides et une ADN polymérase. La sonde, complémentaire d'une séquence située entre les deux amorces, est caractérisée par la présence en 5' d'un reporter ou fluorophore (R) qui émet de la fluorescence et en 3' d'un quencher (Q) absorbant la fluorescence par phénomène de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert). Au cours de l'élongation, la dégradation de la sonde entraîne l'éloignement de ces deux éléments et l'émission de fluorescence. La mesure de la fluorescence émise à chaque cycle aboutit à une

courbe d'allure sigmoïdale (**Figure 7**). Chaque échantillon est caractérisé par un C_T (cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence devient significativement supérieur au bruit de fond. Le C_T est inversement proportionnel à la quantité de matériel génétique présente dans l'échantillon. L'avantage de cette technique, outre sa rapidité, est de pouvoir différencier directement les différents génogroupes par l'utilisation d'amorces et de sondes ciblant une séquence spécifique de chaque génogroupe.

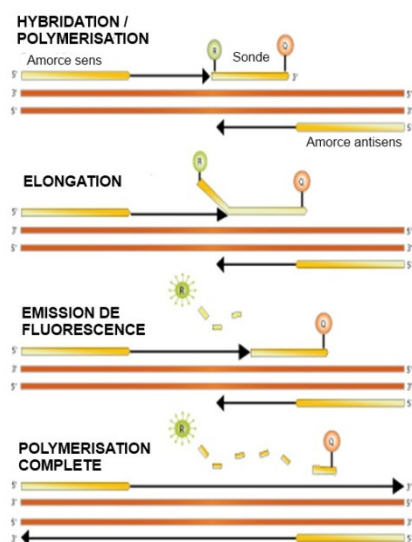


Figure 6. Schéma de la qPCR

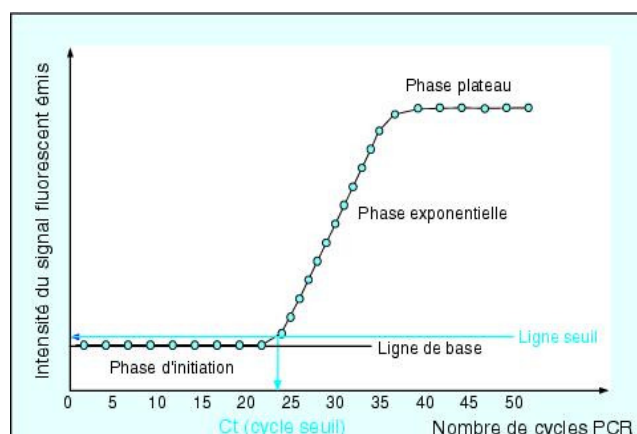


Figure 7. Courbe d'émission de fluorescence en qPCR

3.2.1. Rétro-transcription (RT)

La rétro-transcription se déroule en deux étapes présentées dans le **tableau 7** et sont effectuées dans un thermocycleur Veriti (Applied Biosystems) dans des microtubes de 0,2 mL (Applied Biosystems, réf. N8010540).

La première étape d'incubation permet l'hybridation des amorces avec l'ARN, et la seconde étape permet la synthèse de l'ADNc grâce à l'enzyme de transcription reverse SuperScript III.

Tableau 7. Protocole de rétro-transcription d'ARN viral (Ogorzaly et Gantzer, 2006)

1^{ère} étape de rétro-transcription (volume total 13 µL / tube)	Volume (µL) / tube
dNTP (10mM, 2,5mM de chaque)	1
Amorce antisens (20 µM)	1
Eau DNase RNase free	3,5
Répartir 5,5 µL de milieu réactionnel par tube	
Ajouter 7,5 µL d'extrait par tube	
Incubation : 5 min à 65°C	
2^{ème} étape de rétro-transcription (volume total 20 µL/tube)	Volume (µL) / tube
Tampon 5X	4
DTT 0,1 M	1
RNase inhibitor à 40 U/µL	1
Superscript III à 200 U/µL	1
Ajouter 7 µL de milieu réactionnel par tube	
Incubation : 1 h à 50°C + 15 min à 70°C	

Amorce anti-sens (Proligo-Sigma), dNTPs (Applied Biosystems, réf. N8080260), eau DNase RNase free (Sigma, réf. W4502), tampon 5X (Fischer scientific, réf. M43853), DTT (Fischer scientific, réf. M43853), RNase inhibitor (Promega, réf. N2115), superscript III RT (Fischer scientific, réf. M43853).

3.2.2. PCR en temps réel (qPCR)

L'étape de PCR en temps réel est présentée dans le **tableau 8**. Elle est réalisée dans une plaque de 96 puits (Applied Biosystems, réf. 4366932). La réaction de PCR est effectuée dans le thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems).

Lors des cycles de PCR, un signal fluorescent est émis à chaque synthèse d'un brin d'ADN. Les résultats de détection de fluorescence sont analysés en temps réel avec le logiciel StepOne Software v2.0 (Applied Biosystems), qui va déterminer le cycle seuil de détection de fluorescence (C_T). La valeur de C_T correspond au cycle de PCR à partir duquel la fluorescence est significativement supérieure à la ligne de base.

Tableau 8. Protocole de PCR en temps réel (Ogorzaly et Gantzer, 2006)

Réactif	Concentration initiale	Concentration finale	Volume par puits (μL)
TaqMan Universal Master Mix	2X	1X	12,5
Amorce sens	40 μM	1,04	0,65
Amorce anti-sens	40 μM	1,04	0,65
Sonde	15 μM	0,3	0,5
Eau Rnase-Dnase free			5,7
ADNc			5

Mix TaqMan (Applied Biosystems, réf. 4304437), amorces (Prologo-Sigma), eau RNase DNase free (Sigma, réf. W4502), sonde TaqMan (Applied Biosystems).

4. Détection des bactériophages infectieux dans les prélèvements d'eau et sur les coupons

Pour la détection des bactériophages infectieux sur les coupons, une étape d'élution-concentration est nécessaire. Nous avons choisi de suivre le protocole décrit par Helmi *et al.* (2010). Le concentrat obtenu est alors analysé par la méthode des plages de lyse décrite dans la norme ISO 10705-1 (2001)(paragraphe 1.2.2).

4.1. Elution des bactériophages

Afin d'étudier et de quantifier l'infectiosité des particules virales sur les coupons, il est nécessaire d'éluer les particules virales. Pour cela nous avons utilisé le protocole décrit par Helmi *et al.* (2010)

Les coupons sont récupérés dans 20 mL de tampon d'élution (1% d'extrait de bœuf, Glycine 50 mM, pH 9), puis traités aux ultrasons à raison de deux traitements d'une minute à 20-25 Watts. Les échantillons sont clarifiés par centrifugation à 1500 g pendant 10 minutes à 4°C.

Le pH est ajusté à 7,2 par l'ajout d'HCl 1 M. L'éluat est ensuite conservé à 4°C en attendant l'étape de concentration sur colonne.

4.2. Concentration des virus sur colonne

L'étape de concentration des phages présents dans le tampon d'élution à l'extrait de bœuf est réalisée sur des colonnes Macrosep (PALL Life Sciences). Les éléments constitutifs d'une colonne Macrosep sont présentés sur la **figure 8**.

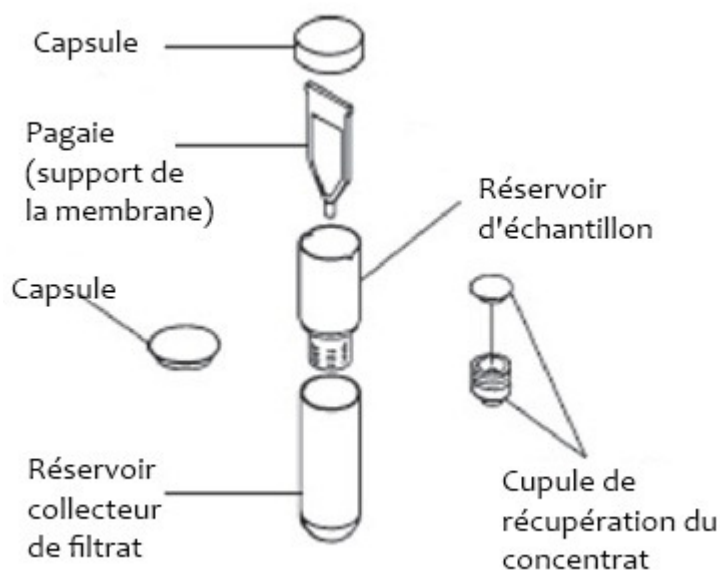


Figure 8. Eléments constitutifs d'une colonne de concentration Macrosep (PALL Life Sciences).

Les 20 mL d'éluat sont concentrés par 2 centrifugations successives à 3 500 g pendant 1 heure à 4°C. Une étape supplémentaire de centrifugation à 3 500 g pendant 15 minutes à 4°C est nécessaire pour obtenir un volume de concentrat inférieur à 2 mL. Le concentrat est récupéré en vissant la cupule de récupération sur le réservoir d'échantillon, puis en centrifugeant la colonne à 3 500 g pendant 2 minutes à 4°C. Le volume de concentrat est complété à 2 mL avec du PBS stérile puis stocké à 4°C. A partir de ce concentrat les phages infectieux sont dénombrés par la méthode des plages de lyse (paragraphe 1.2.2) et le génome viral est quantifié par RT-qPCR (paragraphe 2).

5. Mesure de la taille des particules virales

5.1. Purification des bactériophages

Pour pouvoir étudier la taille des particules virales, il est nécessaire de purifier les phages, préalablement produits, par dialyse. Le protocole a été mis au point par Langlet (2008).

La suspension de phages est répartie dans des tubes à ultracentrifugation (SORVALL WX80, Thermo Scientific, réf. 314348), puis centrifugée à 27 000 g pendant 1 heure, à 4°C (Thermo Scientific). Le surnageant est filtré à l'aide d'un filtre-seringue de porosité 0,22 µm. Le filtrat est déposé dans une membrane de dialyse de 100 kDa (Spectrum Laboratories, réf. 131420), fermée par des pinces. La suspension virale est alors dialysée dans un volume de 20 L d'eau osmosée, pendant 14 heures minimum, sous faible agitation et à 4°C. Une deuxième étape de dialyse est réalisée dans 20 L de NaNO₃ à 1 mM (pH = 6,5 ± 0,5). Après 14 heures minimum d'incubation, sous faible agitation et à 4°C, le contenu de la membrane de dialyse est filtré à l'aide d'un filtre-seringue de porosité 0,22 µm. Le stock de phage ainsi purifié est conservé à 4°C.

5.2. Mesure de la taille des particules virales

Pour réaliser la mesure de taille des particules virales, le titre du stock phagique purifié doit être au minimum de 10¹⁰ UFP/mL. Immédiatement avant la mesure de taille, les stocks phagiques purifiés sont filtrés à nouveau à l'aide de filtres-seringue de porosité 0,22 µm.

La taille des particules est étudiée dans de l'eau du réseau de distribution à différentes valeurs de pH (de 6 à 10, et au pH initial de l'eau du réseau). Les mesures de taille sont effectuées dans le Zeta-Sizer Nano ZS (Malvern Instruments). 1 mL d'échantillon soit 500 µL de suspension phagique filtrée et 500 µL de milieu à étudier sont introduits dans une cuve qui est placée dans le Zeta-Sizer. La mesure est réalisée avec le logiciel DTS (Dispersion Technology Software, Malvern Instruments) selon le protocole décrit par Langlet *et al.* (2008).

6. Dosage du chlore

6.1. Principe du dosage

Le chlore libre est dosé par méthode spectrophotométrique à la N,N-DiéthylPhénylène-1,4 Diamine (DPD) (AFNOR T 90-038, Dosage du chlore libre et du chlore total par la méthode

colorimétrique à la N,N'-diéthylphénylène-1,4 diamine, 1987). La préparation des réactifs nécessaires à ce dosage sont présentés en **annexe 2**. En présence de chlore, la DPD est oxydée, donnant, à un pH compris entre 6,2 et 6,5, une coloration rouge susceptible d'être dosée par colorimétrie en comparaison avec une échelle d'étalon. Nous avons utilisé cette méthode afin de doser le chlore libre. La concentration en chlore libre est obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée comme suit :

Une gamme de dilution d'iodate ioduré est préparée (**Tableau 9**). Cinq mL de solution tampon et 5 mL de DPD sont déposés dans un Erlenmeyer et la totalité de la dilution à tester est ajoutée. Après homogénéisation, l'absorbance de la solution est mesurée immédiatement à $\lambda = 515$ nm. Le blanc du spectrophotomètre est réalisé avec le témoin (équivalent 0 mg/L Cl_2).

Tableau 9. Gamme de dilution d'iodate ioduré à réaliser pour l'étalonnage du dosage du chlore

<i>Equivalent Cl_2</i>	<i>0 mg/L Cl_2</i>	<i>0,3 mg/L Cl_2</i>	<i>0,5 mg/L Cl_2</i>	<i>1 mg/L Cl_2</i>	<i>1,5 mg/L Cl_2</i>	<i>2 mg/L Cl_2</i>	<i>2,5 mg/L Cl_2</i>
Iodate ioduré (mL)	0	3	5	10	15	20	25
Eau ultra-pure (mL)	50	47	45	40	35	30	25
H_2SO_4 2N (mL)	1	1	1	1	1	1	1
	Attendre une minute (formation de I_3^-)						
NaOH 2N (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Eau ultra-pure	Compléter à 100 mL						

6.2. Dosage du chlore libre

La verrerie est nettoyée au préalable à l'eau de javel puis rincée abondamment à l'eau ultra-pure, afin d'éliminer toute matière organique susceptible d'interférer dans le dosage.

250 μL de solution tampon et 250 μL de DPD sont déposés dans un tube en verre. 5 mL d'échantillon à doser sont introduits dans le tube. Après agitation au vortex, l'absorbance de la solution à $\lambda = 515$ nm est lue immédiatement. Le blanc du spectrophotomètre est réalisé en remplaçant l'échantillon par 5 mL d'eau ultra-pure. Si besoin est, l'échantillon à doser est dilué dans de l'eau ultra-pure (volume final de 5 mL) afin de rester dans la limite de détection

de la méthode (de 0,03 à 5 mg/L de Cl_2). L'échantillon doit se trouver dans une gamme de pH comprise entre 6,2 et 6,5.

7. Présentation du réacteur Propella™

Le réacteur Propella™ a été développé conjointement par Nancy Université (Nancy, France) et le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) pour conduire des travaux de recherche sur les biofilms d'eau potable. Il consiste en une colonne de 50 cm élaborée afin de mimer une canalisation et dans le but d'étudier l'équilibre chimique et biologique s'établissant avec le temps dans un système de distribution d'eau. Ce type de réacteur permet de simuler le flux d'eau dans une canalisation mais à l'échelle du laboratoire. Une photographie du réacteur Propella™ est présentée sur la **figure 9**.

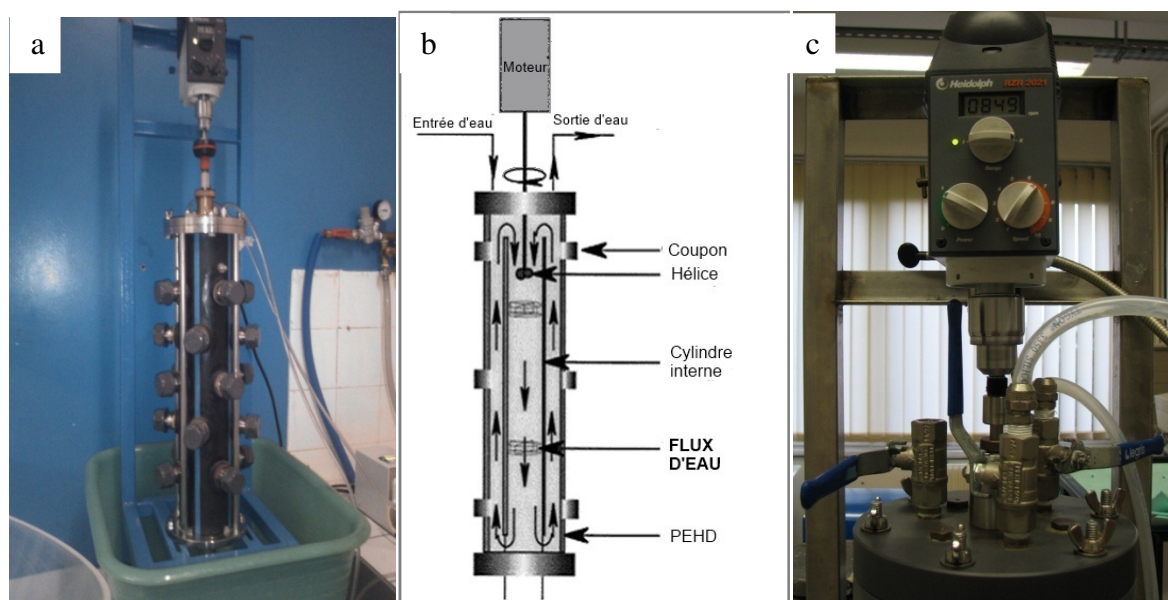


Figure 9. Photographie d'un Propella™ (a), représentation schématique (b) et moteur de l'hélice (c).

