



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Le 26 mars 2013

par **Christelle DIKA**

née le 3 Octobre 1986

**Propriétés interfaciales des virus, concept de particules
molles multicouches, corrélation avec les capacités
d'adhésion**

Membres du jury

<u>Rapporteurs:</u>	Pr Girones R.	(Faculté de Biologie, Université de Barcelone, Espagne)
	Pr Ball V.	(INSERM, UMR 1121, Strasbourg)
<u>Examineurs:</u>	Pr Gantzer C.	(Faculté de pharmacie, LCPME, UMR 7564 CNRS Université de Lorraine, Nancy) Directeur de thèse
	Dr Duval J.F.L.	(LIEC, UMR 7360 CNRS, Vandoeuvre-lès-Nancy) Co-directeur de thèse
	Pr de Roda Husman A.M.	(RIVM, Bilthoven, Pays-Bas)
	Dr Boulanger P.	(IBBMC, UMR 8619 CNRS, Université Paris Sud)

LCPME, UMR 7564 CNRS / Université de Lorraine, Nancy

Equipe Microbiologie Environnementale

A mes parents.

Remerciements

A travers ces quelques mots, je souhaite remercier les personnes qui m'ont encadrée et soutenue durant ce parcours.

J'adresse mes plus profonds remerciements à **Christophe Gantzer**, le principal artisan de ce travail, pour m'avoir confié un sujet lui tenant particulièrement à cœur. Un chaleureux merci pour l'encadrement depuis mon master 2, la proximité et l'accessibilité dont il a fait preuve. Nos multiples réunions et échanges durant ces années de collaboration ont amplifié et consolidé mes connaissances scientifiques. Qu'il trouve en ces quelques lignes l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens particulièrement à remercier **Jérôme Duval**, qui a co-encadré ce travail pour la patience qu'il a eue face à mes lacunes en physico-chimie. Merci pour l'initiation aux particules molles, les multiples corrections et la rigueur scientifique qui ont élevé le niveau de cette thèse. Un immense merci pour sa disponibilité et les réponses rapides et efficaces à mes nombreuses requêtes. Qu'il trouve en ces quelques lignes l'expression de ma sincère gratitude.

Rosina Girones, spécialiste de virologie et de biologie moléculaire, a accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. Je suis sensible à cet honneur et lui adresse mes respectueux remerciements pour l'intérêt porté à mon travail.

Vincent Ball, spécialiste en matériaux, polymères et surfaces a accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse. Je lui en suis sincèrement reconnaissante et lui adresse mes remerciements pour l'attention portée à mon travail.

Ana Maria de Roda Husman, spécialiste de virologie de l'eau et des aliments, a généreusement accepté de participer au jury de ce travail. Qu'elle trouve ici la marque de mes respectueux remerciements.

Un grand merci à **Pascale Boulanger** en tant que spécialiste de virologie bactérienne, pour l'enthousiasme avec lequel elle a accepté de participer au jury de ce doctorat de sciences.

Aux deux directeurs du LCPME qui se sont succédé durant ces années de thèse, **Jean-Claude Block** et **Alain Walcarius** et à toutes les équipes du LCPME, site pôle de l'eau et site Villers pour leur accueil.

Ces années de thèse m'ont permis de rencontrer des collègues qui sont devenus des amis. J'adresse mes sincères remerciements à **Aline Perrin** pour la précieuse aide qu'elle m'a apportée tant sur le plan scientifique qu'informatique. Les expérimentations « douloureuses » ont participé à la qualité du travail effectué. A **Sandra Pelleieux**, que je n'aurai plus à « supporter », partenaire et handicap depuis le master 2. Merci pour la découverte du Sud !!! Pour la compagnie et le soutien durant ce chemin plein d'embûches.

Merci à mon stagiaire **Loïc**, pour sa participation à certains résultats de cette thèse.

A **Sandrine Lemoine**, pour sa gentillesse, son efficacité et sa disponibilité face à toutes mes questions.

A **David**, pour son aide technique et nos discussions « footballistiques ».

A toute l'équipe du laboratoire, site de la faculté de pharmacie : **Isabelle**, **Sandrine B**, **Erell**, **Auréli**e et tous les autres, pour les moments conviviaux passés ensemble.

A **Christophe Merlin** pour son aide lors de la synthèse des VLPs. Les différentes expérimentations au pôle de l'eau se sont toujours bien déroulées grâce à sa présence.

Merci à **Gregory Francius** pour la découverte de l'AFM.

Aux équipes du Laboratoire environnement Minéralurgie (LEM), **Céline** et **Yves** pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire lors de mes différentes expérimentations. Un merci particulier à **Isabelle Bihannic** et **Laurent Michot** pour l'expérience au synchrotron.

Merci à mes amis **Sandrine**, **Claude** et **Gaëlle** pour m'avoir soutenue pendant cette période et un merci particulier à **Jean-Frédéric** pour la relecture de ce travail « hors de sa portée ».

Un énorme merci à ma famille : mes sœurs et frères, **Hermine**, **Sabine**, **Pascal**, **Stéphanie** et **Francis** mais également **Alex**, « my special one » et tous les autres (cousins, tantes, oncles), pour le soutien, la patience et les nombreux encouragements. Une pensée spéciale pour **mes parents**, ma principale motivation, sans qui je n'en serai pas arrivée là et à qui je dédie ce travail avec tout mon amour et ma reconnaissance éternelle.

Liste des abréviations

A°:	Ångström
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
AFM:	Atomic Force Microscopy
ARN:	Acide RiboNucléique
CFM:	Chemical Force Microscopy
CsCl:	Chlorure de césium
Da:	Dalton
db:	Double brin
DLVO theory:	Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek theory
FCV:	Feline CaliciVirus
MNV:	Murine NoroVirus
NaNO ₃ :	Nitrate de sodium
pb:	Paire de bases
PEG :	PolyEthylène Glycol
<i>pI</i> :	Point Isoélectrique
RMS:	Root-mean square
SAXS:	Small-Angle X-ray Scattering
sb:	Simple brin
UFP:	Unité Formant Plage
VHA:	Virus de l'Hépatite A
VHE:	Virus de l'Hépatite A
VLP :	Virus Like Particles
μ :	Mobilité électrophorétique