Ce réacteur est constitué d'une colonne en PEHD de 2 L, possédant 20 loges pour accueillir des coupons. Un système d'entrée et de sortie d'eau est placé sur la partie supérieure. Une hélice placée au centre de la colonne permet le mouvement de l'eau dans le réacteur, sa vitesse est réglée à l'aide d'un moteur paramétrable (**Figure 9c**). Pour la formation du biofilm, le réacteur est alimenté en eau à un débit de 0,16 L/heure, la vitesse de rotation de l'hélice est fixée à 840 tours/min. Les coupons (Xénard Mécanique de Précision) ont une

surface convexe de 2 cm² et un diamètre de 1,6 cm. Les coupons utilisés dans nos travaux sont constitués de trois matériaux :

- Inox 316L, utilisé pour des structures en contact avec l'alimentation. Le « L » dans la désignation signifie faible teneur en carbone (<0,03% de la masse totale) ce qui réduit les possibilités de corrosion.
- PVC, polychlorure de vinyle qui est un matériau utilisé dans les réseaux de distribution d'eau potable.
- PEHD, polyéthylène haute densité « bande bleue », qui est également un matériau utilisé dans les réseaux de distribution d'eau potable.

Avant chaque expérimentation, les coupons ainsi que les réacteurs Propella™ subissent un protocole de nettoyage à l'aide de RBS® 25 MD à 2% (VWR, réf. 148-0552) pendant 20 minutes à température ambiante suivie de 6 étapes de rinçage à l'eau du robinet et d'un séchage à l'air libre.

8. Protocoles expérimentaux

Les Propella™ sont reliés au système de distribution d'eau de la CUGN (Communauté urbaine du Grand Nancy) et laissés en circulation jusqu'à obtenir un biofilm jeune, de trois à cinq mois. Le jour de l'expérimentation, l'entrée et la sortie d'eau des Propella™ sont coupées. Les réacteurs sont placés en position « batch ». Les deux phages ARN F-spécifiques MS2 et Q β sont inoculés dans l'eau des réacteurs à une concentration finale de 10⁶ UFP/mL chacun. Dans un premier temps, les virus présents dans l'eau sont laissés en contact avec les surfaces du réacteur, dont le moteur est maintenu en marche afin de maintenir le flux d'eau au sein de la colonne, pendant une durée déterminée afin de permettre l'adsorption des virus sur les surfaces en conditions dynamiques. Dans un second temps, le prélèvement des coupons permet de déterminer la concentration phagique surfacique en fonction de diverses conditions expérimentales (paragraphe 7.1) ou d'évaluer l'efficacité d'un protocole de nettoyage par chloration de l'eau (paragraphe 7.2).

8.1. Etude de l'influence du matériau et de la colonisation par un biofilm sur l'adhésion de deux bactériophages

Les expérimentations sont réalisées dans deux réacteurs Propella™ alimentés pendant trois mois en eau du réseau de distribution et placés dans une pièce climatisée à 19°C. Le premier réacteur est équipé de coupons en inox 316L, le deuxième réacteur contient des coupons en PVC. Chaque réacteur contient 20 coupons répartis sur cinq niveaux.

24 heures avant l'inoculation phagique, le réacteur est vidé et la moitié des coupons sont récupérés afin de procéder à l'analyse du biofilm sur les surfaces. Les coupons sont remplacés par des coupons dits « abiotiques » par comparaison à ceux ayant séjournés dans le réacteur durant 3 mois. L'eau est remise dans le réacteur et le système est reconnecté au réseau de distribution d'eau. Le lendemain, le système est placé en position batch et les deux phages sont inoculés à une concentration finale de 10^6 UFP/mL. Le moteur de l'hélice est maintenu en marche. 1 mL de milieu est récupéré afin de déterminer la concentration phagique initiale. Après 4 heures, 1 mL d'eau ainsi que les coupons « abiotiques » et colonisés par un biofilm sont récupérés. L'analyse de la concentration phagique dans l'eau ainsi que sur les surfaces se fait par la méthode de RT-qPCR décrite dans le paragraphe 2.

8.2. Evaluation de l'efficacité d'un nettoyage par chloration

Les expérimentations sont réalisées dans deux réacteurs Propella™ équipés de coupons de PEHD et alimentés par de l'eau du réseau de Nancy. Un des réacteurs présente à sa surface un biofilm de 3 mois, le second un biofilm de 5 mois.

Les bactériophages sont inoculés dans le réacteur à une concentration finale de 10^6 UFP/mL, 1 mL de milieu est récupéré afin de déterminer la concentration virale initiale. Le système est remis en marche en position batch pendant 4 heures. Cette étape est réalisée afin d'obtenir une adhésion initiale de chaque virus sur le biofilm. 1 mL d'eau est récupéré ainsi que la moitié des coupons. Une chloration à l'hypochlorite de sodium (Richet, réf. EMB 02737) est ensuite effectuée à 5 mg/L pendant 30 minutes.

Le chlore résiduel présent dans le réacteur est régulièrement dosé pendant le temps de chloration par la méthode décrite dans le paragraphe 5. Après 30 minutes, 1 mL d'eau ainsi que l'autre moitié des coupons sont prélevés. Le chlore résiduel est alors neutralisé avant analyse par ajout d'une solution de thiosulfate de sodium (Prolabo, réf. 27 909.296) à raison de deux moles de thiosulfate pour une mole de chlore théorique initial. Les coupons subissent

une étape d'élution-concentration décrite dans le paragraphe 3. Le concentrat est alors analysé par RT-qPCR ainsi que par la méthode des plages de lyse afin de déterminer les concentrations en génome viral et en phages infectieux présents sur les surfaces. Un schéma (**Figure 10**) résume les différentes étapes citées ci-dessus.

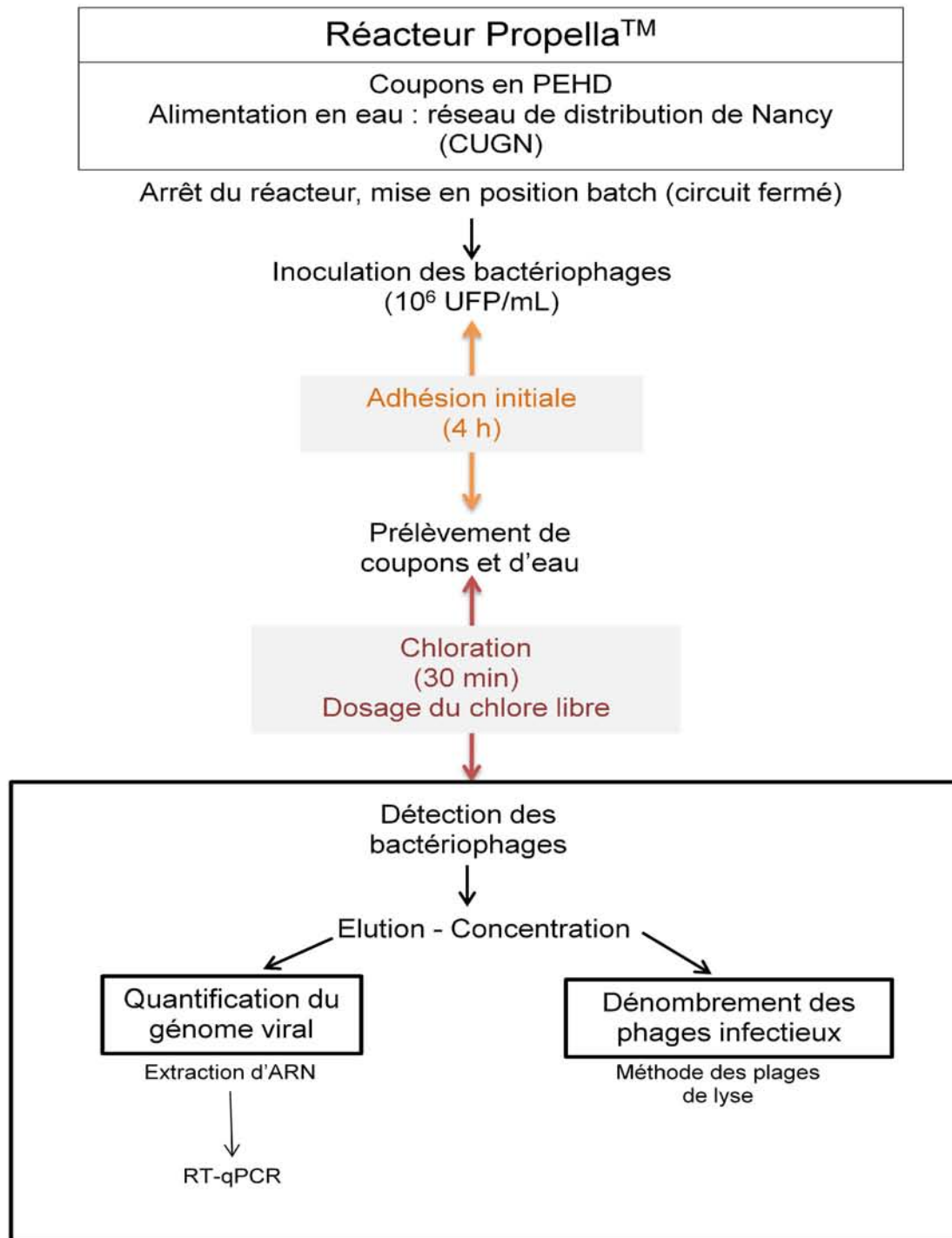


Figure 10. Schéma général des expérimentations effectuées en réacteur Propella™ pour l'évaluation de l'efficacité d'un nettoyage par chloration.

9. Etude du biofilm

9.1. Marquage direct des coupons au SYBR Green II

Après le prélèvement, les coupons sont mis à sécher sous une hotte à flux laminaire. Une étape de fixation est ensuite effectuée à l'air chaud (deux fois 30 s). 140 µl d'une solution de SYBR Green II à 0,1 µL/mL sont déposés en goutte à goutte sur toute la surface du coupon. On procède ensuite à une incubation de 15 min à l'obscurité à température ambiante ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Un témoin négatif (coupon nu) est préparé en parallèle dans les mêmes conditions. La solution de SYBR Green II est retirée de la surface par renversement, trois lavages sont effectués par immersion dans des bains d'eau apyrogène. Les coupons sont séchés cinq minutes à l'air libre puis à l'air chaud si nécessaire. Les coupons sont prêts à être observés avec un lecteur de plaques (Tecan Infinite M200) à température ambiante ($22\text{-}25^{\circ}\text{C}$). Les coupons sont également observés au microscope à épifluorescence (objectif x10).

9.2. Comptage cellulaire après sonication

Le coupon est immergé dans un pilulier en plastique stérile contenant 25 mL d'eau stérile apyrogène (B-Braun, réf. 0066571E) puis soumis à l'action des ultrasons (VibraCell ; puissance de 10 W), pendant deux fois 1 minute. Les échantillons sont ensuite marqués au SYBR Green II. Pour cela, 2 µL de la solution mère de SYBR Green II sont ajoutés à 10 mL d'échantillon d'eau. Le marquage s'effectue pendant 30 min à l'obscurité à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. L'échantillon est ensuite filtré sur une membrane en polycarbonate de porosité 0,2 µm et de 47 mm de diamètre (Millipore, GTBP04700) en conditions stériles. Après filtration, la membrane est rincée par 100 mL d'eau apyrogène puis déposée sur une lame porte-objet. La membrane est séchée à l'air ambiant puis observée au microscope à épifluorescence (objectif x100).

9.3. Observation au microscope à épifluorescence

L'excitation est réalisée avec une lampe UV à 488 nm. Les microorganismes dont l'ADN/ARN a fixé le SYBR Green II fluorescent dans le vert (515 nm) lorsqu'ils sont excités avec une lumière bleue (488 nm).

Pour l'observation, une goutte de glycérine tamponnée est déposée entre la lame et une lamelle couvre-objet pour réhydrater la membrane. Les bactéries sont dénombrées sur la

surface du champ entier. Le nombre de champs comptés par membrane est adapté en fonction du nombre de cellules présentes par champ:

- Nombre de cellules <5 : lecture de la dilution précédente
- $5 < \text{Nombre de cellules} < 30$: lecture de 30 champs
- $30 < \text{Nombre de cellules} < 70$: lecture de 20 champs
- Nombre de cellules >70 : lecture de la dilution suivante

Le résultat est exprimé en cellules/cm² de coupon.

Résultats

1- Etalonnage des méthodes de détection génomique des bactériophages

Avant d'effectuer les gammes étalon des phages étudiés, un contrôle de la pureté des suspensions phagiques est effectué par RT-PCR en temps réel afin de vérifier que chaque suspension de travail ne contient qu'un seul bactériophage. Après cela, une droite étalon est réalisée pour chaque bactériophage, pour permettre la quantification de MS2 et Q β lors des expérimentations. Chaque suspension est tout d'abord titrée par la méthode des plages de lyse puis une série de dilutions au dixième est effectuée, extraite et analysée par RT-PCR en temps réel. Ceci permet d'obtenir une valeur de C_T (cycle de PCR à partir duquel la fluorescence émise est significativement supérieure à la ligne de base) en fonction d'une quantité initiale en bactériophages infectieux, exprimée en équivalent Unité Formant Plaque (UFP). La droite étalon nous apporte plusieurs informations :

- La pente** qui permet d'estimer l'efficacité (E) ou rendement de PCR, celle-ci doit être comprise entre 75% et 125%.
- Le coefficient de détermination R²** qui doit être supérieur à 0,99.
- La sensibilité** qui correspond à la dernière dilution où tous les réplicats sont encore positifs.
- Le seuil de détection** correspondant à la dilution pour laquelle un réplicat est positif.
- La zone de linéarité** qui doit s'étendre sur au moins 4 log₁₀ à partir du seuil de détection.

Pour chaque stock viral, une droite étalon est réalisée puis analysée en triplicat. Un exemple de droites obtenues est présenté sur la **figure 11**.

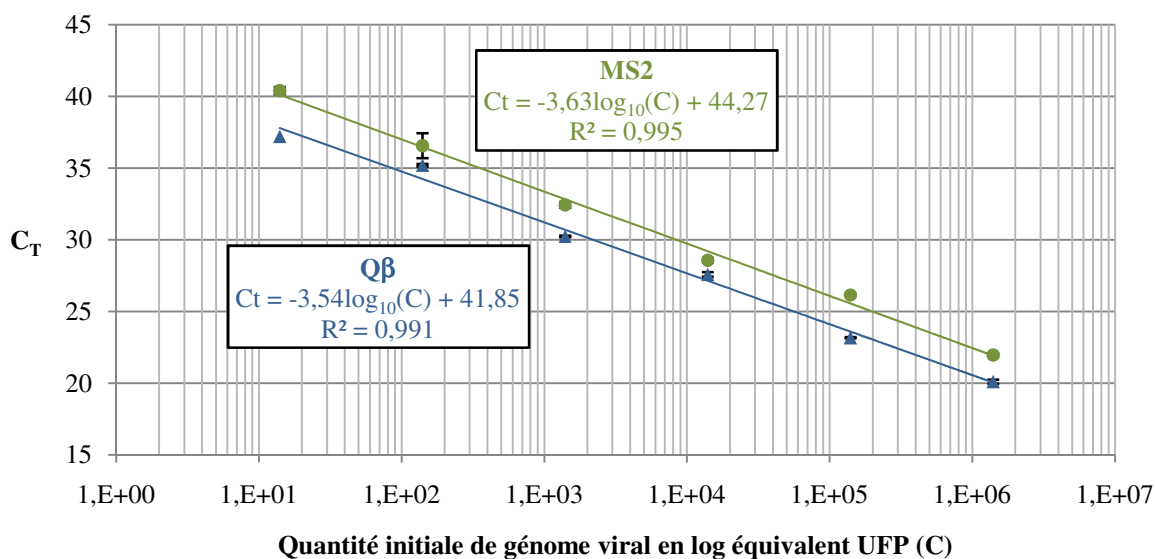


Figure 11. Gammes étalon réalisées à partir des suspensions stock des bactériophages MS2 et Qβ (UFP : Unité Formant Plaque), n=3 pour chaque droite.

La pente de chaque droite étalon permet de déterminer le rendement (E) de la PCR temps réel selon la formule de l'équation ci-dessous.

$$E = (10^{-1/\text{pente}} - 1) \times 100$$

Les valeurs de pente sont de -3,63 et -3,54 pour les phages MS2 et Qβ respectivement. D'après ces valeurs, les rendements des RT-PCR temps réel sont compris entre 89 et 92 %. Les valeurs des coefficients de détermination (R^2) sont de 0,991 et 0,995. Les domaines de linéarité obtenus s'étendent sur 5 $\log_{10}$, c'est-à-dire sur des quantités initiales comprises entre 10 et 1.10^6 équivalents UFP. La sensibilité et la limite de quantification par RT-PCR en temps réel sont de l'ordre de 10 équivalent UFP par réaction de RT-qPCR dans nos conditions de travail. Ces droites remplissent tous les critères nécessaires à la validation d'une droite étalon par RT-qPCR. Le calcul des concentrations phagiques sera effectuée à partir des paramètres de ces droites, une droite étant systématiquement effectuée pour chaque nouveau stock de phages MS2 et Qβ.

En résumé, les droites étalons obtenues sont exploitables car :

- Les valeurs de rendement (E) obtenues sont systématiquement comprises entre 75 et 125%.
- Les coefficients de détermination sont tous supérieurs à 0,99

- La sensibilité ainsi que la limite de détection sont de 10 équivalents UFP pour chaque réaction de RT-qPCR.

A partir des équations obtenues pour chaque phage et chaque nouveau stock, il sera possible, de calculer la concentration phagique dans l'eau (par mL) ou sur les coupons (par cm^2).

2. Mesure de taille des particules phagiques dans l'eau

Des mesures de taille des phages MS2 et Q β sont réalisées afin de déterminer s'ils sont à l'état de particules isolées ou agrégées lors de nos expérimentations.

Les mesures sont réalisées dans de l'eau du réseau de distribution de sorte à se trouver dans une situation proche de celle créée dans les réacteurs. Ces mesures sont effectuées pour des valeurs de pH allant de 6 à 10 ainsi qu'au pH de l'eau du réseau de distribution de la CUGN soit 8,2. Le logiciel d'analyse des données (DTS) indique la taille des particules constituant la population majoritaire. Dans notre cas, cette population majoritaire représente 96 à 100 % des particules détectées.

La **figure 12** présente les valeurs de taille (en nm) obtenues lors de deux analyses effectuées en triplicat ($n = 2 \times 3$).

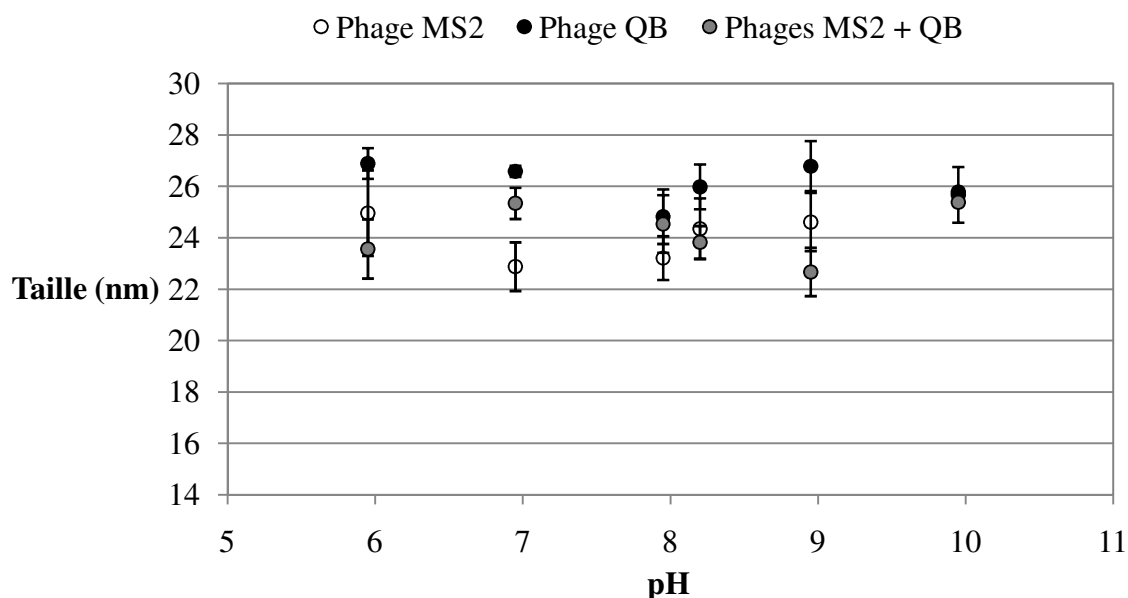


Figure 12. Mesure de la taille des particules phagiques dans de l'eau de distribution pour les phages MS2 et Q β analysés séparément ainsi que pour un mélange des deux phages.

La taille moyenne des particules virales est respectivement de $23,6 \pm 1,2$ nm et $26,0 \pm 0,6$ nm pour les phages MS2 et Q β lorsque ceux-ci sont analysés individuellement. Globalement la taille des particules virales est plutôt homogène et conforme aux données retrouvées dans la littérature. Aucun phénomène d'agrégation n'est observé dans ces conditions.

Lors de nos expérimentations les deux phages sont inoculés en même temps dans l'eau. Deux types de particules virales (MS2 et Q β) sont alors présentes dans le système. C'est pourquoi une analyse de la taille des particules d'un mélange de ces deux virus est réalisée dans de l'eau du réseau. La **figure 12** présente les valeurs de taille (en nm) obtenues lors d'une analyse effectuée en triplicat ($n = 3$) pour les deux phages présents simultanément en suspension. La taille moyenne des particules est de $23,9 \pm 0,7$ nm, ce qui correspond à la taille moyenne d'une particule phagique isolée.

L'ensemble des valeurs obtenues sur les suspensions de phages analysées séparément ou simultanément indique que la taille de plus de 96% des particules virales présentes dans les milieux analysés correspond à celle de particules isolées. De plus, pour la mesure de taille, la concentration virale nécessaire dans l'eau est de 10^{10} UFP/mL, or les expérimentations d'adhésion et de nettoyage au sein des réacteurs Propella™ ont été effectuées à 10^6 UFP/mL. Il est donc possible de faire l'hypothèse que dans nos conditions de travail en réacteur Propella™, les virus inoculés dans l'eau se trouvent à l'état de particules isolées. Ainsi l'adhésion des virus aux surfaces ou l'efficacité de la chloration ne seront pas modifiées par la présence d'agrégats de particules phagiques.

3. Etude du comportement des phages au sein de réacteurs Propella™ colonisés par des biofilms de trois mois

3.1. Analyse macroscopique et microscopique du biofilm

La colonne Propella™ permet de disposer de 20 coupons. La moitié des coupons sont en place dans les réacteurs depuis trois mois, l'autre moitié a été mise en place la veille de l'expérimentation afin d'obtenir des coupons « abiotiques » considérés comme témoins, tout en gardant à l'esprit que le dépôt des particules en suspension dans l'eau survient très rapidement et qu'en 24 heure la surface ne peut plus être considérée comme totalement

abiotique. Une photographie de coupons d'inox « abiotiques » ou colonisés par un biofilm de trois mois sont présentés sur la **figure 13**.

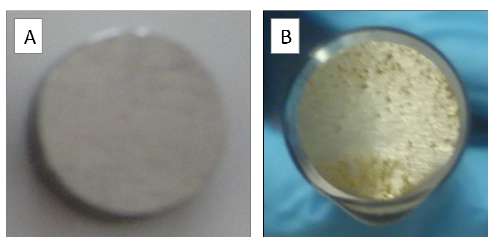


Figure 13. Vue macroscopique de coupons d'inox « abiotique » (A) ou après un temps de séjour de trois mois dans le pilote (B).

Après un séjour de trois mois au sein de la colonne Propella™, la surface du coupon est salie par une substance visqueuse appelée « biofilm », composé d'amas bactériens et probablement d'un dépôt d'oxydes de fer assez important, conférant au dépôt sa couleur orangée. La surface des coupons en place depuis 24 heures est quand à elle macroscopiquement « propre ».

Afin d'avoir un aperçu microscopique, une coloration est effectuée au SYBR Green II suivie d'une observation du coupon au microscope à épifluorescence (**Figure 14**).

Les coupons placés dans le réacteur Propella™ depuis 24 heures (coupons témoins) sont « salis », colonisés, par de petits amas cellulaires isolés sans structure en trois dimensions (**Figure 14 A**). Par contre, on distingue nettement la structuration du biofilm de trois mois en comparaison à celui de 24 heures. En effet, la coloration au SYBR Green II montre la présence d'une biomasse structurée en trois dimensions, composée d'amas plus ou moins gros ainsi que de portions de surfaces moins occupées par la biomasse (**Figure 14 B**). Des résultats similaires sont obtenus sur les coupons en PVC. A noter cependant que l'auto-fluorescence de ce matériau après marquage au SYBR Green II est importante, ce qui rend l'observation directe plus compliquée que sur inox 316L. La biomasse présente sur la surface PVC après trois mois de contact avec l'eau présente une structure plus dense, il semble y avoir moins de gros amas et plutôt des petits amas cellulaires regroupés dans des « rayures » probablement créés lors de l'usinage.

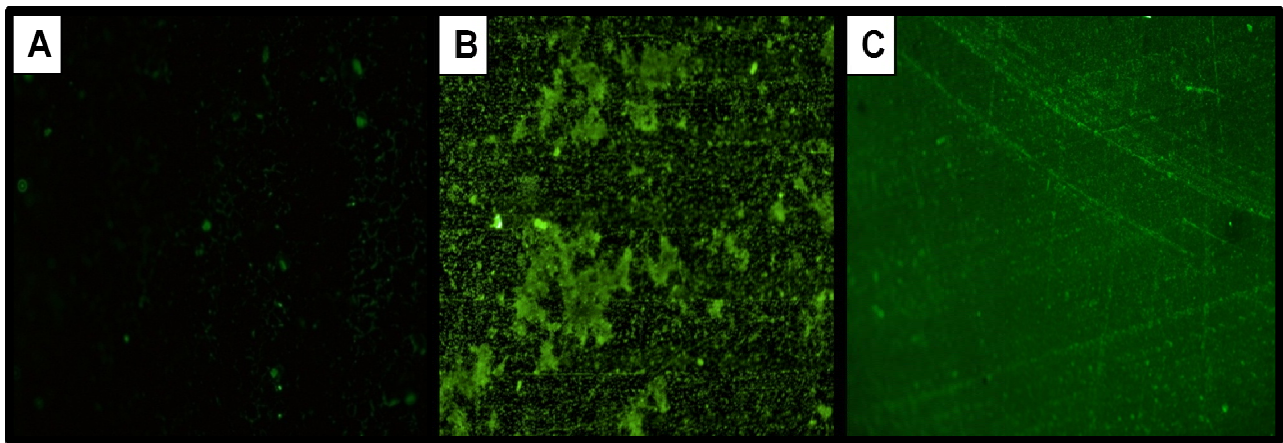


Figure 14. Marquage direct au SYBR Green II d'un coupon d'inox 316L après un temps de séjour dans le pilote de 24h (A) et trois mois (B) ainsi que d'un coupon de PVC présentant un biofilm de trois mois (C). Grossissement $\times 10$.

L'estimation de la densité bactérienne est réalisée au microscope à épifluorescence après sonication et filtration de l'échantillon sur une membrane en polycarbonate. Ces observations sont réalisées sur les coupons « abiotiques » mais également sur les coupons colonisés par un biofilm de trois mois. La densité bactérienne obtenue sur les coupons en inox 316L est de $2,5 \cdot 10^7 \pm 2,4 \cdot 10^4$ cellules/cm², ce qui n'est pas différent de la colonisation bactérienne retrouvée sur les coupons de PVC qui atteint $2,5 \cdot 10^7 \pm 6,9 \cdot 10^6$ cellules/cm². Le marquage des cellules sur les coupons mis en place 24 heures avant l'expérimentation aboutit à $5,3 \cdot 10^6 \pm 7,7 \cdot 10^5$ cellules/cm² dispersées sur les surfaces en inox 316L et $1,5 \cdot 10^7 \pm 3,9 \cdot 10^6$ cellules/cm² sur les surfaces en PVC.

Les coupons ayant séjourné trois mois dans la colonne Propella™ présentent clairement à leur surface une structure appelée biofilm, visible macroscopiquement et microscopiquement. L'aspect microscopique des biofilms formés sur PVC est différent de ceux formés sur inox 316L cependant, nous n'avons pas noté de différence en termes de densité bactérienne présente à la surface des deux matériaux.

3.2. Suivi de la concentration phagique dans l'eau

Des mesures de la concentration en phage MS2 et Q β dans l'eau sont effectuées par RT-qPCR, immédiatement après inoculation des virus dans le réacteur et à la fin de l'expérimentation (4h). Ces mesures ont pour objectif de voir si la concentration virale reste stable dans le système durant l'expérimentation, ou si elle diminue. Une augmentation de la concentration phagique est très peu probable puisque les bactériophages ARN F-spécifiques

sont théoriquement incapables de se reproduire dans nos conditions expérimentales. Les valeurs obtenues sont présentées sur la **figure 15**.

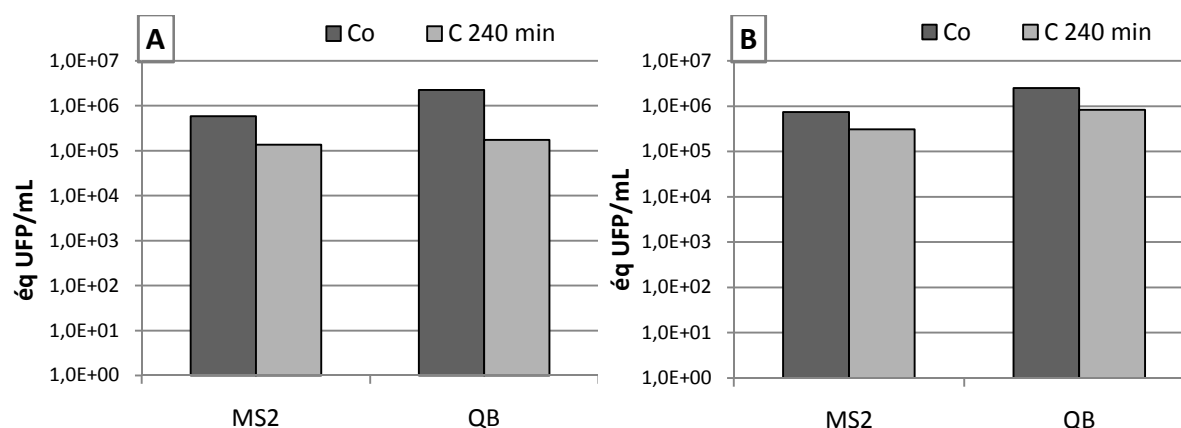


Figure 15. Analyse de la concentration en phage MS2 et Qβ dans l'eau après inoculation et après quatre heures de contact avec les Propella™, équipés de coupons en inox 316L (A) et PVC (B), (n=2).

Une diminution de la concentration phagique dans l'eau est observée dans les deux types de réacteurs Propella™ et pour les deux phages analysés, après 4 heures d'expérimentation dans le réacteur en position « batch ». Dans le réacteur équipé de coupons en inox 316L, une diminution de la concentration virale, d'un facteur 4, est observée pour le phage MS2 tandis que la diminution en concentration pour le phage Qβ est d'un facteur 13. Au sein du réacteur équipé de coupons en PVC des diminutions d'un facteur 2 pour le phage MS2 et 3 pour le phage Qβ sont observées. Ainsi, la diminution de concentration phagique est systématiquement plus importante pour Qβ que pour MS2. On note que la différence de concentration entre le début et la fin des expérimentations est plus importante dans le réacteur équipé de coupons en inox 316L par rapport à celui équipé de coupons en PVC. Étant donné que durant les 4 heures de contact le système est clos, la diminution de la concentration phagique dans l'eau est due soit à la dégradation des phages, soit à l'adsorption des phages sur les surfaces des colonnes Propella™, qui serait plus importante dans le réacteur équipé de coupons d'inox 316L que sur le PEHD. L'analyse des coupons va permettre de différencier ces deux phénomènes.

Les principales observations sont :

- *Une diminution de la concentration phagique dans l'eau est observée dans les deux types de réacteurs Propella™ et pour les deux phages à la fin de quatre heures d'expérimentation.*
- *Pour les deux phages la diminution de concentration est plus importante dans le réacteur équipé de coupons en inox 316L.*
- *La diminution en bactériophage Q β est systématiquement plus importante que celle en bactériophage MS2.*

3.3. Analyse de la concentration virale sur les coupons

Afin de suivre la concentration en phages présents sur les surfaces, des coupons sont prélevés après quatre heures de contact avec l'eau contenant les deux phages à une concentration de 1.10^6 UFP/mL. L'adhésion des phages aux surfaces est théoriquement non spécifique puisque l'adhésion spécifique ne survient que lorsque les bactéries synthétisent des F-pilis ce qui se produit majoritairement à une température de l'ordre de 37°C. Ainsi, les phages sont théoriquement incapables de se multiplier dans nos conditions expérimentales, les densités phagiques détectées sont donc bien la résultante d'un transfert des particules virales de la phase aqueuse vers la surface. Les coupons étant rincés deux fois, nous pourrions faire l'hypothèse que les phages détectés sont réellement adsorbés sur leur surface.

Les coupons en Inox 316L et en PVC sur lesquels sont recherchés les bactériophages comportent pour la moitié d'entre eux un biofilm d'eau potable de trois mois à leur surface. L'autre moitié des coupons est considéré comme « abiotique » car placée dans le réacteur la veille de l'expérimentation. Les analyses de concentration virale sont effectuées par RT-qPCR afin d'obtenir une détection spécifique de chaque phage MS2 et Q β . Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 16**.