Table des matières

Introduction	4
Objectifs.....	7
1^{ère} partie: Etude bibliographique.....	10
I. LES VIRUS ET LE MILIEU HYDRIQUE	11
I.1. Les virus entériques pathogènes	12
I.2. Les bactériophages fécaux.....	15
II. STRUCTURES DES PARTICULES VIRALES A SYMETRIE ICOSAEDRIQUE.....	16
II.1. Les bactériophages ARN F-spécifiques	16
II.1.1. La capside.....	18
II.1.2. Organisation du génome viral	23
II.1.3. Réplication	24
II.2. Le phage Phi X 174	25
II.2.1. La capside.....	25
II.2.2. Organisation du génome viral	27
II.2.3. Réplication	28
II.3. Le phage PRD1	29
II.3.1. La capside.....	29
II.3.2. Organisation du génome viral	32
II.3.3. Réplication	33
II.4. Les VLPs	35
II.4.1. Intérêt des VLPs	35
II.4.2. Synthèse des VLPs	37
III. VIRUS ET PARTICULES MOLLES: PROPRIETES INTERFACIALES DES VIRUS	38
III.1. La charge électrostatique	38
III.2. La balance hydrophile/hydrophobe.....	45
IV. LES MECANISMES D'ADHESION/AGREGATION	47
IV.1. Les forces colloïdales.....	47
IV.1.1. Les interactions électrostatiques.....	48
IV.1.2. Les interactions de van der Waals.....	48
IV.1.3. Les interactions hydrophobes.....	49
IV.2. Aspects théoriques des mécanismes d'adhésion/agrégation.....	49

IV.2.1. Le mouvement Brownien	49
IV.2.2. La DLVO et ses limites	50
IV.2.3. Mécanisme d'agrégation	51
IV.3. Les facteurs physico chimiques influençant l'adhésion/agrégation.....	53
IV.3.1. Composition et concentration en ions	53
IV.3.2. pH.....	55
IV.3.3. Hydrophobicité	56
IV.3.4. Hydrodynamique.....	56
IV.3.5. Température	57
IV.3.6. Surface de contact	57
IV.3.7. Matière organique	58
 2e partie: Impact du génome sur les propriétés interfaciales du bactériophage MS2 et influence de la méthode de purification.....	59
I. Impact de l'ARN interne sur l'agrégation et l'électrocinétique: comparaison entre MS2 et VLPs correspondantes	60
II. Impact du protocole de purification virale sur l'agrégation et l'électrocinétique du bactériophage MS2 et des VLPs correspondantes	74
 3e partie: Impact des propriétés interfaciales sur les capacités d'adhésion virale	87
I. Adhésion des bactériophages ARN F-spécifiques à des surfaces abiotiques: Importance de la rugosité, des interactions hydrophobes et électrostatiques.....	88
II. Relation entre les propriétés interfaciales des bactériophages MS2, Phi X 174 et PRD1 et les capacités d'adhésion: Concept de particules molles à multicouches.	102
 4e partie: Discussion - Conclusion	134
 <i>Références bibliographiques.....</i>	<i>142</i>

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

Liste des figures

Figure 1. Cycle de contamination virale du milieu hydrique.	12
Figure 2. Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages.	15
Figure 3. Symétrie d'un icosaèdre comprenant des axes de rotation d'ordre 2, 3 et 5.	18
Figure 4. Capside du bactériophage MS2. Représentation des structures des dimères de la protéine de capsid sous les deux conformations (a) A/B et (b) C/C. les dimères sont visualisés de l'extérieur en regardant vers le centre de la particule, les différents conformères sont colorés en bleue (A), vert (B) et rouge (C). (c) Assemblage de 60 copies du dimère A/B et 30 copies du dimère C/C ($T=3$).	19
Figure 5. Les interactions le long des axes d'ordre 3 et d'ordre 5 qui relient les boucles.	21
Figure 6. Structures interne et externe du bactériophage MS2.	22
Figure 7. Diagramme des acides aminés conservés et variables au niveau du site de liaison de l'ARN de MS2, Q β et GA.	22
Figure 8. Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2 et Q β	24
Figure 9. Morphogenèse de la capsid des Microvirus.	26
Figure 10. Représentation de l'organisation des gènes le long du génome de Phi X 174.	28
Figure 11. Représentation schématique de la structure du bactériophage PRD1.	31
Figure 12. Représentation du génome de l'entérobactériophage PRD1 indiquant l'organisation des gènes et des promoteurs dans la direction de lecture.	32
Figure 13. Représentation schématique du cycle de vie du bactériophage PRD1.	35
Figure 14. Impact de la quantité d'acide nucléique (ARN) à proximité de la capsid (ω_{23}) dans des conditions où la perméabilité du flux (λ_0^{-1}), est de l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la capsid (δ_3). ..	45
Figure 15. Profil énergétique E_T résultant des différentes forces entrant dans la théorie de la DLVO (selon Malescio, 2003).	50
Figure 16. Impact de la probabilité de collision sur la structure des agrégats suivant le mécanisme DLCA ou RLCA.	52
Figure 17. Diamètre des phages MS2 (A) et des VLPs-MS2 (B) en fonction du pH à 1 mM de NaNO $_3$. ..	61
Figure 18. (A) Reconstruction qualitative du positionnement respectif de la mobilité par rapport à des courbes de force ionique pour MS2 et VLPs-MS2. Profils spatiaux de la friction ($\sim 1/\text{Permeability}$) (B) et de la densité de charge (C).	62
Figure 19. Diamètre des phages MS2 (A) et des VLPs-MS2 (B) en fonction du pH à 1 mM de NaNO $_3$ en fonction des trois méthodes de purification.	75

Figure 20. Mobilités électrophorétiques de MS2 et des VLPs-MS2 en fonction du logarithme de la force ionique à un pH 7. Les résultats sont présentés en fonction de la méthode de purification: la dialyse (A), l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (B) et la précipitation au polyéthylène glycol (PEG) (C).....	76
Figure 21. Adhésion de MS2, GA et Q β sur une surface hautement hydrophobe (1-dodécane-thiol surface).....	89
Figure 22. A: Distribution statistique des forces d'adhésion mesurées par microscopie à force chimique (CFM) entre une pointe AFM hydrophobe (-CH ₃) et les différents supports (a) 1-dodécane-thiol, (b) lame de verre, (c) inox et (d) polypropylène. B: Topographie tridimensionnelle des supports obtenus par AFM en mode contact. (a) 1-dodécane-thiol solution, (b) verre (c) inox (d) polypropylène	90
Figure 23. Adhésion de MS2, GA et Q β sur les différentes surfaces..	91
Figure 24. Mobilités électrophorétiques (μ) des bactériophages MS2, Phi X 174 et PRD1 en fonction du logarithme de la force ionique à pH 7.	102
Figure 25. Adhésion des bactériophages MS2, Phi X 174 et PRD1 sur des membranes positives et négatives.	103