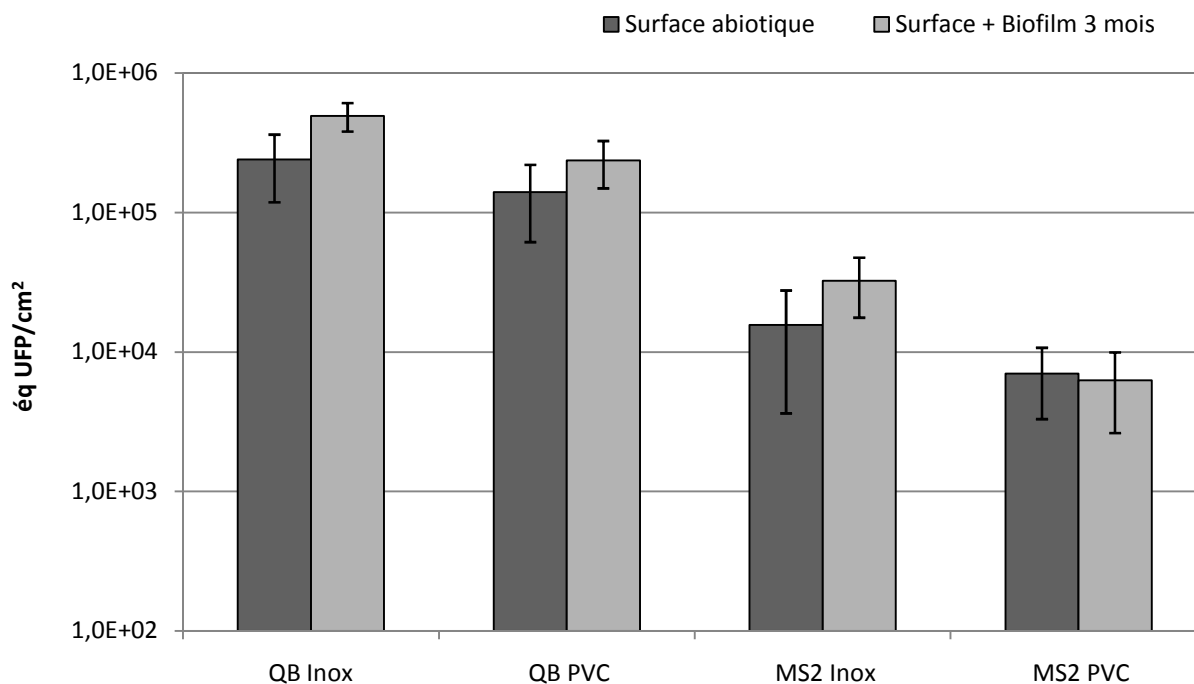


Figure 16. Concentrations en bactériophages MS2 et Qβ mesurées sur les coupons d'inox 316L et de PVC, après quatre heures, pour des coupons mis en place depuis 24h dits « abiotiques » (n=10) et des coupons présentant un biofilm de trois mois (n=10).

Plusieurs informations peuvent être obtenues par l'analyse de ce graphique.

Tout d'abord, si l'on compare l'adsorption virale des deux phages étudiés (MS2 et Qβ), leur adsorption est significativement différente ($0,001 < p < 0,003$, $\alpha = 0,05$ Mann-Whitney) quelles que soit la nature du matériau (PVC ou Inox 316L) et le niveau de colonisation de la surface par un biofilm d'eau potable. En effet, la concentration surfacique est toujours plus importante pour Qβ que pour MS2. A titre d'exemple, sur inox 316L dit « abiotique » la concentration mesurée est respectivement de $1,6 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^4$ pour MS2 et $2,4 \cdot 10^5 \pm 1,2 \cdot 10^5$ eq UFP/cm² pour Qβ. La densité surfacique du phage Qβ est ainsi 15 fois plus importante que celle du phage MS2 et correspond à la plus petite différence retrouvée lors des différentes conditions testées. La différence de densité surfacique la plus importante est mesurée sur PVC colonisé par un biofilm de trois mois, le phage Qβ présente alors une concentration 38 fois plus importante que celle de MS2 sur les coupons.

La deuxième observation pouvant être faite est que la présence de biofilm augmente de deux fois en moyenne la concentration virale retrouvée sur les surfaces. En effet, les concentrations en phage MS2 pour les coupons en inox 316L sont de $1,6 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^4$ pour des coupons « abiotiques » et $3,3 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^4$ eq UFP/cm² pour des coupons colonisés par un biofilm de trois mois. La densité surfacique en phage Qβ passe de $1,4 \cdot 10^5 \pm 7,9 \cdot 10^4$ à

$2,4.10^5 \pm 8,8.10^4$ éq UFP/cm² sur du PVC « abiotique » et colonisé par un biofilm. L'augmentation du nombre de particules virales adsorbées en présence de biofilm est significative ($0,016 < p < 0,032$), excepté pour le bactériophage MS2 sur PVC ($p = 0,71$).

Concernant l'impact du type de matériau, les concentrations pour un phage donné peuvent être considérées comme équivalentes sur les coupons abiotiques (MS2 : $p=0,073$ et Q β : $p=0,149$). En effet, les concentrations en phage MS2 sont de $1,6.10^4 \pm 1,2.10^4$ et $7,0.10^3 \pm 10^3$ éq UFP/cm² sur inox 316L et PVC respectivement, et celles du phage Q β sont de $2,4.10^5 \pm 1,2.10^5$ et $1,4.10^5 \pm 7,9.10^4$ éq UFP/cm² respectivement. Par contre, en présence d'un biofilm de trois mois, les concentrations en phages ne sont pas équivalentes pour les deux matériaux. En effet, pour MS2 la concentration virale retrouvée sur le biofilm d'inox 316L est significativement plus importante que celle retrouvée sur le biofilm formé sur le PVC ($p=0,003$), la densité surfacique est respectivement de $3,3.10^4 \pm 1,5.10^4$ et $6,3.10^3 \pm 3,6.10^3$ éq UFP/cm². Il en est de même pour le phage Q β ($p=0,003$) les concentrations mesurées sont alors de $4,9.10^5 \pm 1,4.10^5$ et $2,4.10^5 \pm 8,8.10^4$ éq UFP/cm² sur les biofilms formés sur l'inox et le PVC.

Les principales conclusions pouvant être extraites de ces résultats sont :

- *Pour deux phages appartenant à la même famille, les concentrations détectées à la surface des coupons colonisés ou non par un biofilm diffèrent. La concentration surfacique mesurée est toujours significativement plus importante pour le phage Q β que pour MS2.*
- *En l'absence de biofilm, les concentrations observées sur inox 316L et PVC pour un phage donné sont équivalentes.*
- *En présence de biofilm, la concentration virale est généralement augmentée par comparaison avec les surfaces « abiotiques ».*
- *En présence d'un biofilm, quel que soit le phage considéré, les concentrations sont plus importantes sur inox 316L que sur PVC.*

Globalement l'analyse de ces résultats permet de répondre aux hypothèses formulées dans le paragraphe 3.1. La diminution de la concentration en phages dans la phase aqueuse est en adéquation avec la quantité de phages MS2 et Q β retrouvée sur les surfaces, à savoir une adsorption de Q β en plus grande quantité que MS2 et une adsorption des deux phages plus importantes dans le réacteur équipé de coupons en inox 316L.

4. Impact de la chloration sur l'infectiosité et la détection génomique des phages

Une évaluation de l'efficacité d'un protocole de nettoyage par chloration est effectuée sur des réacteurs Propella™ équipés de coupons en polyéthylène haute densité (PEHD) bande bleue colonisés par des biofilms de trois et cinq mois. Les phages sont inoculés dans l'eau à une concentration initiale de 1.10^6 UFP/mL et laissés en contact dans le réacteur en position « batch » durant 4 heures afin de permettre une adhésion virale suffisante sur les surfaces. Une solution d'hypochlorite de sodium est introduite dans les réacteurs à une concentration de 5 mg/L pendant 30 minutes. La concentration en chlore libre dans les réacteurs est suivie durant les 30 minutes et l'abattement viral est analysé dans l'eau ainsi que sur les coupons en termes de génome et d'infectiosité. En raison du nombre de coupons disponibles aucune analyse du biofilm n'a pu être effectuée.

4.1. Etablissement d'une droite étalon pour le dosage du chlore

Lors de nos expérimentations visant à évaluer un protocole de nettoyage en réacteur, la concentration en chlore libre est dosée au cours du temps par la méthode à la N,N-DiéthylPhénylène-1,4 Diamine (DPD). Ceci permet d'estimer la consommation en chlore par le réacteur au cours de chaque expérimentation.

La concentration en chlore est estimée à partir d'une droite étalon (**Figure 17**) qui permet de relier la concentration en chlore (mg/L) à la densité optique ($\lambda = 515$ nm) mesurée après traitement de l'eau à la DPD.

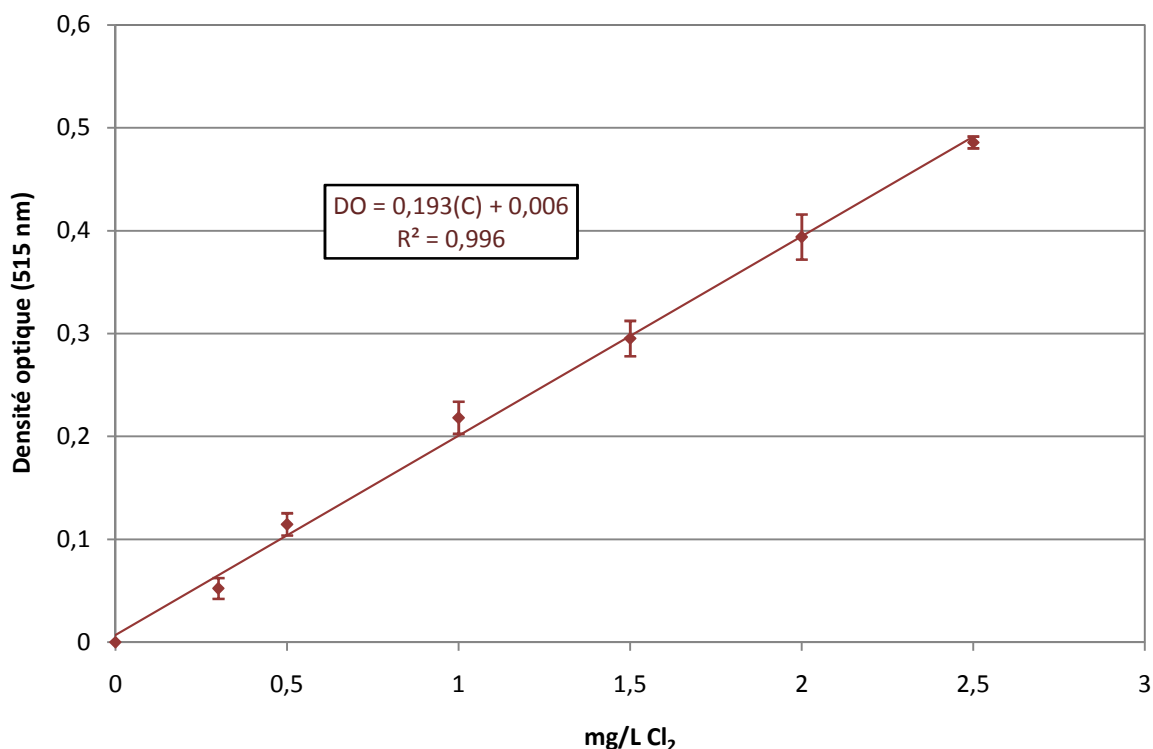


Figure 17. Droite étalon utilisée pour le dosage du chlore libre à la DPD (N,N-DiéthylPhénylène-1,4 Diamine) (n=3).

Une relation linéaire entre la valeur de densité optique et la concentration en chlore est obtenue pour des concentrations inférieures ou égales à 2,5 mg/L sur 6 mesures effectuées en triplicat. La concentration initiale en chlore étant de 5 mg/L de chlore libre, les prélèvements d'eau seront dilués au 1/2 afin de se situer dans la zone de linéarité de la droite étalon.

4.2. Suivi de la concentration en chlore dans le système

Après ajout de chlore dans l'eau des réacteurs Propella™, celui-ci réagit avec la biomasse présente dans le système et notamment avec le biofilm. De ce fait, une diminution de la concentration en chlore au cours de l'expérimentation est attendue. Un dosage du chlore libre présent dans l'eau est effectué tout au long des trente minutes d'expérimentation. Les concentrations mesurées dans l'eau des réacteurs Propella™ sont présentées sur la **figure 18**. Pour chaque temps d'analyse, le dosage du chlore est réalisé en duplicat.

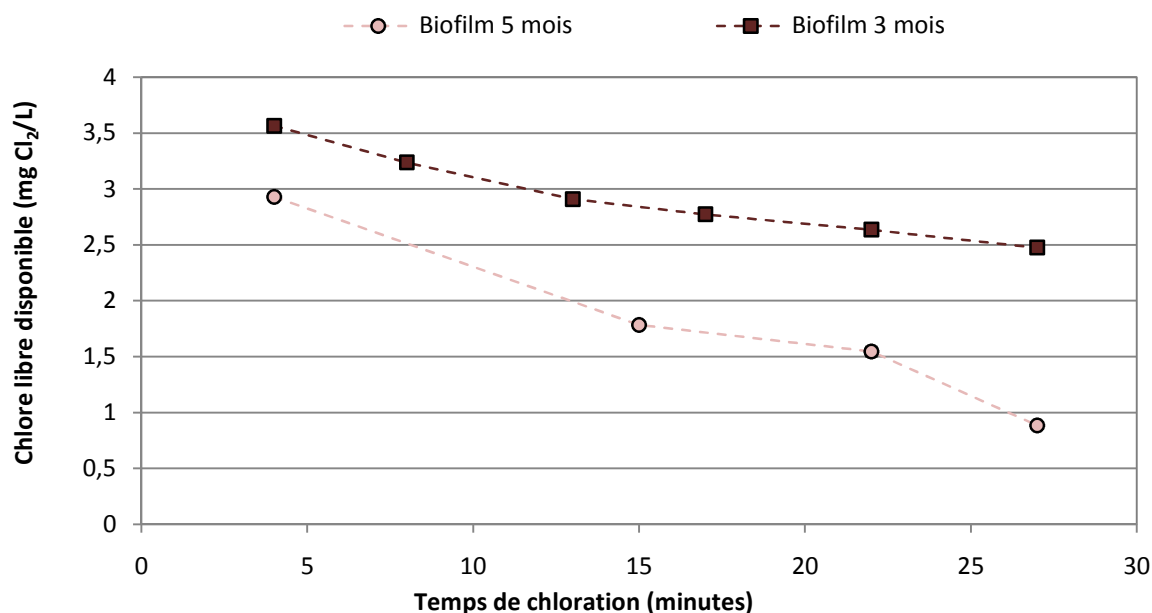


Figure 18. Suivi de la concentration en chlore libre (mg/L) dans l'eau des réacteurs Propella™ colonisés par des biofilms de 3 et 5 mois (n=2).

Pour un biofilm de 3 mois, la concentration en chlore mesurée après 4 minutes de séjour dans le pilote est de 3,6 mg/L. Cette concentration diminue de façon régulière pour atteindre 2,5 mg/L après 27 minutes. La concentration en chlore libre a diminué de 1,1 mg/L en 23 minutes.

Pour un biofilm de 5 mois, la concentration en chlore est de 2,9 mg/L après 4 minutes. Après 27 minutes, elle est de 0,9 mg/L. La concentration en chlore libre a diminué de 2,1 mg/L en 23 minutes.

D'après ces résultats, on observe que la diminution de la concentration en chlore, également appelée consommation en chlore, augmente avec l'âge du biofilm. Il est possible de faire l'hypothèse que la consommation est due à la quantité de matière organique qui est plus importante dans le pilote colonisé par un biofilm de 5 mois. Cependant, en raison du nombre limité de coupons il n'a pas été possible d'effectuer des mesures de densité bactérienne sur ces deux biofilms.

Il est à noter que dans le Propella™ colonisé par un biofilm de trois mois la concentration en chlore n'a diminuée que de moitié et que les virus sont encore en contact avec 2,5 mg/L de chlore.

4.3. Effet de la chloration sur les bactériophages en suspension dans l'eau

Les bactériophages présents dans l'eau des réacteurs vont rapidement subir les effets de la chloration. Les bactériophages infectieux sont détectés par la méthode des plages de lyse sans distinction des génogroupes. Les concentrations en phages infectieux sont comparées aux concentrations en génome phagique après addition des valeurs obtenues pour MS2 et Q β par RT-PCR temps réel.

Le chlore libre a été systématiquement neutralisé par ajout de thiosulfate de sodium avant chaque analyse. Il a été vérifié que la présence de thiosulfate de sodium n'interférait pas sur les résultats de RT-PCR en temps réel. A titre d'exemple, un C_T de 23,8 est obtenu sur une suspension témoin de Q β sans chlore ni thiosulfate et un C_T de 23,7 est obtenu sur une suspension chlorée à 5 mg/L puis neutralisée au thiosulfate de sodium. Des résultats similaires sont obtenus pour le phage MS2.

La quantification des bactériophages dans l'eau est réalisée immédiatement (C_0) et 240 minutes ($C_{240\text{min}}$) après inoculation. Le chlore est ensuite ajouté pour atteindre une concentration de 5 mg/L. Les bactériophages présents dans l'eau sont quantifiés après 5 ($C_{5\text{ min chloration}}$) et 30 minutes ($C_{30\text{ min chloration}}$) de chloration. Les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 19**.