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux virus entériques pathogènes pour l'homme retrouvés dans le milieu hydrique.	13
Tableau 2. Classification des Leviviridae.	17
Tableau 3. Protéines codées par l'ADN du phage Phi X 174 et leurs fonctions.	27
Tableau 4. Protéines de PRD1 et leurs fonctions.	30
Tableau 5. pI théoriques de la protéine de capsid de quatre phages ARN F-spécifiques.	39
Tableau 6. Points isoélectriques (pI) expérimentaux de certains virus pathogènes pour l'homme (A) et de bactériophages (B).	42

Introduction

Les virus sont des particules biologiques situées à la frontière du monde vivant: ils sont placés à la limite entre le vivant et l'inerte. En effet, en dehors de leurs cellules hôtes, ces microorganismes ne possèdent pas de métabolisme propre, ils n'expriment pas de réponse active aux différents stress environnementaux. Dans l'impossibilité de se répliquer, c'est dans les caractéristiques de surface que se trouve la clé de la compréhension de leur comportement dans un environnement donné.

Les virus entériques pathogènes (*Norovirus*, virus de l'Hépatite A par exemple...) et les bactériophages fécaux non pathogènes (bactériophages ARN F-spécifiques, coliphages somatiques, phages de *Bacteroides fragilis*) infectent les bactéries du tractus digestif et peuvent être présents dans l'environnement hydrique après une pollution fécale. Suite à leur excrétion dans les eaux usées, les propriétés de surface de ces virus définissent leur capacité à passer la barrière des traitements (des eaux usées ou de potabilisation), à être disséminés dans l'environnement hydrique (eaux de mer, eaux de rivière) voire à s'adsorber sur des aliments (fruits de mer, végétaux). C'est ainsi que ces virus peuvent recoloniser l'homme par voie orale.

La caractérisation fine des propriétés de surface des virus se heurte à plusieurs écueils liés à la nature même des virus, aux méthodologies disponibles voire aux concepts mis en place pour les étudier. Ainsi, même en restreignant nos virus d'intérêt à ceux présents dans les matières fécales et malgré l'apparente simplicité structurale de ces virus (capside protéique + génome), la variabilité est extrêmement importante en termes d'organisation de la capsid, de sa composition en acides aminés, de la nature de l'acide nucléique, de sa taille et de sa séquence mais aussi de l'organisation du génome par rapport à la capsid.

Les virus ont été découverts il y a de cela une centaine d'années, mais la culture *in vitro* de virus pathogènes et la visualisation en microscopie électronique n'ont été effectuées qu'à partir de 1948. Encore à l'heure actuelle certains virus pourtant très importants d'un point de vue épidémiologique ne sont pas cultivables (*Norovirus*). Il devient alors difficile de disposer de stocks viraux suffisamment importants pour l'étude des propriétés de surface. Ainsi, une stratégie largement utilisée est la construction de *Virus Like Particles* (VLPs, virus sans génome) permettant d'étudier le comportement de ces virus dans des environnements donnés en faisant l'hypothèse que les VLPs présentent les mêmes propriétés de surfaces que les virus correspondants. Les propriétés de surface les plus importantes sont représentées par la charge du virus et sa balance hydrophile/hydrophobe. Les méthodes disponibles pour les définir sont récentes et parfois d'interprétation difficile. De nombreux points isoélectriques (*pI*) sont

disponibles pour les virus (Overby et *al.*, 1966; Penrod et *al.*, 1995; Redman et *al.* 1997; Langlet et *al.* 2008a) mais cette mesure qualitative n'est pas apte à prévoir les phénomènes d'adhésion/agrégation (Michen et Graule, 2010). La mesure de la mobilité électrophorétique sans marquage, qui est une technique plus récente, se base alors sur la théorie DLVO à travers des mesures de potentiel zêta s'appliquant aux particules dites « dures ». Certains auteurs décrivent le fait que les mobilités électrophorétiques ne peuvent en aucun cas être liées à un potentiel zêta ou une charge de surface car cela reviendrait à assimiler les virus à des particules non perméables alors qu'il s'agirait en réalité de particules molles, perméables et fortement hétérogènes (Langlet et *al.*, 2008a; Duval et Gaboriaud, 2010). Dans le détail, le pI des particules molles est l'association (force ionique-dépendant) des propriétés électrostatiques et du degré de perméabilité des différentes couches constituant la particule entière. Pour le bactériophage MS2 (phage ARN F-spécifique) par exemple, la valeur mesurée de pI ($\sim 3,5 - 3,9$) est plus faible que si l'on considère uniquement la capsid ($pI > 8$) (Penrod et *al.*, 1996; Schaldach et *al.*, 2006; Langlet et *al.*, 2008a). La raison physique de cette déviation résulte de la pénétration importante du flux électrocinétique (au niveau de la couche contenant l'ARN). Ainsi, pour parvenir à une interprétation quantitative de la réponse électrocinétique des virus, une évaluation rigoureuse des équations électrohydrodynamiques de base doit être effectuée, en tenant compte des variations de densité de la matière molle, de la composition chimique et du degré de pénétration de flux à partir du centre du virus jusqu'à la couche périphérique extérieure (Langlet et *al.*, 2008a). Plus qu'une surface, on parle d'interphase virale et de propriétés interfaciales.

Ce concept de particules molles, concernant les virus, a été démontré de manière théorique par Langlet et *al.*, (2008a) et nécessite une approche expérimentale pour confirmer et améliorer les connaissances concernant les propriétés interfaciales des virus. Néanmoins le fait de considérer les virus comme des particules molles est encore assez contesté (Nguyen et *al.*, 2011).

Ainsi, l'appréhension de l'impact des propriétés interfaciales sur les mécanismes d'adhésion virale sur différents supports ou encore sur le processus d'agrégation virale pourrait être améliorée. De même la comparaison à travers ce concept, des propriétés interfaciales de virus à structures différentes pourrait être évaluée.