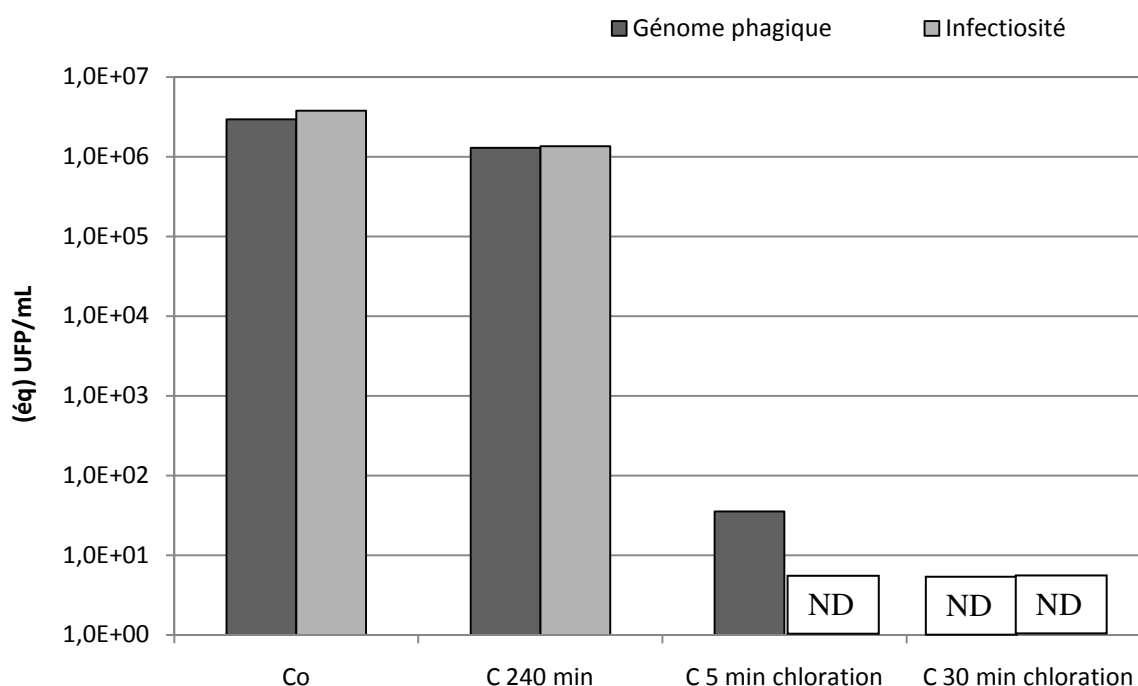


Figure 19. Quantification des bactériophages infectieux et du génome viral dans l'eau des réacteurs Propella™ avant et pendant la chloration à 5 mg/L. Les résultats sont exprimés en (eq) UFP/mL (n=2). ND = non détecté.

La concentration en génome viral mesurée dans l'eau immédiatement après inoculation est de $2,9 \cdot 10^6$ eq UFP/mL et celle en phage infectieux est de $3,8 \cdot 10^6$ UFP/mL. Ces valeurs sont en accord avec les quantités de phages théoriquement inoculés dans les réacteurs. Après 240 minutes, les concentrations ont légèrement diminué et sont respectivement de $1,3 \cdot 10^6$ eq UFP/mL et $1,4 \cdot 10^6$ UFP/mL. Ceci peut être expliqué comme vu précédemment dans le chapitre 3, par le transfert d'une partie des phages présents dans l'eau vers les surfaces des Propella™.

Dès 5 minutes de chloration on observe une nette diminution de la concentration en génome viral et en phage infectieux dans l'eau. En effet, seul du génome correspondant au bactériophage Q β est détecté par RT-PCR en temps réel ($3,6 \cdot 10^1$ eq UFP/mL) et uniquement pour l'expérimentation sur un biofilm de cinq mois. Après 30 minutes de chloration, l'ensemble des prélèvements sont négatifs en termes de bactériophages infectieux et de génome viral.

En résumé, une chloration à 5 mg/L pendant 5 minutes correspond à un C.t (concentration en chlore initiale $\times$ temps de contact en minutes) de 25 mg.min/L et permet d'atteindre un abattement de 6,5 $\log_{10}$ minimum pour les phages infectieux, et un abattement de 4,9 $\log_{10}$ minimum pour le génome viral. Après 30 minutes de chloration à 5 mg/L (C.t = 150 mg.min/L), la totalité des phages sont détruits puisque même leur génome ne peut être retrouvé.

4.4. Bactériophages associés au biofilm

Comme pour l'eau, les coupons ont été analysés 4 heures après inoculation des phages dans l'eau des réacteurs afin d'obtenir une concentration surfacique initiale (concentration en phages initiale : C_i) puis après 30 minutes de chloration (concentration en phage après 30 minutes de chloration : C_{Cl}). Les concentrations surfaciques en phages infectieux et en génome phagique ont été mesurées pour ces deux temps d'analyse. L'abattement phagique (A) est ensuite mesuré selon l'équation présentée ci-dessous :

$$A = \log_{10} (C_{Cl}/C_i)$$

Les abattements en génome viral et en bactériophages infectieux sont présentés sur la **figure 20**. Les concentrations en génome ont été additionnées pour MS2 et Q β afin de pouvoir comparer les valeurs à l'infectiosité, comme dans le cas des analyses de l'eau.

La concentration phagique initiale mesurée sur les biofilms de 3 et 5 mois n'est pas significativement différente, à la fois pour la détection du génome ($p=0,057$) et de l'infectiosité ($p=0,686$). Pour des biofilms de 3 et 5 mois, les concentrations phagiques initiales en génome sont de $8,9.10^5 \pm 2,3.10^5$ et $5,9.10^5 \pm 1,4.10^5$ éq UFP/cm² respectivement et les concentrations en phages infectieux sont de $8,3.10^5 \pm 1,7.10^5$ et $1,9.10^5 \pm 7,6.10^4$ UFP/cm².

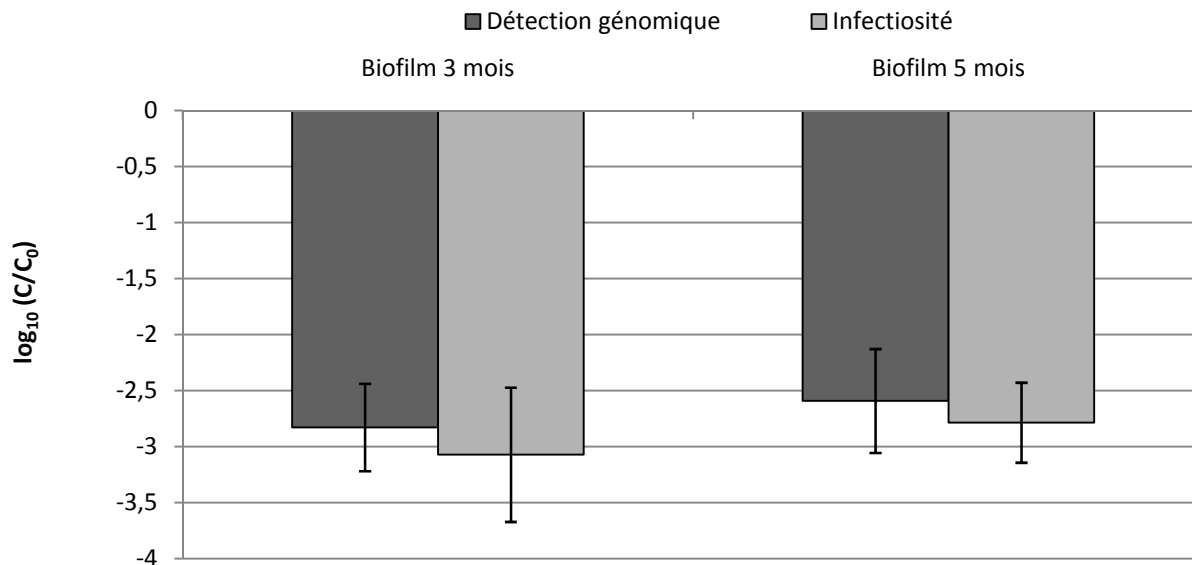


Figure 20. Abattement des bactériophages infectieux et du génome viral après 30 minutes de chloration sur les coupons de PEHD (Propella™) colonisés par un biofilm de trois mois et cinq mois.

Après 30 minutes de chloration, les concentrations génomiques mesurées à la surface des coupons sont de $2,1.10^3 \pm 2,0.10^3$ et $1,4.10^3 \pm 1,2.10^3$ éq UFP/cm² respectivement sur biofilm de 3 et 5 mois, ce qui correspond à des abattements en génome de $2,8 \pm 0,5$ et $2,6 \pm 0,4$ log₁₀ éq UFP/cm². De même, pour l'infectiosité, les valeurs obtenues sont de $8,6.10^2 \pm 5,4.10^2$ et $3,3.10^2 \pm 3,3.10^2$ UFP/cm², correspondant à des abattements de $3,1 \pm 0,4$ et $2,8 \pm 0,6$ log₁₀ UFP/cm². Ces abattements correspondent à une élimination phagique comprise entre 99,8 et 99,9 %, avec une concentration résiduelle en chlore dans l'eau comprise entre 0,9 et 2,5 mg/L de chlore libre.

En résumé, l'élimination des phages adsorbés sur les surfaces ± biofilm par chloration n'est pas significativement différente pour un biofilm de 3 et 5 mois ($p=0,343$). En raison du nombre de coupons, il n'a pas été possible d'analyser le biofilm formé aux surfaces, ni d'apprécier l'efficacité du nettoyage sur les bactéries du biofilm. Toutefois, les deux mois supplémentaires de formation de biofilm d'eau potable n'augmentent pas l'effet protecteur vis-à-vis du chlore. Il est simplement possible d'observer que la présence d'un biofilm sur les surfaces a un effet protecteur sur l'élimination des phages puisque des phages infectieux persistent à la surface des Propella™, en effet, $3,3.10^2$ à $8,6.10^2$ UFP / cm² sont encore

détectées après la chloration. Une chloration, à une valeur de $C.t$ de 150 mg.min/L (30 minutes de temps de contact à 5 mg Cl_2/L), permet d'obtenir une diminution de particules virale infectieuses de 99,9%.

4.5. Comparaison de l'action du chlore sur les deux génogroupes phagiques

La technique des plages de lyse permet de déterminer les concentrations en phages infectieux mais ne fait pas de distinction entre les différents génogroupes. La technique de RT-qPCR permet par contre de quantifier le génome de chaque génogroupe de façon spécifique. Les précédents résultats en génome représentaient la somme du génome des 2 phages (MS2 et Q β). La technique de RT-qPCR permet le suivi individuel de chaque génogroupe.

L'abattement en génome viral pour chaque bactériophage est présenté sur la **figure 21**.

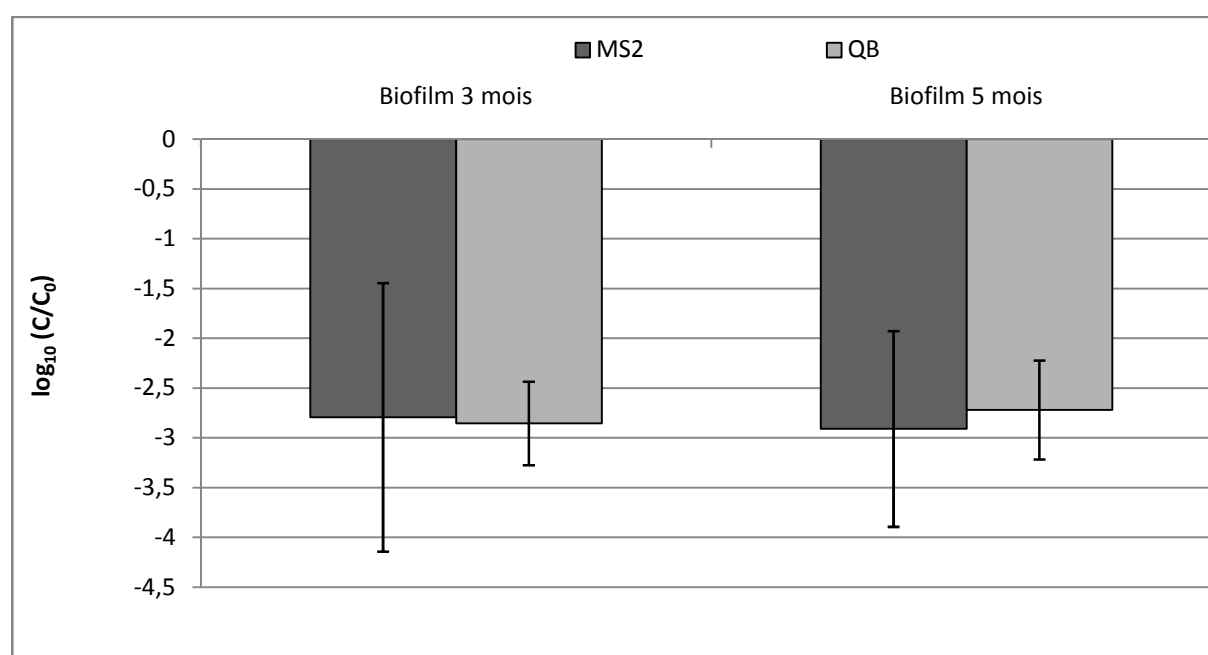


Figure 21. Abattement du génome des bactériophages MS2 et Q β sur les coupons de PEHD (Propella™) avant et après 30 minutes de chloration, sur un biofilm de trois mois et un biofilm de 5 mois (n=5).

Les concentrations phagiques mesurées sur les surfaces avant chloration sont comprises entre $2,2.10^4 \pm 6,9.10^3$ et $8,1.10^4 \pm 2,9.10^4$ éq UFP/cm² pour MS2 et entre $8,3.10^5 \pm 2,2.10^5$ et $1,1.10^5 \pm 2,6.10^3$ éq UFP/cm² pour Q β . Après 30 minutes, un abattement de $2,8 \pm 0,9$ et $2,9 \pm 1,3 \log_{10}$ est observé pour le génome de MS2 pour des biofilms de 3 et 5 mois. Pour le génome de Q β les valeurs d'abattements sont de $2,9 \pm 0,5$ et $2,8 \pm 0,4 \log_{10}$. La comparaison

de la dégradation du génome des deux phages étudiés ne montre pas de différence significative (biofilm de 3 mois : $p=0,9$ et biofilm de 5 mois : $p=1,0$).

Discussion

Les virus entériques pathogènes susceptibles d'être accidentellement introduits dans un réseau de distribution d'eau sont essentiellement des virus nus - dépourvus d'enveloppe - mesurant entre 20 et 100 nm de diamètre. L'étude de la problématique des interactions entre les virus et les biofilms d'eau potable nécessite de prendre en compte le phénomène d'adsorption viral sur les surfaces, mais également d'évaluer les conséquences de cette adsorption sur les procédés visant à éliminer ces particules virales. Les informations actuellement disponibles dans la littérature mettent en évidence le rôle de multiples paramètres tels que les propriétés de surface des virus, des matériaux et du milieu dans le transfert des virus de l'eau vers les surfaces (Quignon *et al.*, 1997 ; Storey et Ashbolt, 2003 ; Helmi *et al.*, 2008). Les données disponibles sur les propriétés de surface des virus entériques sont encore trop fragmentaires pour prédire de façon précise leur adhésion sur un support et donc *a fortiori* sur une structure aussi complexe qu'un biofilm. Ainsi, les études concernant l'adhésion ou la persistance des virus au sein de biofilms restent encore extrêmement limitées dans leurs conclusions, il apparaît tout de même que le biofilm constitue une surface adsorbante et potentiellement protectrice pour les particules virales.

L'objectif de ce travail était d'apporter de nouvelles données visant à approfondir les connaissances sur les interactions entre les virus et les biofilms dans le contexte d'un réseau d'eau potable. Deux bactériophages ARN F-spécifiques - MS2 et Q β - qui présentent des propriétés de surface différentes (Langlet *et al.*, 2008) et sont fréquemment proposés comme modèles des virus entériques pathogènes ont été utilisés dans cette étude. Les phages ARN F-spécifiques constituent des modèles de choix pour l'étude des virus pathogènes de par leurs similitudes physiques et biologiques. Leur manipulation ainsi que leur multiplication en laboratoire sont relativement faciles et ils sont détectables de façon spécifique par biologie moléculaire (RT-PCR temps réel) (Ogorzaly et Gantzer, 2006).

L'influence d'un biofilm sur l'adsorption phagique a été analysée en comparant la concentration virale sur des surfaces soit colonisées par des biofilms de trois mois soit sur des surfaces « témoins » (en place depuis 24 heures). L'impact d'un procédé de nettoyage par chloration a été évalué sur les virus présents dans l'eau et ceux adsorbés sur les biofilms. Les études *in situ* étant difficiles à mettre en œuvre, les expérimentations ont été effectuées dans

des réacteurs Propella™ couramment utilisés pour étudier les biofilms (Grandjean *et al.*, 2005 ; Lehtola *et al.*, 2007). Ces réacteurs étaient reliés au réseau de distribution d'eau de la Communauté Urbaine du Grand Nancy (CUGN) pour se placer dans des conditions proches de celles retrouvées *in situ*.

1. Adsorption virale sur les surfaces

Les réacteurs Propella™ sont placés à température ambiante (19°C). Dans ces conditions nous pouvons considérer que les bactériophages sont incapables de se répliquer. Les phages détectés sur les surfaces lors de nos expérimentations correspondent donc aux phages inoculés dans l'eau des réacteurs.

Les résultats obtenus lors de ce travail ont conduit à deux observations principales. D'une part, les concentrations en phage MS2 retrouvées sur les surfaces sont systématiquement inférieures à celles du phage Q β . D'autre part, la présence d'un biofilm d'eau potable de trois mois sur les surfaces augmente de façon significative le nombre de particules virales adsorbées pour les deux phages. A l'heure actuelle, peu d'études ont été publiées sur l'accumulation de virus entériques sur les réseaux de distribution d'eau (Quignon *et al.*, 1997 ; Storey et Ashbolt, 2001 et 2003 ; Helmi *et al.*, 2008 ; Langmark *et al.*, 2005). Il apparait tout de même que l'adsorption de particules virales fait intervenir les interactions électrostatiques et hydrophobes entre les surfaces et les particules et que ce phénomène est gouverné par plusieurs paramètres tels que la taille des particules, les caractéristiques du milieu, des surfaces et des particules (Attini *et al.*, 2010 ; Schaldach *et al.*, 2006 ; Shani *et al.*, 2008 ; Faille *et al.*, 2002 ; Van Voorthuizen *et al.*, 2001).

(i) Influence de la taille des particules virales. Etant donnée leur taille (< 40 nm pour la majorité des virus entériques) ces particules peuvent être considérées comme des biocolloïdes. Helmi *et al.* (2008) ont analysé l'adsorption de différents microorganismes, notamment des virus (phage MS2) et des parasites (oocystes de *Cryptosporidium parvum* et de kystes de *Giardia intestinalis*) sur des biofilms. Le phage MS2 a une taille de 30 nm environ alors que les kystes de *Giardia* et oocystes de *Cryptosporidium* ont une taille comprise entre 5 et 15 μ m. Les auteurs ont reporté un taux d'attachement au biofilm pour le phage MS2 significativement supérieur à celui des parasites après une heure de contact. Par contre, après 24 heures de contact les taux d'attachement pouvaient être considérés comme

équivalents pour les parasites et le phage MS2. Les auteurs ont fait l'hypothèse qu'en dehors des propriétés physico-chimiques, la taille des particules joue un rôle dans le phénomène d'adsorption et que les plus petites particules s'adsorbent plus rapidement sur les sites de sorption des surfaces irrégulières et complexe telles que les biofilms.

Les différences de densité surfacique entre les phages MS2 et Q β observées dans notre étude pourraient être la résultante d'une agrégation virale ayant pour conséquence une limitation de la diffusion des agrégats vers la surface par rapport aux particules isolées. Pour cette raison, la taille des phages a été analysée pour des suspensions phagiques ne contenant qu'un seul génogroupe ou un mélange des deux phages dans de l'eau du réseau. 96% des particules détectées avaient une taille inférieure à 30 nm pour une concentration de 10^{10} UFP/mL. Nous pouvons ainsi considérer que dans nos conditions de travail, pour une concentration virale de 10^6 UFP/mL, les bactériophages se trouvaient majoritairement sous forme de particules phagiques isolées. La taille ne peut donc pas expliquer les différences d'adsorption observées entre les phages MS2 et Q β .

(ii) **Influence des caractéristiques du milieu.** Le pH, la force ionique et la température du milieu hydrique peuvent avoir une influence lors du processus d'adsorption de colloïdes sur des surfaces. Pour évaluer l'influence des caractéristiques physico-chimiques du milieu sur les propriétés de surface des virus, Langlet *et al.* (2008) ont étudié l'agrégation de bactériophages ARN F-spécifiques en fonction du pH (2 à 7) et de la force ionique (1 et 100 mM) dans des solutions de NaNO₃. Les auteurs ont montré que l'agrégation du phage MS2 ne se produit que pour des pH inférieurs à son point isoélectrique quelle que soit la force ionique du milieu. Par contre, l'agrégation du phage Q β est observée pour toute la gamme de pH testée à une force ionique de 100 mM. Syngouna *et al.* (2010) ont souligné l'importance de la température en étudiant l'adhésion virale sur deux types d'argile à 4°C et 25°C, ils ont alors mesuré des taux d'adhésion plus élevés pour une température de 25°C. Dans nos conditions expérimentales, les deux virus sont introduits simultanément dans les réacteurs et sont soumis aux mêmes conditions de force ionique et de température. Si les caractéristiques du milieu hydrique peuvent influencer l'adsorption virale, elles ne peuvent être invoquées pour expliquer les différences de niveau d'adsorption observées entre MS2 et Q β dans nos expérimentations.

(iii) **Influence des propriétés de surface des phages.** Le point isoélectrique (pI) est un paramètre couramment utilisé pour définir le signe et l'amplitude de charge exprimée par une particule virale (Dowd *et al.*, 1998 ; Michen et Graule, 2010). Le pI peut être défini par des mesures de mobilité électrophorétique et correspond à la valeur de pH pour laquelle celle-ci est nulle. Une particule virale est théoriquement chargée négativement pour des pH supérieurs à son pI , elle présente une charge globale de surface neutre pour un pH correspondant à son pI et est chargée positivement pour des pH en dessous de son pI (Penrod *et al.*, 1995). Etant donné que nos expérimentations ont été réalisées à un pH de $8,1 \pm 0,2$ et que le point isoélectrique des phages étudiés est bas, de 3,9 pour MS2 et 1,9 pour Q β (Langlet *et al.*, 2008), ces phages se comportent comme des particules colloïdales chargées négativement. Dans l'étude de Langlet *et al.* (2008), l'analyse des courbes de mobilité électrophorétique des bactériophages MS2 et Q β permet de faire l'hypothèse qu'à un pH neutre, dans du $NaNO_3$, ces deux virus expriment une charge négative à peu près équivalente à leur surface. En dehors de la charge de la capside virale un autre paramètre exprimé par la capside est l'hydrophobicité. Langlet *et al.* (2008) ont évalué l'hydrophobicité des phages MS2 et Q β à partir de mesure d'agrégation à forte force ionique (100 mM) et ont conclu que le bactériophage MS2 serait moins hydrophobe que le bactériophage Q β . Certaines études ont montré que les biofilms seraient composés de domaines hydrophobes pouvant influencer l'adsorption des particules colloïdales en suspension (Zita et Hermansson, 1997). Suivant ces données, le bactériophage Q β doit être retrouvé en plus grandes concentrations sur les surfaces colonisées par un biofilm, ce qui est en accord avec nos résultats. De plus, des études ont souligné les faibles propriétés adhésives du phage MS2, qui est par conséquent utilisé pour l'évaluation d'un point de vue virologique, de procédés de traitement de l'eau basés sur l'adsorption, par exemple lors d'une filtration membranaire (Schijven et Hassanizadeh, 2000, van Voorthuizen *et al.*, 2001 ; Charles *et al.*, 2008 ; Shirasaki *et al.*, 2009).

(iv) **Influence des propriétés de surface du matériau.** Le biofilm est une biomasse hydratée, anionique, comportant des domaines hydrophobes qui modifient les propriétés de surfaces initiales du matériau. Le caractère hydrophobe du PVC est plus marqué que celui de l'inox 316L (Faille *et al.*, 2002) ceci peut expliquer pourquoi les premières mesures de densité bactérienne réalisées après 24 heures de contact avec l'eau soient deux fois plus importante sur le PVC que sur inox 316L. Cependant, après trois mois de contact avec l'eau, les densités bactériennes retrouvées sur les deux supports semblent se stabiliser pour devenir équivalentes.

Dans nos conditions expérimentales le biofilm est âgé de trois mois et présente une densité cellulaire d'environ $2,5 \times 10^7$ cellules/cm² quel que soit le matériau considéré. Cette densité cellulaire est en accord avec des densités mesurées sur des biofilms d'eau potable dans la littérature (Manuel *et al.*, 2007 ; Mathieu *et al.*, 2009).

Lors de la mise en service d'un réseau de distribution d'eau, sa surface est rapidement colonisée par un « film conditionnant » qui va modifier les propriétés de surface de ce dernier et peut également créer de nouveaux sites de sorption pour des particules colloïdales. Nos coupons « témoins » étaient en place dans le réacteur depuis 24 heures, des particules ont rapidement adhéré sur les surfaces d'inox 316L et de PVC entraînant une modification des propriétés de surface initiales, c'est ce qui peut expliquer le fait que nous ayons mesuré un nombre équivalent de virus sur l'inox 316L et le PVC. Le biofilm modifie l'attractivité de la surface vis-à-vis des virus puisque l'on observe dans nos expérimentations une augmentation significative du nombre de particules virales adhérees sur les coupons mis en place depuis trois mois par rapport aux coupons « témoins ». Cette observation confirme l'hypothèse selon laquelle le biofilm modifie les propriétés de surface des matériaux et crée de nouveaux sites de sorption pour les particules colloïdales et notamment les virus présents dans l'eau.

Toutes ces données sont en accord avec la théorie disant que l'adsorption virale sur des surfaces est multiparamétrique et qu'elle est extrêmement dépendante des propriétés physico-chimiques du milieu, des surfaces et des particules. Le rapport entre le nombre de virus adsorbés par unité de surface et le nombre de virus en suspension par unité de volume, mesuré après quelques heures de contact varie énormément en fonction des études et des conditions expérimentales (matériaux étudiés, réacteurs utilisés, type et âge de biofilm). Ainsi, après 24 heures de contact, ce rapport peut être compris entre 0,0001% (Langmark *et al.*, 2005) pour un phage 28B sur un biofilm de 8 semaines et 70% (Quignon *et al.*, 1997) pour un poliovirus 1 sur un biofilm de 4 mois. Dans notre étude, le taux d'adhésion n'a pas pu être estimé du fait que l'adhésion phagique était différente sur biofilm et surfaces « témoins » et que les deux types de coupons étaient présents simultanément dans le réacteur.

2. Evaluation d'un protocole de nettoyage par chloration

La désinfection de l'eau par des oxydants, notamment le chlore est l'une des principales techniques utilisée à l'heure actuelle. Il est difficile de prédire l'efficacité d'un traitement de

chloration vis-à-vis des virus étant donné le grand nombre de paramètres pouvant influencer l'efficacité du traitement. Il en ressort tout de même que deux paramètres sont importants lors de la chloration, il s'agit du temps de contact et de la concentration en chlore initialement inoculée dans l'eau. Ces deux paramètres sont couramment combinés pour donner une valeur appelée C.t exprimée en mg.min/L. C'est à partir de ce paramètre et en analysant les résultats d'études effectuées dans des conditions de température, de pH et de type d'eau similaires qu'il est possible de comparer l'activité de désinfectants sur différents virus. Ainsi, selon la littérature, les bactériophages ARN F-spécifiques, et plus particulièrement le bactériophage MS2, présentent une sensibilité au chlore inférieure au Coxsackievirus B5 mais supérieure aux *Caliciviridae* (norovirus murins et félins) en termes d'infectiosité. Leur sensibilité au chlore est comparable à celle du poliovirus ou des échovirus, ils peuvent ainsi constituer des modèles d'étude de virus entériques pathogènes intéressants.

L'aggrégation des particules virales peut influencer la diffusion des virus mais également jouer un rôle protecteur face aux traitements de désinfection, notamment par chloration. Ainsi, Thurston-Enriquez *et al.* (2003) ont montré que le temps nécessaire pour obtenir un abattement viral de $2 \log_{10}$ était 31 fois supérieur pour des particules de calicivirus félin (FCV) agrégées et 2,8 fois supérieur pour des poliovirus-1 agrégés en comparaison avec des suspensions de virus isolés. Nos mesures préalables ayant montré que les phages MS2 et Q β étaient à l'état de particules isolées, aucun effet protecteur vis-à-vis de la chloration n'est attendu à ce niveau.

La chloration a été réalisée par ajout d'hypochlorite de sodium dans l'eau des réacteurs à des concentrations initiales de 5 mg/L. De telles doses peuvent être appliquées dans des réseaux de distribution dans un objectif de nettoyage ponctuel. La dose résiduelle de chlore habituellement retrouvée dans un réseau afin de maintenir la qualité microbiologique de l'eau est plutôt de l'ordre de 0,1 mg/L de chlore.

(i) Effet de la chloration sur les virus présents dans l'eau. Les bactériophages sont introduits dans l'eau à une concentration initiale théorique de 10^6 UFP/mL. L'introduction de 5 mg/L d'hypochlorite de sodium entraîne une diminution importante et rapide de la concentration en phages infectieux et en génome viral dans les deux réacteurs après 5 minutes de contact (correspondant à un C.t de 25 mg.min/L). Ainsi, ce traitement engendre un abattement d'au moins $6,5 \log_{10}$ pour les phages infectieux et $4,9 \log_{10}$ pour le génome viral. La comparaison avec les données de la littérature est délicate du fait des différences de

conditions expérimentales (température, pH, concentrations virales initiales, concentrations en oxydant, durée). Toutefois, nos résultats sont en accord avec les valeurs obtenues par Schaper *et al.* (2002) qui observent un abattement de 5,9 log₁₀ en bactériophages ARN F-spécifiques infectieux pour un C.t de 12 mg.min/L. Shin et Sobsey (2008) obtiennent un abattement du génome viral de MS2 de 4 log₁₀ pour un C.t de 3,3 mg.min/L. Les valeurs de C.t appliquées dans nos expérimentations correspondent à un traitement de chloration destiné à lutter contre une contamination accidentelle du réseau. Elles entraînent rapidement une dégradation totale des phages infectieux ainsi que du génome viral pour les phages en suspension dans l'eau.

(ii) Effet de la chloration sur les virus adsorbés sur les surfaces. L'action de l'hypochlorite de sodium a également été évaluée sur les bactériophages adhérents au biofilm. Seule une mesure a pu être réalisée après un temps de contact de 30 minutes, correspondant à un C.t de 150 mg.min/L. L'abattement atteint alors 3,1 log₁₀ pour le génome et 2,8 log₁₀ pour l'infectiosité. Nos résultats permettent donc de montrer que l'abattement obtenu sur des phages adhérents sur une surface colonisée par un biofilm d'eau potable est moins important que celui obtenu sur des phages en suspension dans l'eau. Très peu d'études ont analysé la persistance virale sur des biofilms en présence de chlore. Cependant, ces résultats sont en accord avec les données obtenues par Quignon *et al.* (1997) pour une souche de poliovirus 1. Ces auteurs ont montré en effet une diminution plus importante des virus infectieux dans l'eau que dans le biofilm.

Certaines informations de la littérature ont démontré la persistance de virus infectieux au sein de biofilms, mais également leur relargage dans la phase aqueuse. L'eau peut ainsi être contaminée même en dehors d'incidents sur le réseau (Helmi *et al.*, 2008) et ceci, même après l'application de procédés de nettoyage.

(iii) Comparaison des deux méthodes de détection phagique. Les résultats de quantification de virus infectieux et de génome viral dans l'eau sont en accord avec les concentrations virales théoriquement inoculées. Les valeurs mesurées en génome sont systématiquement plus élevées que celles mesurées pour l'infectiosité. Ceci est notamment dû à la synthèse de particules virales non infectieuses mais contenant du génome ainsi qu'à la présence de génome libre dans les suspensions de phages produites au laboratoire. Cet écart va augmenter au cours du stockage, l'inactivation virale étant plus rapide que la dégradation du génome (Gassilloud *et al.*, 2003).

Afin de détecter l'infectiosité des phages adsorbés sur les biofilms, une méthode de récupération des virus préservant leur intégrité a été nécessaire. La comparaison des abattements en génome et en infectiosité virale montrent que ces deux paramètres présentent une sensibilité identique à l'hypochlorite de sodium. Ainsi, le protocole d'élution et de concentration semble parfaitement adapté à nos expérimentations et nous permet de quantifier les phages infectieux et le génome viral. De plus, ces résultats sont en accord avec les observations de Nuanualsuwan et Cliver (2003) qui ont montré que les courbes de dégradation du génome et de perte d'infectiosité d'un poliovirus 1 sous l'action d'hypochlorite de sodium ne sont pas significativement différentes. Par contre, des études de persistance réalisées sans utilisation d'agents oxydants ont montré que l'inactivation virale est plus rapide que la dégradation du génome. Ainsi, Helmi *et al.* (2008) ont constaté qu'au sein du biofilm, l'inactivation des particules virales était plus importante que la dégradation du génome, suggérant que les techniques de biologie moléculaire pouvaient surestimer le risque de présence de virus infectieux. Lors de la comparaison de l'inactivation et de la dégradation du génome de virus entériques (poliovirus, FCV) dans de l'eau minérale, Gassilloud *et al.* (2003) ont observé une persistance plus importante du génome.

Enfin, la détection des bactériophages par biologie moléculaire permet de différencier les deux bactériophages étudiés (MS2 et Q β), il a ainsi été possible de suivre individuellement chaque bactériophage lors de la chloration. Nos résultats montrent que dans le réacteur Propella™, les abattements après 30 minutes de chloration à 5 mg/L (C.t = 150 mg.min/L) ne diffèrent pas entre MS2 et Q β . En effet, l'abattement est compris entre 2,8 et 2,9 log₁₀ pour ces deux phages. Schaper *et al.* (2002) avaient quand à eux montré une résistance du phage MS2 plus importante que celle du phage Q β face à un traitement à base d'hypochlorite de sodium.

Conclusion et perspectives

Les données épidémiologiques soulignent l'implication des virus entériques dans les maladies d'origine hydrique. Or les paramètres microbiologiques du contrôle sanitaire sont exclusivement de nature bactérienne et le comportement des particules virales dans le milieu hydrique reste largement méconnu. Cette étude visait à apporter des informations concernant l'adhésion de particules virales sur des surfaces, puis à comparer l'efficacité d'un traitement par chloration sur les virus adhérents aux surfaces et en suspension dans l'eau. Les expérimentations ont été conduites à l'aide de réacteurs Propella™ alimentés par de l'eau de distribution (Communauté Urbaine du Grand Nancy). L'utilisation de ces réacteurs a permis de maîtriser quelques paramètres tels la température, les matériaux, l'âge du biofilm et la concentration virale inoculée. Des bactériophages ARN F-spécifiques (MS2 et Q β) ont été utilisés comme modèles des virus entériques pathogènes, ils présentent de nombreuses similitudes structurales avec ces derniers et leurs propriétés de surface ont fait l'objet de plusieurs études.