Objectifs

L'objectif de ce travail est de caractériser les propriétés de surface virales selon le concept de particules molles multicouches et de faire le lien avec les capacités d'adhésion et d'agrégation des virus.

Dans un premier temps, nous effectuerons pour la première fois une comparaison des mobilités électrophorétiques et de la stabilité particulaire (agrégation) de particules virales complètes (le phage MS2) et de particules virales sans génome (VLPs) tentant ainsi de mettre en évidence une possible influence du génome sur les propriétés interfaciales du bactériophage MS2.

Il semble probable que les méthodes de purification des particules virales (gradient de densité, précipitation, dialyse...) peuvent interférer avec les propriétés de surface. De ce fait, dans un second temps, l'influence de la méthode de purification sur l'agrégation et l'électrocinétique en prenant pour exemple le phage MS2 va être évaluée.

Dans un troisième temps, nous comparerons les caractéristiques interfaciales de différents virus d'une même famille (*Leviviridae*, MS2, Q β et GA) en terme de charge électrostatique (selon le concept de particules molles) et en terme de balance hydrophile/hydrophobe (mesure de la capacité d'adhésion sur des supports hydrophobes). Ces propriétés interfaciales seront ensuite mises en relation avec les capacités d'adhésion sur des supports à caractéristiques différentes (hydrophobicité, rugosité).

Enfin, nous tenterons d'étendre ce concept de particules molles multicouches. Pour ce faire, la mobilité électrophorétique et l'agrégation de virus à structures très différentes seront étudiées. Nous utiliserons plusieurs modèles viraux, certains à deux couches (capside + génome) et un autre modèle à trois couches (capside + enveloppe interne + génome). Les deux modèles à deux couches sont: le bactériophage MS2 possédant une capsid de 20 à 30 nm de diamètre avec des pores à sa surface et un ARN de 3560 nucléotides; le bactériophage Phi X 174 constitué d'une capsid dépourvue de pores de 25 nm de diamètre et d'un ADN simple brin circulaire de 5386 nucléotides. Le modèle à trois couches est le bactériophage PRD1 constitué d'une capsid protéique de 65 nm de diamètre à l'intérieur de laquelle se trouve une membrane protéolipidique et enfin un ADN double brin de 14 925 paires de bases.

Ce mémoire s'articule ainsi en différentes parties. Une première partie consacrée à l'étude bibliographique des différents modèles utilisés comme substituts de virus entériques pathogènes pour l'homme et aussi à l'état actuel des connaissances sur les propriétés dites de

‘surface’ des virus. Ensuite, les parties intermédiaires traiteront des différents résultats obtenus concernant les objectifs ci-dessus, décrits sous forme d’articles scientifiques en anglais. Chaque publication sera précédée d’un résumé en français. Enfin l’ensemble des résultats sera discuté dans une dernière partie.

1^{ère} partie

Etude bibliographique

I. LES VIRUS ET LE MILIEU HYDRIQUE

Selon certains, les bactériophages seraient les organismes les plus abondants dans l'environnement hydrique et jouent un rôle important dans l'équilibre des écosystèmes (Paul et Kellogg, 2000). Certains d'entre eux proviendraient d'une pollution d'origine fécale (bactériophages fécaux) mais ne sont présents que de manière transitoire dans l'environnement hydrique. Ces derniers « vivent » aux dépens des bactéries du tractus intestinal des hommes et des animaux (bactériophages ARN F-spécifiques, coliphages somatiques, phages de *Bacteroides fragilis*). De la même manière, des virus pathogènes pour l'homme ou pour l'animal peuvent se retrouver dans le milieu hydrique suites à des excréctions de selles d'individus infectés. Il s'agit des virus entériques pathogènes, ces derniers constituent un réel problème de santé publique.

Qu'ils s'agissent des bactériophages ou des virus entériques pathogènes, ceux-ci transitent dans le milieu hydrique selon le cycle de contamination virale classiquement admis (Figure 1). Par conséquent, l'eau pourrait être une source d'épidémie hydrique soit directement via l'eau potable (Maunula et *al.*, 2005; Sinclair et *al.*, 2009), soit indirectement via des eaux d'irrigations ou par contamination des aires de croissance de fruits de mer (Koopmans et Duizer, 2004; Westrell, 2010). La consommation d'aliments contaminés reste un important facteur de risque pour les épidémies virales (Barrabeig et *al.*, 2010) par exemple des épidémies liées aux framboises congelées sont très courantes (Maunula et *al.*, 2009). De ce fait, la préoccupation est importante quant à l'exposition des humains aux eaux ou aliments contaminés par les virus entériques (Koopmans et Duizer, 2004). Une parfaite connaissance du comportement des virus au niveau des différents maillons de ce cycle est indispensable pour entraver la transmission des virus entériques via le milieu hydrique. Les virus sont incapables de se multiplier à l'intérieur du cycle (Jofre, 2009) mais c'est au niveau des différents maillons que les propriétés interfaciales vont jouer un rôle primordial dans la dissémination virale. En effet, c'est dans leur capacité de se répandre et leur résistance aux traitements que se situe la clé de la recolonisation d'un hôte par ces virus.