Nos résultats ont montré que la présence d'un biofilm sur les surfaces entraînait une augmentation du nombre de phages adsorbés après seulement quatre heures de contact. Ceci peut être expliqué par la création de nouveaux sites de sorption suite à la formation du biofilm à la surface des réacteurs. Les bactériophages MS2 et Q β utilisés dans ces expérimentations sont des virus nus de taille identique, mais ils présentent des propriétés de surface différentes avec notamment une hydrophobicité supérieure pour le phage Q β . L'analyse des surfaces du réacteur a systématiquement relevé des concentrations plus élevées pour le phage Q β ce qui souligne l'importance des propriétés de surface des particules virales dans leur adhésion aux surfaces. Ainsi, un transfert des virus vers les surfaces colonisées ou non par des biofilms est possible selon un coefficient de partage actuellement indéterminé qui dépend des propriétés de surface des virus, des matériaux ainsi que des propriétés physico-chimiques du milieu.

Les conséquences d'un traitement de désinfection de l'eau des réacteurs par chloration ont ensuite été étudiées pour les bactériophages en suspension dans l'eau et ceux adhérents aux surfaces. L'infectiosité des bactériophages et, leur génome ont été suivies avant et après chloration. La quantité de chlore introduite dans le système (5 mg/L) a conduit à une inactivation complète des bactériophages présents dans l'eau dès 5 minutes de contact. Le génome viral n'était plus détecté après 30 minutes de chloration pour les deux bactériophages. Parallèlement, les bactériophages adhérents sur le biofilm ont bénéficié d'un effet protecteur

puisque des phages infectieux ont été retrouvés après 30 minutes de chloration alors que la quantité résiduelle de chlore dans l'eau était d'au moins 0,9 mg/L. Si l'on considère l'information donnée par la détection du génome, les bactériophages en suspension dans l'eau sont altérés au minimum 30 fois plus rapidement que ceux adsorbés sur le biofilm lors d'un traitement par chloration. La persistance des particules virales au sein des biofilms est possible et semble protéger les virus, ce qui peut poser problème en cas de relargage des virus. Il apparaît que la persistance des virus dans les biofilms, ainsi que leur relargage dans l'eau restent largement méconnus. L'utilisation de pilotes simulant de mieux en mieux les conditions rencontrées par les virus dans les réseaux devrait permettre d'améliorer les connaissances sur ces différents points.

Bibliographie

Abad, F.X., Pinto, R.M., Diez, J.M. and Bosch, A. (1994) Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 60(7), 2377-2383.

Abe, Y., Skali-Lami, S., Block, J.C. and Francius G. (2012) Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. *Water Research* accepted for publication.

Ackermann, H.W. (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology* 152(2), 227-243.

AFNOR T 90-038 (1987) Dosage du chlore libre et du chlore total par la méthode colorimétrique à la N,N'-diéthylphénylène-1,4 diamine. Page 313.

Anderson, E.J., Rupp, A., Shulman, S.T., Wang, D., Zheng, X. and Noskin, G.A. (2011) Impact of rotavirus vaccination on hospital-acquired rotavirus gastroenteritis in children. *Pediatrics* 127(2), 264-270.

APHA (American Public Health Association) / AWWA (American Water Works Association) / WEF (Water Environment Federation) (1998) Standard methods for the examination of water and wastewater, 20^e edition.

Attinti, R., Wei, J., Kniel, K., Thomas Sims, J. and Jin, Y. (2010) Virus' (MS2, PhiX174, and Aichi) attachment on sand measured by atomic force microscopy and their transport through sand columns. *Environmental Science and Technology* 44(7), 2426-2432.

Bales, R.C., Li, S., Maguire, K.M., Yahya, M.T. and Gerba, C.P. (1993) MS-2 and poliovirus transport in porous media : hydrophobic effects and chemical perturbations. *Water Resources Research* 29(4), 957-963.

Ballester, N.A., Fontaine, J.H. and Margolin, A.B. (2005) Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. *Journal of Water and Health* 3(1), 59-68.

Barbeau, B., Desjardins, R., Mysore, C. and Prévost, M. (2005) Impacts of water quality on chlorine and chlorine dioxide efficacy in natural waters. *Water Research* 39: 2024–2033.

Blanton, L.H., Adams, S.M., Beard, R.S., Wei, G., Bulens, S.N., Widdowson, M.A., Glass, R.I. and Monroe, S.S. (2006) Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *Journal of Infectious Disease* 193(3), 413-421.

Block, J.C., Haudidier, K., Paquin, J.L., Miazga, J. et Levi, Y. (1993) Biofilm accumulation in drinking water distribution systems. *Biofouling* 6 , 333-343.

Block J.C. and Appenzeller, B.M.R. (2001) Biofilms et distribution d'eau potable. *Bulletin de la société Française de Microbiologie* 16(1), 7-12.

Bollback, J.P. and Huelsenbeck, J.P. (2001) Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family *Leviviridae*). *Journal of Molecular Evolution* 52(2), 117-128.

Boring, J.R., Martin, W.T. and Elliott, L.M. (1971) Isolation of *Salmonella typhimurium* from municipal water, Riverside, California, 1965. *American Journal of Epidemiology*, 93(1), 49-54.

Briandet, R., Lacroix-Gueu, P., Renault, M., Lecart, S., Meylheuc, T., Bidnenko, E., Steenkest, K., Bellon-Fontaine, M.N. and Fontaine-Aupart, M.P. (2008) Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 74(7), 2135-2143.

Candy, D.C. (2007) Rotavirus Infection: A Systemic Illness? *Plos Medicine*, 4(4), 117.

Carter, M.J. (2005) Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* 98(6), 1354-1380.

Charles, K.J., Souter, F.C., Baker, D.L., Davies, C.M., Schijven, J.F., Roser, D.J., Deere, D.A., Priscott, P.K. and Ashbolt, N. J. (2008) Fate and transport of viruses during sewage treatment in a mound system. *Water Research* 42, 3047-3056.

Chen, F., Lu, J.R., Binder, B.J., Liu, Y.C. and Hodson, R.E. (2001) Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR gold. *Applied and Environmental Microbiology* 67(2), 539-545.

Clark, R.M., Sivaganesan, M., Rice, E.W. and Chen, J. (2003) Development of a Ct equation for the inactivation of *Cryptosporidium* oocysts with chlorine dioxide. *Water Research* 37(11), 2773-2783.

Collins, K.E., Cronin, A.A., Rueedi, J., Pedley, S., Joyce, E., Humble, P.J. and Tellam, J.H. (2006) Fate and transport of bacteriophage in UK aquifers as surrogates for pathogenic viruses. *Engineering Geology* 85(1-2), 33-38.

Cornax, R., Morinigo, M.A., Balebona, M.C., Castro, D. and Borrego, J.J. (1991) Significance of several bacteriophage groups as indicators of sewage pollution in marine waters. *Water Research* 25(6), 673-678.

Cromeans, T.L., Kahler, A.M. and Hill, V.R. (2010) Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (4), 1028-1033.

DeBorde, D.C., Woessner, W.W., Kiley, Q.T. and Ball, P. (1999) Rapid transport of viruses in a floodplain aquifer. *Water Research* 33(10), 2229-2238.

de Serres, G., Cromeans, T.L., Levesque, B., Brassard, N., Barthe, C., Dionne, M., Prud'homme, H., Paradis, D., Shapiro, C.N., Nainan, O.V. and Margolis, H.S. (1999) Molecular confirmation of hepatitis A virus from well water: epidemiology and public health implications. *Journal of Infectious Disease* 179(1), 37-43.

Dorner, S.M., Anderson, W.B., Gaulin, T., Candon, H.L., Slawson, R.M., Payment, P. and Huck, P.M. (2007) Pathogen and indicator variability in a heavily impacted watershed. *Journal of Water and Health* 5(2), 241-257.

Dowd, S.E., Pillai, S.D., Wang, S. and Corapcioglu, M.Y. (1998) Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Applied and Environmental Microbiology* 64(2), 405-410.

Dufour, A.P. and Jakubowski, W. (1982) Drinking water and Legionnaires' disease. *Journal of American Water Works Association* 74, 631-637.

Dunn, B.E., Cohen, H. and Blaser, M.J. (1997) *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews* 10(4), 720-741.

Dupont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B. and Jaku, W. (1995) The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine* 332(13), 855-859.

Dutka, B.J., El Shaarawi, A., Martins, M.T. and Sanchez, P.S. (1987) North and south american studies on the potential of coliphage as a water quality indicator. *Water Research* 21(9), 1127-1134.

Eden, K.V., Rosenburg, M.L., Stoopler, M., Wood, B.T., Highsmith, A.K., Skaliy, P., Wells, J.G. and Feeley, J.C. (1977) Waterborne gastrointestinal illness at a ski resort. *Public Health Report* 92(3): 245-250.

Engelbrecht, R.S., Weber, M.J., Salter, B.L. and Schmidt, C.A. (1980) Comparative inactivation of viruses by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 40(2), 249-256.

Faille, C., Jullien, C., Fontaine, F., Bellon-Fontaine, M., Slomianny, C. and Benezech, T. (2002) Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Canadian Journal of Microbiology* 48(8), 728-738.

Fallon, R.J., Goldberg, D.J., Wrench, J.G., Green, S.T. and Emslie, J.A.M. (1993) Pontiac fever in children. Dans *Legionella* : Current status and emerging perspectives.

Barbaree, J.M., Breiman R.F. et Dufour A.P. American Society for Microbiology, Washington, DC, 50-51.

Fauquet, CM, Mayo, MA, Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. (2005) Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press.

Fontaine, O., Garner, B. and Bhan, M.K. (2007) Oral rehydration therapy, the simple solution for saving lives. BMJ 334, 14.

Gassilloud, B., Duval, M., Schwartzbrod, L. and Gantzer, C. (2003) Recovery of feline calicivirus infectious particles and genome from water: comparison of two concentration techniques. Water Science and Technology 47(3), 97-101.

Gauthier, Y. and Isoard, P. (1989) L'adhésion des bactéries sur les surfaces. Industries Alimentaires et Agricoles, 106(1-2), 31-33.

Gerba, C.P., Rose, J.B. and Singh, S.N. (1985) Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. CRC Critical Reviews in Environmental Control 15(3), 213-236.

Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., and Kassanoff, I. (1978) Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department : I. Clinical and epidemiologic aspects. American Journal of Epidemiology 107(2), 149-160.

Goffi-Laroche, L., Gratacap-Cavalier, B., Demanse, D., Genoulaz, O., Seigneurin, J.M. and Zmirou, D. (2003) Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (EMIRA study). Journal of Clinical Virology 27(1), 74-82.

Grandjean, D., Fass, S., Tozza, D., Cavard, J., Lahoussine, V., Saby, S., Guilloteau, H. and Block, J.C. (2005) Coliform culturability in over- versus undersaturated drinking water. Water Research 39(9), 1878-1886.

Hegarty, J.P., Dowd, M. and Baker, K.H. (1999) Occurrence of *Helicobacter pylori* in surface water in the United states. Journal of Applied Microbiology, 87, 697-701.

Helmi, K., Skrabber, S., Gantzer, C., Willame, R., Hoffmann, L. and Cauchie, H.M. (2008) Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, vaccinal poliovirus type 1, and bacteriophages phiX174 and MS2 with a drinking water biofilm and a wastewater biofilm. Applied and Environmental Microbiology 74(7), 2079-2088.

Helmi, K., Menard-Szczebara, F., Lénès, D., Jacob, P., Jossent, J., Barbot, C., Delabre, K. and Arnal, C. (2010) Adenovirus, MS2 and PhiX174 interactions with drinking water biofilms developed on PVC, cement and cast iron. Water Science and Technology 61 (12):3198-207.

Hock, C. and Botzenhart, K. (2002) Detection of enteric viruses in biofilms of the drinking water system. Poster presented at the 3rd IWA World Water Congress, Melbourne.

Hopkins, R.J., Vial, P.A., Ferreccio, C., Ovalle, J., Prado, P., Soromayor, V., Russel, R.G., Wassermann, S.S. and Morris, J.G. (1993) Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile : vegetables may serve as one route of transmission. *Journal of Infectious Disease* 168(1), 222-226.

Hrudey, S.E., Payment, P., Huck, P.M., Gillham, R.W. and Hrudey, E.J. (2003) A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Science and Technology* 47(3), 7-14.

IAWPRC (1991) Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research* 25(5), 529-545.

Inokuchi, Y., Takahashi, R., Hirose, T., Inayama, S., Jacobson, A.B. and Hirashima, A. (1986) The complete nucleotide sequence of the group II RNA coliphage GA. *The Journal of Biochemistry* 99(4), 1169-1180.

Inokuchi, Y., Jacobson, A.B., Hirose, T., Inayama, S. and Hirashima, A. (1988) Analysis of the complete nucleotide sequence of the group IV RNA coliphage SP. *Nucleic Acids Research* 16(13), 6205-6221.

Institut National de Veille Sanitaire (InVS). Site internet.

ISO 10705-1 2001. Water Quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.

Jarraud, S., Reyrolle, M. and Etienne, J. (2000) *Legionella* et Légionellose. In *Précis de bactériologie clinique*, ESKA Editor, 1389-1405.

Jiang, S.C. (2006) Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environmental and Science Technology* 40(23), 7132-7140.

Juranek, D.D. (1995) Cryptosporidiosis : sources of infection and guidelines for prevention. *Clinical infectious diseases* 21(supplement 1), S57-S61.

Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Roberts, J.M. and Hill, V.R. (2010) Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (15): 5159-5164.

Karim, M., Abbaszadegan, M. and LeChevalier M.W. (2003) Potential for pathogen intrusion during pressure transients. *Journal of American Water Works Association* 95(5), 134-146.

Kirmeyer, G.J., Friedman, M., Martel, K., Howie, D., LeChevalier, M., Abbaszadegan, M., Karim, M., Funk, J., Harbour, J. (2001) Pathogen intrusion into the Distribution System. AWWA Research Foundation and the American Water Works Association, Denver, CO.

Kirschner, R.A., Parker, B.C. and Falkinham, J.O. (1999) Humic and fluvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Ecology 30(4), 327-332.

Klein, P.D., Graham, D.Y., Gaillour, A., Opckun, A.R. and Smith, E.O. (1991) Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. The Lancet 337, 1503-1506.

Klovins, J., Overbeek, G.P., van den Worm, S.H., Ackermann, H.W. and van Duin, J. (2002) Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. Journal of General Virology 83(6), 1523-1533.

Koopmans, M., von Bonsdorff, C.H., Vinje, J., de Medici, D. and Monroe, S. (2002) Foodborne viruses. FEMS Microbiological Reviews 26(2), 187-205.

Koopmans, M. and Duizer, E. (2004) Foodborne viruses: an emerging problem. International Journal of Food Microbiology 90(1), 23-41.

Kott, Y., Roze, N., Sperber, S. and Betzer, N. (1974) Bacteriophages as viral pollution indicators. Water Research 8(3), 165-171.

Langlet, J. (2008) Propriétés interfaciales des bactériophages ARN-F spécifiques : Implications lors des processus d'adhésion-agrégation. Thèse Nancy Université, 166 pages.

Langlet, J., Gaboriaud, F., Duval, J.F. and Gantzer, C. (2008) Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes. Water Research 42(10-11), 2769-2777.

Långmark, J., Storey, M.V., Ashbolt, N.J. and Stenström, T.A. (2005) Accumulation and fate of microorganisms and microspheres in biofilms formed in a pilot-scale water distribution system. Applied and Environmental Microbiology 71(2), 706-712.

Leclerc, H., Schwartzbrod, L. and Dei-Cas, E. (2002) Microbial agents associated with waterborne diseases. Critical Reviews in Microbiology 28(4), 371-409.

Lehtola, M.J., Nissinen, T.K., Miettinen, I.T., Martikainen, P.J. and Vartiainen, T. (2004) Removal of soft deposits from the distribution system improves the drinking water quality. Water Research 38(3), 601-610.

Lehtola, M.J., Torvinen, E., Kusnetsov, J., Pitkänen, T., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Martikainen, P.J., Wilks, S.A., Keevil, C.W. and Miettinen, I.T. (2007) Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and caliciviruses in

drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. *Applied and Environmental Microbiology* 73(9), 2854-2859.

Lieberman, R.J., Shadix, L.C., Newport, B.S., Crout, S.R., Buescher, S.E., Safferman, R.S., Stetler, R.E., Lye, D., Shay Fout, D. and Dahling, D.R. (1994) Source water microbial quality of some vulnerable public ground water supplies. Proceeding of the water quality technology Conference, Part II, 1425-1436. American water Works Association, Denver, CO.

Lim, M.Y., Kim, J.M. and Ko, G. (2010) Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Research* 44: 3243-3251.

Manuel, C., Nunes, O. and Melo, L. (2007) Dynamics of drinking water biofilm in flow/non-flow conditions. *Water Research* 41(3), 551-562.

Martiny, A.C., Jørgensen, T.M., Albrechtsen, H.J., Arvin, E. and Molin, S. (2003) Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11), 6899-6907.

Mathieu, L., Bouteleux, C., Fass, S., Angel, E. and Block, J.C. (2009) Reversible shift in the alpha-, beta- and gamma-proteobacteria populations of drinking water biofilms during discontinuous chlorination. *Water Research* 43(14), 3375-3386.

Matson, D.O. (2004) Caliciviruses and hepatitis E virus, issue de Textbook of pediatric diseases, volume 1 et 2 5^{ème} edition Feigin, R.D., Cherry, J.D., Demmler, G.J. and Kaplan S.L., Saunders Co., Philadelphie, PA.

Maunula, L., Miettinen, I.T. and von Bonsdorff, C.H. (2005) Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerging Infectious Diseases* 11(11), 1716-1721.

Mentzing, L.O. (1981) Waterborne outbreaks of *Campylobacter enteritis* in central Swenden. *The Lancet* 318, 352-354.

Michen, B. and Graule, T. (2010) Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology* 109(2), 388-397.

Moe, C.L. (1997) Waterborne transmission of infectious agents. *Manual of Environmental Microbiology*, Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. et Walter, M.V. press Washington, DC.

Mounts, A.W., Ando, T., Koopmans, M., Bresee, J.S., Noel, J. and Glass, R.I. (2000) Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk- like viruses. *Journal of Infectious Diseases* 181 (Suppl 2), S284-S287.

Nasser, A.M. and Oman, S.D. (1999) Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Research* 33(7), 1748-1752.

Navin, T.R. and Juranek, D.D (1984) Cryptosporidiosis : clinical, epidemiologic and parasitological review. *Reviews of infectious diseases*, 6(3), 313-327.

Nelson, D.P., Rensimer, E.R. and Raffin, T.A. (1985) *Legionella pneumophila* pericarditis without pneumonia. *Archives of Internal Medicines* 145(5), 926.

Nguyen, M.H., Stout, J.E. et Yu, V.L. (1991) Legionellosis. *Infectious Disease Clinics of North America* 5, 561-584.

Nygard, K., Torven, M., Ancker, C., Knauth, S.B., Hedlund, K.O., Giesecke, J., Andersson, Y. and Svensson, L. (2003) Emerging genotype (GGIIb) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerging Infectious Diseases* 9(12), 1548-1552.

Ogorzaly, L. and Gantzer, C. (2006) Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *Journal of Virological Methods* 138(1-2), 131-139.

Ogorzaly, L. (2009) Intérêt du génotypage des phages ARN F-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux. Thèse, nancy université, 205 pages.

Ogorzaly, L., Bertrand, I., Paris, M., Maul, A. and Gantzer, C. (2010) Occurrence, survival, and persistence of human adenoviruses and F-specific RNA phages in raw groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* 76(24), 8019-8025.

Palmer, C.J., Tsai, Y.L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C. and Sangermano, L.R. (1993) detection of *Legionella pneumophila* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Applied and Environmental Microbiology* 59(11), 3618-3624

Panda, S.K., Thakral, D. and Rehman, S. (2007) Hepatitis E virus. *Reviews in Medical Virology* 17(3), 151-180.

Panda, S.K., Thakral, D. and Rehman, S. (2007) Hepatitis E virus. *Reviews in Medical Virology* 17(3), 151-180.

Parashar, U.D., Hummelman, E.G., Bresee, J.S., Miller, M.A. and Glass, R.I. (2003) Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infectious Diseases* 9(5), 565-572.

Paris, T., Skali-Lami, S. and Block, J.C. (2009) Probing young drinking water biofilms with hard and soft particles. *Water Research* 43(1), 117-126.

Payment, P., Richardson, L. and Siemiatycki, J., Dewar, R., Edwardes, M. and Franco, E (1991) Randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting microbiological standards. *American Journal of Public health* 81(6) : 703-708.

Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E. and Prevost, M. (1997) A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the

consumption of drinking water. International Journal of Environmental Health Research 7(1), 5-31.

Penrod, S.L., Olson, T.M. and Grant, S.B. (1995) Whole Particle Microelectrophoresis for Small Viruses. Journal of Colloid and Interface Science 173(2), 521-523.

Percival, S., Chalmers, R., Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J. and Wyn-Jones, P. (2004) Hepatitis E virus (HEV). Microbiology of Waterborne Diseases 31, 427-431

Pinto, R.M. and Saiz, J.C. (2007) Perspectives in Medical Virology. Bosch, A. (ed), pp. 39-67, Elsevier.

Priano, C., Arora, R., Butke, J. and Mills, D.R. (1995) A complete plasmid-based complementation system for RNA coliphage Q beta: three proteins of bacteriophages Q beta (group III) and SP (group IV) can be interchanged. Journal of Molecular Biology 249(2), 283-297.

Qaqish, A., Guastella, D.E., Dillingham, J.H. and Chase, D.V. (1995) Control of hydraulic transient in large water transmission mains, p 507-526, AWWA, Annual Conference Proceedings – Engineering and Operations, Anaheim, CA, June 18-22, 1995 American Water Works Association, Denver, CO.

Quignon, F., Kiene, L., Levi, Y., Sardin, M. and Schwartzbrod, L. (1997) Virus behaviour within a distribution system. Water Science and Technology 35(11-12), 311-318.

Rendtorff, R.C. (1978) The experimental transmission of *Giardia lamblia* among volunteers subjects. Waterborne transmission of giardiasis, Jakubowski, W. and Hoff, J.C. EPA 600/9-79-001, Cincinnati, OH p64-81.

Rice, E.W. (1999) *Escherichia coli*. AWWA manual M48 : Waterborne pathogens. American Water Works Association, Denver, CO. p75-78.

Sano, E., Carlson, S., Wegley, L. and Rohwer, F. (2004) Movement of viruses between biomes. Applied and Environmental Microbiology 70(10), 5842-5846.

Scarpino, P.V., Lucas, M., Dahling, D.R., Berg, G. and Chang, S.L. (1974) Chemistry of Water supply, Treatment, and Distribution. Rulin and (ed.), A.J. (eds), pp. 359-368, Ann Arbor Science Publisher, Inc.

Schaldach, C.M., Bourcier, W.L., Shaw, H.F., Viani, B.E. and 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), 1-10.

Schaper, M., Duran, A.E. and Jofre, J. (2002) Comparative resistance of phage isolates of four genotypes of F-specific RNA bacteriophages to various inactivation processes. Applied and Environmental Microbiology 68(8), 3702-3707.

Schijven, J.F. and Hassanizadeh, M. (2000) Removal of Viruses by Soil Passage: Overview of Modeling, Processes, and Parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30(1), 49-127.

Schijven, J.F. and Simunek, J. (2002) Kinetic modeling of virus transport at the field scale. *Journal of Contaminant Hydrology* 55, 113-135.

Schwartzbrod, J. and Schwartzbrod, L. (1999). Les agents microbiologiques d'inrétêt sanitaire des boues d'épuration. Ademe Paris, France, 71-76,.

Schwab, K (2007) Waterborne gastroenteritis viruses in *Perspectives en Medical Virology*. Bosch, A, Elsevier 17, 27-38.

Sedmak, G., Bina, D., Macdonald, J. and Couillard, L. (2005) Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a Wastewater Treatment Plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). *Applied and Environmental Microbiology* 71(2), 1042-1050.

Servais, P., Laurent, P. and Randon, G. (1995) Comparison of the bacterial dynamics in various french distribution systems. *Aqua - Journal of Water Supply: Research and Technology* 44(1), 10-17.

Shani, C., Weisbrod, N. and Yakirevich, A. (2008) Colloid transport through saturated sand columns: Influence of physical and chemical surface properties on deposition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 316(1-3), 142-150.

Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y., Urasaki, T. and Ohno, K. (2009) Comparison of behavior of two surrogates for pathogenic waterborne viruses, bacteriophages Q β and MS2, during the aluminium coagulation process. *Water Research* 43, 605-612.

Sibille, I., Mathieu, L., Paauin, J.L., Gatel, D. and Block, J.C. (1997) Microbial characteristics of a distribution system fed with nanofiltered drinking water. *Water Research* 31(9), 2318-2326.

Skraber, S., Schijven, J., Gantzer, C. and de Roda Husman, A.M. (2005) Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk? *Biofilms* 2(02), 105-117.

Skraber, S., Helmi, K., Willame, R., Ferreol, M., Gantzer, C., Hoffmann, L. and Cauchie, H.M. (2007) Occurrence and persistence of bacterial and viral faecal indicators in wastewater biofilms. *Water Science and Technology* 55(8-9), 377-385.

Skraber, S., Ogorzaly, L., Helmi, K., Maul, A., Hoffmann, L., Cauchie, H.M. and Gantzer, C. (2009) Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Research* 43(19), 4780-4789.

Sniadack, D.E., Ostroff, S.D., Karlix, M.A., Smithwick, R.W., Schwartz, B., Spaucer, M.A., Silcox, V.A. and Good, R.C. (1992) A nosocomial pseudo-outbreak of

Mycobacterium xenopi due to a contaminated potable water supply : lessons in prevention. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 14, 636-641.

Sobsey, M.D., Fuji, T. and Shields, P.A. (1988) Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochloramine. *Water Science and Technology* 20(11-12), 385-391.

Storey, M.V. and 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(12), 133-138.

Storey, M.V. and Ashbolt, N.J. (2003) Enteric virions and microbial biofilms--a secondary source of public health concern ? *Water Science and Technology* 48(3), 97-104.

Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell, H.D., Jr., Geldreich, E., Payne, B.J., Meyer, A., Jr., Wells, J.G., Greene, K.D., Bright, M., Bean, N.H. et Blake, P.A. (1992) A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Annals of Internal Medicine* 117(10), 812-819.

Syngouna, V.I. and Chrysikopoulos, C.V. (2010) Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. *Environmental Science and Technology* 44, 4539-4544.

Ta, A.C., Stout, J.E., Yu, V.L. and Wagener, M.M. (1995) Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations of standardization of such methods. *Journal of clinical Microbiology* 33, 2118-2123.

Tartera, C. and Jofre, J. (1987) Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology* 53(7), 1632-1637.

Tartera, C., Jofre, J. and Lucena, F. (1988) Relationship between numbers of enteroviruses and bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in different environmental samples. *Environmental Technology Letters* 9, 407-410.

Taylor, R.H., Falkinham, J.O., Norton, C.D. and leChevallier, M.W. (2000) Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4), 1702-1705.

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J. and Gerba, C.P. (2003) Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7): 3979-3985.

Tucker, A.W., Haddix, A.C., Bresse, J.S., Holman, R.C., Parashar, U.D., Glass, R.I. (1998) Cost-effectiveness Analysis of a Rotavirus Immunization Program for the United States. *Journal of the American Medical Association* (279), 1371-1376.

van Voorthuizen, E.M., Ashbolt, N.J. and Schafer, A.I. (2001) Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *Journal of Membrane Science* 194, 69-79.

Vanden Bossche, G. (1994) Alteration of viral infectious behavior by surface active agents. *Microbiological Research* 149(2), 105-114.

Walski, T.M. et Lutes, T.L. (1994) Hydraulic transient cause low-pressure problems. *Journal of American Water Works Association* 86(12), 24-32.

WHO. (2009) Weekly epidemiological record. World Health Organization n°84, 533-540.

WHO (2011) Guidelines for Drinking Water Quality 4th edition. World Health Organization, 518 pages.

Woody, M.A. and Cliver, D.O. (1995) Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q beta. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4), 1520-1526.

Yahya, M.T., Galsomies, L., Gerba, C.P. and Bales, R.C. (1993) Survival of bacteriophages MS-2 and PRD-1 in ground water. *Water Science and Technology* 27(3-4), 409-412.

Yates, M.V. and Gerba, C.P. (1985) Factors controlling the survival of viruses in groundwater. *Water Science and Technology* 17(4-5), 681-687.

Zita, A. and Hermansson, M. (1997) Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Applied and Environmental Microbiology* 63(3), 1168-1170.

Annexes

Annexe 1 : Milieux nécessaires à la production et au titrage des phages ARN F-spécifiques

1. TYGB: Bouillon tryptone-extrait de levure-glucose

- Milieu de base

Bacto tryptone	10 g
Extrait de levure	1 g
Chlorure de sodium (NaCl)	8 g
Eau distillée	1 000 ml

Dissoudre les composants dans l'eau chaude. Ajuster le pH de sorte qu'après la stérilisation il soit de $7,2 \pm 0,1$ à 25°C . Répartir le milieu dans les fioles par volumes de 50 ml et stériliser à l'autoclave à $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min.

Stockage : $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité (6 mois maximum).

- Solution calcium-glucose

Chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2, \text{H}_2\text{O}$)	3 g
Glucose	10 g
Eau distillée	100 ml

Dissoudre les composants dans l'eau tout en chauffant doucement. Refroidir à température ambiante et stériliser en filtrant sur une membrane de porosité $0,22 \mu\text{m}$.

Stockage : $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité (6 mois maximum).

- Milieu complet

Milieu de base	50 mL
Solution Glucose-Calcium	0,5 mL

Stockage : $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité (6 mois maximum).

2. TYGA: Gélose tryptone-extrait de levure-glucose

- Milieu de base

Bacto tryptone	10 g
Extrait de levure	1 g
Chlorure de sodium (NaCl)	8 g
Agar	16 g
Eau distillée	1 000 ml

Dissoudre les composants dans l'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après la stérilisation il soit de $7,2 \pm 0,1$ à 25°C . Répartir le milieu dans les flacons par volumes de 500 ml et stériliser à l'autoclave à $12 \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min.

Stockage : $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité (6 mois maximum).

- **Milieu complet**

Milieu de base	500 mL
Solution Glucose-Calcium	5 mL

Le milieu complet est coulé dans des boîtes de Pétri (20 ml par boîte pour des boîtes de 90 mm de diamètre).

Laisser se solidifier et conserver dans l'obscurité à $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 6 mois maximum s'il est bien protégé contre la dessiccation.

3. ssTYGA: Gélose semi-solide tryptone-extrait de levure-glucose

Préparer un milieu de base conformément au TYGA, en utilisant seulement la moitié de la masse d'agar (8 g). Répartir dans des flacons par volumes de 50 ml et stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Stockage : $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité (6 mois maximum).

Annexe 2 : Réactifs nécessaires au dosage du chlore

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

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : Vendredi 13 juillet 2012

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE présenté par PELLEIEUX Sandra <u>Sujet</u> : « Les phages : un outil d'aide à l'évaluation du comportement des virus pathogènes en réseau d'eau potable » <u>Jury</u> : Président : Pr Christophe GANTZER, PU, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine Directeur : Dr Isabelle BERTRAND, MCU, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine Juges : Dr. Nathalie DIGUIO, PH, Centre Hospitalier Emile Durkheim d'Epinal Dr. Béatrice DEMORE, MCU-PH, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine Dr. Pascal DRACULOVSKI, MCU, Faculté de Pharmacie, Université Montpellier I	Vu, Nancy, le 10 juin 2012 Le Président du Jury Le Directeur de Thèse   M. le Professeur GANTZER M. BERTRAND
Vu et approuvé, Nancy, le 18 Juin 2012 Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine.  Francine PAULUS FACULTE DE PHARMACIE	Vu, Nancy, le 21 06 2012 L'Administrateur Provisoire de l'UDL,  Pierre MUTZENHARDT N° d'enregistrement : 4026

N° d'identification :

TITRE

Les phages : un outil d'aide à l'évaluation du comportement des virus entériques pathogènes en réseau d'eau potable

Thèse soutenue le 13 juillet 2012

Par PELLEIEUX Sandra

RESUME :

L'eau est une ressource sensible qui peut être soumise à des contaminations de nature chimique ou microbiologique ayant un impact direct sur la santé publique. Malgré l'application de traitements de potabilisation performants et d'un contrôle sanitaire, des cas d'épidémies liées à la consommation d'eau potable sont relevés dans les pays développés. Les paramètres microbiologiques du contrôle sanitaire sont exclusivement de nature bactérienne. Or, les virus représentent une grande partie des épidémies d'origine hydrique et les moyens de prise en charge thérapeutique sont très limités. C'est pourquoi il est nécessaire d'améliorer les connaissances concernant le comportement des particules virales dans les réseaux de distribution d'eau, afin d'améliorer les méthodes de prise en charge et d'élimination d'une telle contamination.

Dans ce cadre, cette étude visait à étudier le phénomène d'adsorption virale sur les surfaces colonisées par un biofilm d'eau potable. L'objectif était également d'évaluer l'efficacité d'un traitement par chloration de l'eau sur les virus adsorbés sur le biofilm. Les expérimentations ont été effectuées à l'aide de réacteurs permettant de simuler une canalisation d'eau et dans lesquels étaient introduits deux bactériophages ARN F-spécifiques –MS2 et Q β - connus pour avoir des propriétés de surface différentes et utilisés en temps que modèles d'étude des virus entériques pathogènes.

Les principales conclusions sont que les propriétés de surface des phages ont un impact significatif sur leur adsorption aux surfaces et que le biofilm représente une surface adhésive qui favorise l'adsorption virale. Enfin, le biofilm joue un rôle protecteur pour les virus face à la chloration y compris pour de fortes concentrations (5mg Cl₂/L).

MOTS CLES :

Virus entériques, bactériophages, eau de distribution, désinfection, chloration

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Isabelle Bertrand	LCPME UMR 7564/CNRS Université de Lorraine (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement)	Expérimentale Thème 2/5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle