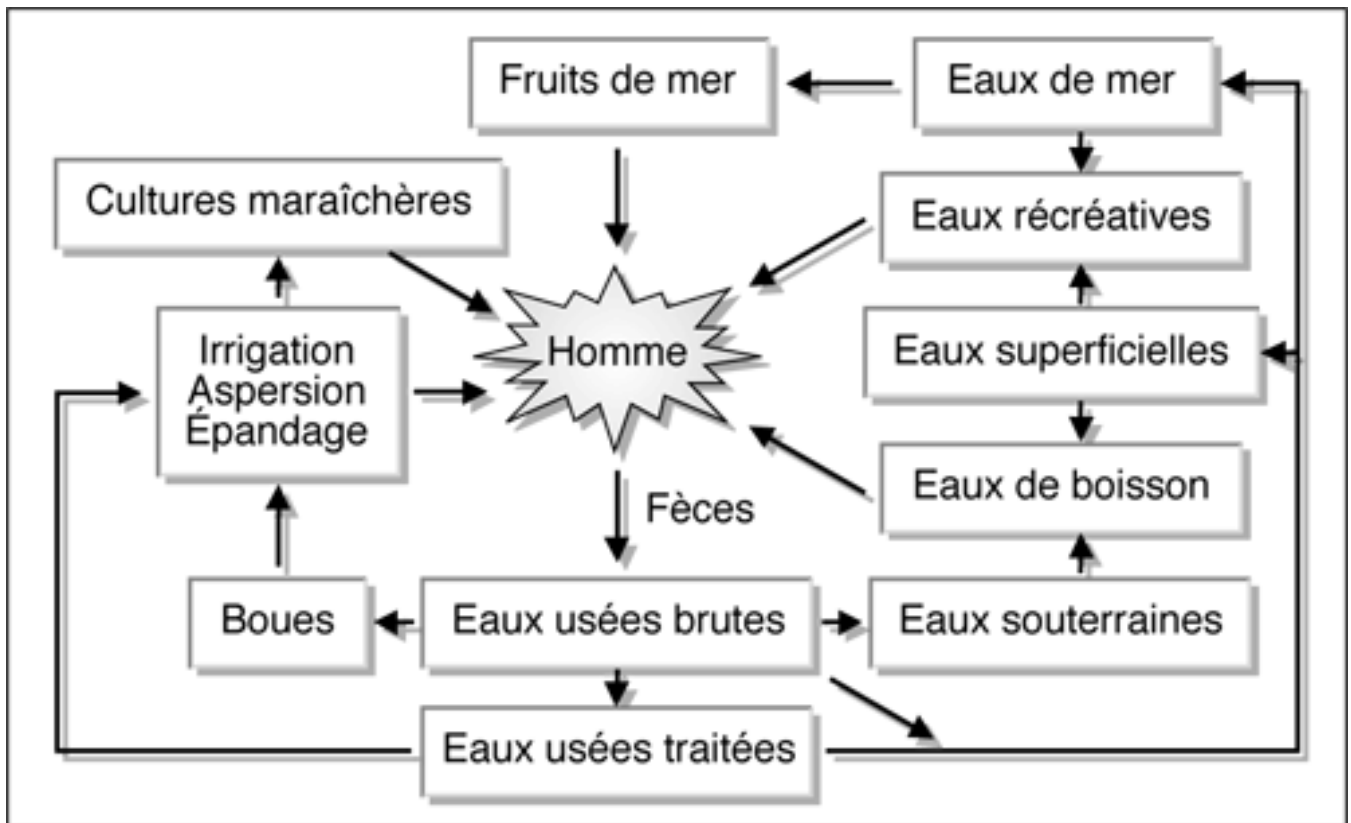


Figure 1. Cycle de contamination virale du milieu hydrique (Schwartzbrod, 1991).

I.1. Les virus entériques pathogènes

Les virus peuvent être classés en fonction de leur famille, de la présence ou non d'enveloppe, de la nature de l'acide nucléique, du genre et de l'espèce (Tableau 1). Tous les principaux virus entériques pathogènes pour l'homme retrouvés dans l'eau sont des virus non enveloppés et la plupart ont un diamètre variant de 20 à 30 nm et un génome à ARN simple brin excepté les *Adenoviridae* et les *Reoviridae* qui ont des diamètres plus élevés.

Tableau 1. Principaux virus entériques pathogènes pour l'homme retrouvés dans le milieu hydrique (Selon Koopmans et Duizer, 2004 et le Comité International de Taxonomie Virale, ICTV 2011).

Familles	Taille (nm)	Nu ou Enveloppé	Nature de l'acide nucléique	Genres	Espèces	Pouvoir pathogène
<i>Picornaviridae</i>	20-30	Nu	ARN sb (7,4-7,7 kb)	<i>Enterovirus</i>	<i>Poliovirus</i>	Paralysie, méningite, fièvre, poliomyélite
					<i>Enterovirus humains (A, B, C, D et E)</i>	Méningite, encéphalite, atteinte des voies respiratoires, conjonctivite hémorragique
					<i>Echovirus</i>	Méningite, infection respiratoire, éruption cutanée, fièvre, Diarrhée
				<i>Hepatovirus</i>	<i>Virus de l'hépatite A</i>	Hépatite infectieuse
<i>Reoviridae</i>	80-85	Nu	ARN db Segmenté (16-23,7 kpb)	<i>Orthoreovirus</i>	<i>Reovirus de mammifères</i>	Infections respiratoires , digestives
				<i>Rotavirus</i>	<i>Rotavirus A, B et C</i>	Gastro-entérite infantile
<i>Caliciviridae</i>	35-40	Nu	ARN sb (7,3-7,7 kb)	<i>Norovirus</i>	<i>Norovirus : GI, GII</i>	Gastro-entérite
				<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo virus</i>	
<i>Hepeviridae</i>	25-35	Nu	ARN sb (7-7,3 kb)	<i>Hepevirus</i>	<i>Virus de l'hépatite E</i>	Hépatite infectieuse
<i>Adenoviridae</i>	70-90	Nu	ADN db (30-36 kbp)	<i>Mastadenovirus</i>	<i>Adenovirus humains</i>	Infection respiratoire, conjonctivite et gastro-entérite
<i>Astroviridae</i>	25-30	Nu	ARN sb (6,8-7,9 kb)	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Astrovirus humains</i>	Gastro-entérite

Les données sur les maladies virales d'origine hydrique et alimentaire sont fragmentées et regroupées selon les pays (WHO/FAO, 2008). Cependant, une évidence épidémiologique indique que les *Norovirus* sont la cause majeure des épidémies de gastro-entérites (Kroneman et *al.*, 2007). Les fruits de mer, particulièrement les huîtres sont le plus souvent considérés comme les véhicules les plus fréquents d'épidémies de *Norovirus* (EFSA, 2011). Dans une moindre mesure, les rotavirus sont aussi impliqués dans les maladies d'origine alimentaire et constituent une importante cause de mortalité chez les jeunes enfants dans les pays en voie de développement (WHO/FAO, 2008; EFSA, 2011). Dans ces pays, on note également une forte prévalence des virus de l'hépatite A (Gust et *al.*, 1992; Buisson et Nicand, 2005) et de l'hépatite E (Nicand et *al.*, 2008), souvent parce que le traitement des eaux usées est mal maîtrisé. Suite à l'amélioration des conditions sanitaires dans les pays développés, l'incidence de l'hépatite A a diminué. Cependant, les virus de l'hépatite A (VHA) et de l'hépatite E (VHE) restent les causes mondiales majeures d'hépatites virales aiguës (Mackiewicz et *al.*, 2006; Purcell et *al.*, 2008).

Il est difficile d'enrayer ces problèmes épidémiologiques de part l'absence de cultures de ces virus pathogènes mais aussi parce que leur résistance aux différents traitements est difficile à estimer d'où la nécessité d'utiliser des modèles de structures approximativement similaires tels que des virus animaux murins (MNV: *Murine Norovirus*) et félins (FCV: *Feline Calicivirus*) (Baert et *al.*, 2009; Fraisse et *al.*, 2011; Deboosere et *al.*, 2012) mais également des bactériophages (Collins et *al.*, 2006 ; Shirasaki et *al.*, 2009 ; Black et *al.*, 2010).

Une alternative pour pouvoir étudier les propriétés de surface des virus entériques pathogènes est d'élaborer des particules synthétiques incomplètes, les *Virus Like Particles* (VLPs). Habituellement, les VLPs sont produites après l'expression des gènes de structure d'une protéine de capsid du virus. Suite à leur expression, ces protéines de capsid ont la capacité de s'auto-assembler pour former des particules hypothétiquement vides. Les premières VLPs de *Norovirus* ont été produites pour le virus de Norwalk en 1992, et cette initiative conduit à l'utilisation de ces particules comme des systèmes modèles (Jiang et *al.*, 1992) pour la compréhension et la prédiction du comportement des virus dans les procédés de filtration (Redman et *al.*, 1997; Shirasaki et *al.*, 2009), ou en termes de persistance dans les coquillages (Loisy et *al.*, 2004). Les VLPs de *Norovirus* sont morphologiquement et antigéniquement analogues aux virus dont ils sont dérivés, à l'exception de la présence du génome viral. Ces particules ne sont par conséquent pas pathogènes et ont démontré des

caractéristiques de stabilité similaires quant à leur intégrité à l'égard de conditions de pH et de température (Ausar et *al.*, 2006). Ces particules seraient d'ailleurs à la base d'un futur vaccin contre les *Norovirus*.

I.2. Les bactériophages fécaux

Certains bactériophages infectent spécifiquement les bactéries du tractus intestinal, ce sont les bactériophages fécaux. Ces phages à l'aide de leurs hôtes, les bactéries du tractus digestif, vont se multiplier et ensuite être excrétés en très grande quantité dans les matières fécales. Compte tenu de la diversité bactériologique du tractus intestinal appelée microbiote, il est probable qu'un grand nombre de bactériophages fécaux soient inconnus. Certains ont été identifiés car ils avaient un intérêt pratique d'indicateur de pollution fécale. Les bactériophages susceptibles d'être excrétés dans les selles et d'être retrouvés dans le milieu hydrique sont très nombreux et appartiennent à 6 familles, ils sont regroupés classiquement en 3 catégories: les coliphages somatiques (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Microviridae*), les phages de *Bacteroides fragilis* (*Siphoviridae*) et les phages F-spécifiques (*Leviviridae* et *Inoviridae*) (Tartera et Jofre, 1987; Tartera et *al.*, 1988; Borrego et *al.*, 1990) (Figure 2).

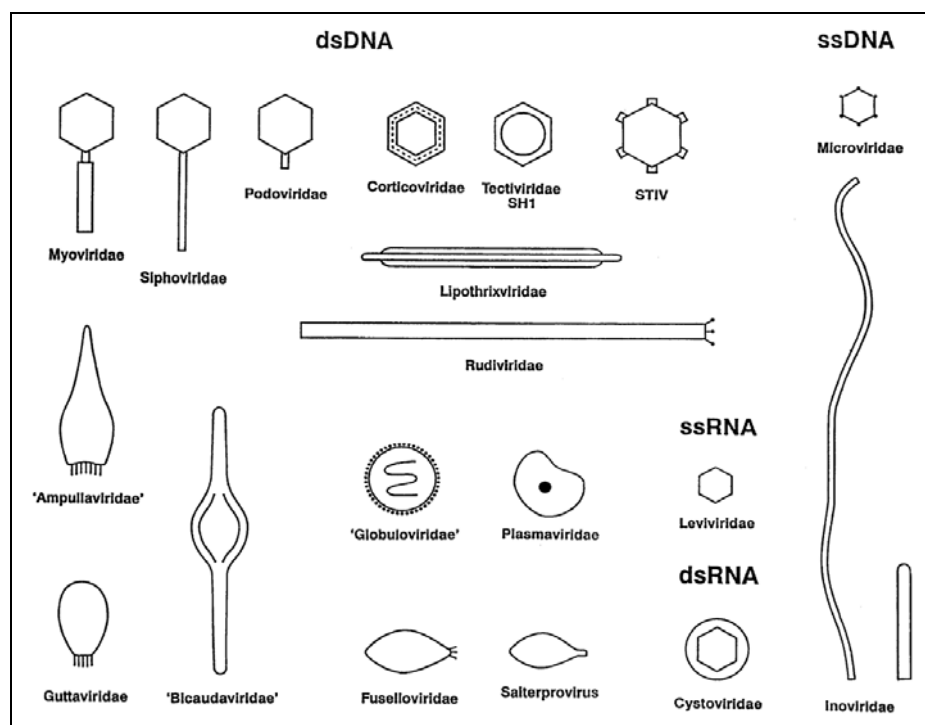


Figure 2. Représentation schématique des principaux groupes de bactériophages (Ackermann, 2007). Légende : dsDNA = ADN double brin ; ssDNA = ADN simple brin ; ssRNA = ARN simple brin ; dsRNA = ARN double brin.

Le développement de la microscopie électronique à transmission a permis d'illustrer la diversité morphologique des virus. Les bactériophages regroupent majoritairement des virus nus à ADN double brin (> 96%; Ackerman, 2007), mais il existe également des phages à ADNsb, ARNsb et plus rarement à ARNdb. La similarité, de structure et de comportement dans l'environnement, la plus proche avec les virus entériques pathogènes pour l'homme est au niveau de la famille des *Leviviridae* (capside polyédrique et génome à ARN simple brin) (Ackermann, 2009). Il existe également une ressemblance structurale avec les phages des familles *Microviridae* (capside polyédrique, génome à ADNsb). Néanmoins, la symétrie des phages fécaux et celle des virus entériques pathogènes sont très proches à savoir une symétrie icosaédrique.

Dans la pratique, il est techniquement impossible de vérifier l'absence de tous les microorganismes pathogènes susceptibles d'engendrer des infections d'origine hydrique. Devant cette impossibilité et compte tenu de leur origine fécale prédominante, on fait appel à des indicateurs de contamination fécale. Actuellement, la capacité des indicateurs bactériens à déterminer la qualité de l'eau subit une polémique car, l'absence de bactéries fécales indicatrices ne signifie pas pour autant une absence des virus pathogènes. En effet, dans les eaux, la corrélation entre ces deux types de microorganismes n'est pas toujours établie (Jiang et al., 2001; Horman et al., 2004; Harwood et al., 2005) et la résistance des virus face aux processus de désinfection et aux stress environnementaux serait plus élevée que celles des bactéries (Wait et sobsey, 2001; Fujioka et Yoneyama, 2002).

II. STRUCTURES DES PARTICULES VIRALES A SYMETRIE ICOSAEDRIQUE

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur des bactériophages dont la structure peut s'approcher de celle des virus pathogènes (phages ARN F-spécifiques, Phi X 174, PRD1) et sur les VLPs pouvant servir de modèles pour décrire le comportement de certains virus pathogènes (*Norovirus*).

II.1. Les bactériophages ARN F-spécifiques

Les phages ARN F-spécifiques sont constitués d'une capsid icosaédrique et d'un génome à ARN monocaténaire. Ces bactériophages appartiennent à la famille des *Leviviridae* qui se compose de deux genres: les *Levivirus* et les *Allolevivirus* (Tableau 2). Selon une

analyse phylogénétique, le genre *Levivirus* serait plus proche de l'ancêtre commun. Suite à des mutations, le genre *Allolevivirus* serait apparu et aurait engendré le clivage en deux groupes (Bollback et Huelsenbeck, 2001). Au sein de cette famille, les phages sont également répartis en quatre génogroupes (I, II, III et IV). Les génogroupes I (phage MS2) et II (phage GA) appartiennent au genre *Levivirus* avec pour différence majeure une délétion d'environ 60 nucléotides au niveau de la région 3' non traduite pour le génogroupe II. Les génogroupes III (phage Q β) et IV (phage SP) appartiennent au genre *Allolevivirus* avec pour différence principale une délétion d'environ 90 nucléotides dans le gène de la protéine de maturation chez les phages du génogroupe III (Schaper et Jofre, 2000; Bollback et Huelsenbeck, 2001; Vinje et *al.*, 2004).

Tableau 2. Classification des Leviviridae (Selon le Comité International de Taxonomie Virale, ICTV 2011).

Famille	Genres	Génogroupes	Exemples d'espèces	Exemples de souches
<i>Leviviridae</i>	<i>Levivirus</i>	Génogroupe I	<i>Enterobacteria phage MS2</i>	Enterobacteria phage MS2 Enterobacteria phage fr Enterobacteria phage M12 Enterobacteria phage R17
		Génogroupe II	<i>Enterobacteria phage BZ13</i>	Enterobacteria phage GA Enterobacteria phage BO1 Enterobacteria phage SD Enterobacteria phage TL2
		"Espèces provisoires"		Acinetobacter phage AP205 Pseudomonas phage PP7
	<i>Allolevivirus</i>	Génogroupe III	<i>Enterobacteria phage Qβ</i>	Enterobacteria phage Q β Enterobacteria phage M11 Enterobacteria phage ST Enterobacteria phage VK
		Génogroupe IV	<i>Enterobacteria phage F1</i>	Enterobacteria phage SP Enterobacteria phage ID2 Enterobacteria phage NL95 Enterobacteria phage F1
	33 phages infectant <i>Caulobacter</i> , <i>Enterobacteria</i> et <i>Pseudomonas</i> non classés			

II.1.1. La capside

C'est une véritable coque de nature protéique mesurant entre 20 et 30 nm, qui entoure et protège l'acide nucléique viral. Cette capside contient 180 copies de la protéine de capside (14 kDa) arrangées sous forme d'icosaèdre. La forme icosaédrique cependant ne s'applique pas à la forme du virus présentant la plupart du temps des protubérances mais plutôt à la symétrie de la capside virale. Un icosaèdre comporte 20 faces avec 12 sommets et 30 arêtes. Il existe trois ordres de rotation au sein d'une telle structure géométrique (Figure 3):

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

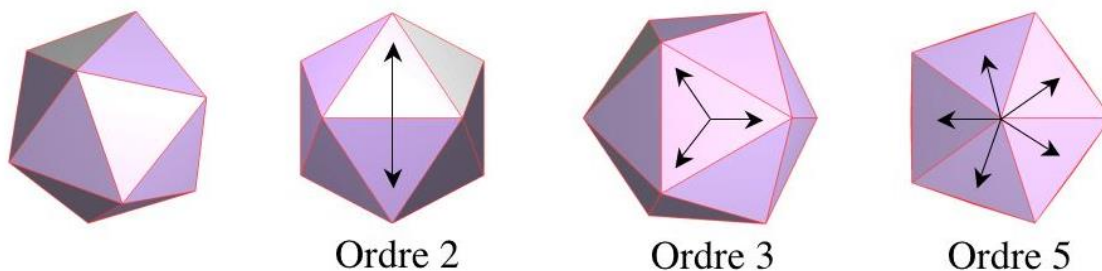


Figure 3. Symétrie d'un icosaèdre comprenant des axes de rotation d'ordre 2, 3 et 5 (Adapté de www.mathcurve.com).

Aucun axe de symétrie ne passe par les protéines de capside car ces dernières ne sont elles même pas symétriques. La structure nécessite donc plusieurs protéines au niveau de chaque face triangulaire. Par exemple, pour une face à symétrie d'ordre 3, on peut déduire que chaque face peut être divisée en trois « unités asymétriques », chacune contenant une « sous-unité asymétrique » (la protéine), et reliées entre elles par un axe d'ordre 3. Le nombre de protéines constituant une unité est appelée nombre de triangulation T . On parle d'assemblage quasi-équivalent lorsque des protéines identiques constituent la capside ou alors d'assemblage pseudo-équivalent si la capside est constituée de protéines différentes. La capside des *Leviridae* et des *Alloleviridae* possède une symétrie cubique, $T=3$ dans laquelle chacune des 60 unités asymétriques est composée de trois protéines (Caspar et klug, 1962; Johnson et Speir, 1997; Toropova et *al.*, 2008).

Les différentes sous-unités protéiques de cette capsidite peuvent se regrouper en unités morphologiques, les capsomères. La structure de la couche protéique de différents phages à ARN simple brin a été résolue par cristallographie à rayons X démontrant 60 dimères A/B quasi symétriques et 30 dimères C/C' symétriques (Valegard et *al.*, 1994; Toropova et *al.*, 2008) (Figure 4). En effet, dans cette coque protéique, la protéine de capsidite se trouve sous trois conformations différentes A, B et C. La principale différence entre les conformères est l'orientation de la boucle FG. La conformation coudée de la boucle FG dans le conformère B permet au dimère A/B de s'adapter autour des axes icosaédriques d'ordre 5 tandis que l'étendue des boucles FG dans les conformères A et C leur permet de s'entremêler autour des axes icosaédriques d'ordre 3 (Toropova et *al.*, 2008).

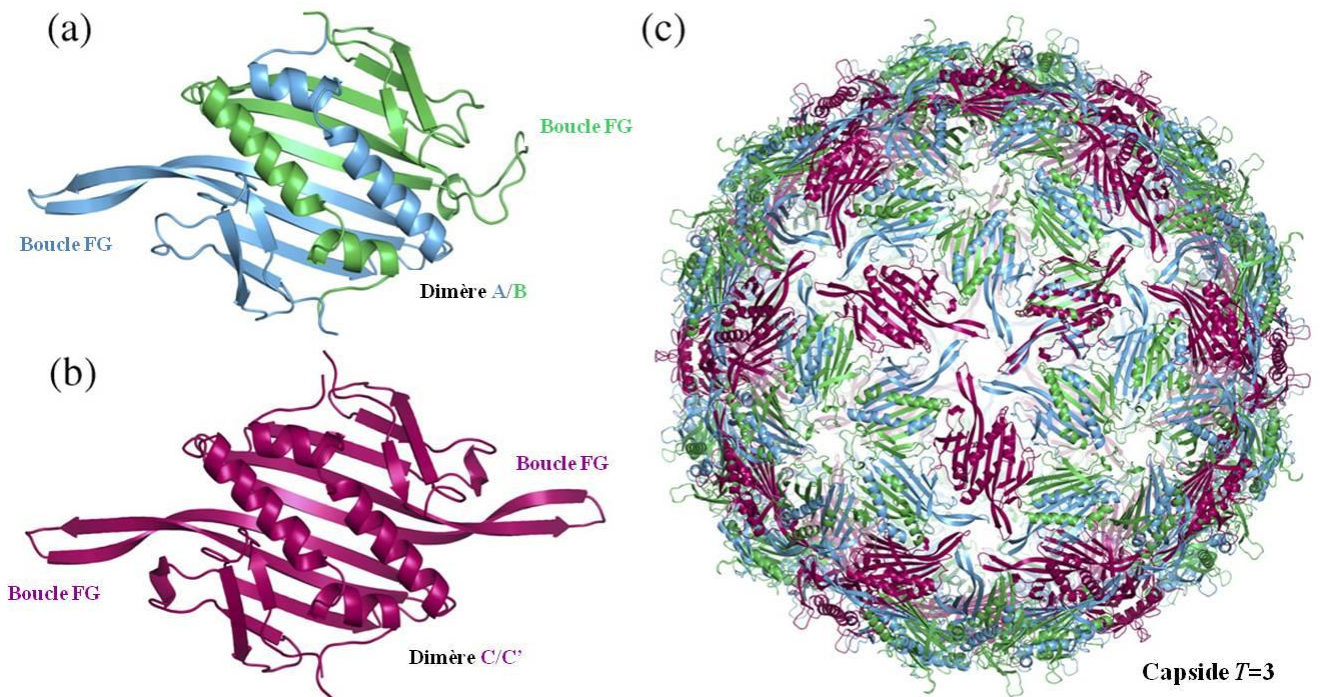


Figure 4. Capsidite du bactériophage MS2. Représentation des structures des dimères de la protéine de capsidite sous les deux conformations (a) A/B et (b) C/C. les dimères sont visualisés de l'extérieur en regardant vers le centre de la particule, les différents conformères sont colorés en bleue (A), vert (B) et rouge (C). (c) Assemblage de 60 copies du dimère A/B et 30 copies du dimère C/C ($T=3$) (Toropova et *al.*, 2008).

Chaque virion contient une copie de la protéine de maturation au niveau de sa capsid (O'Callaghan et *al.*, 1973; Curtiss et Kruger, 1974) qui est requise pour la maturation du virion et pour l'attachement au niveau du pili. Les *Allolevivirus* contiennent une douzaine de copies de la protéine « readthrough » au niveau de leur capsid (Fauquet et *al.*, 2005). L'assemblage de la capsid est spontané et plutôt rapide rendant difficile la caractérisation des intermédiaires de réplication (Rossmann et *al.*, 1989; Zlotnick et *al.*, 2000).

Les structures de capsides des phages MS2 et GA (les deux étant du genre *Levivirus*) sont à 62% identiques alors que les phages MS2 et Q β (*Allolevivirus*) sont identiques à 20% (Tars et *al.*, 1997). Les éléments de structure secondaires dans les monomères sont généralement identiques. Les interactions chaîne latérale et chaîne principale sont partiellement conservées entre MS2 et GA mais différentes avec Q β ce qui engendre donc la faible similarité de séquence avec ce dernier. En effet, les structures en boucles sont « désordonnées » pour le phage Q β . Entre MS2 et Q β , les différences dans les interactions inter-dimères ont également donné lieu à un léger changement dans la structure quaternaire. Cela est dû à la légère augmentation du rayon de Q β , où les dimères sont déplacés vers l'extérieur d'environ 5Å. Les interactions le long des axes de plis sont assez différentes entre les phages (Figure 5). En ce qui concerne les boucles FG, l'axe du phage GA n'est pas d'ordre 5 dû au fait que les boucles dans les sous-unités A et C ont pratiquement la même conformation. En effet, les contacts sont identiques, à la différence de MS2, où les sous-unités A et C ont des contacts différents. La plus grande différence dans cette région est pour le phage Q β , pour lequel les sous-unités autour des axes de pli sont liées ensemble de manière covalente. Ceci rend la particule du phage Q β extrêmement stable.

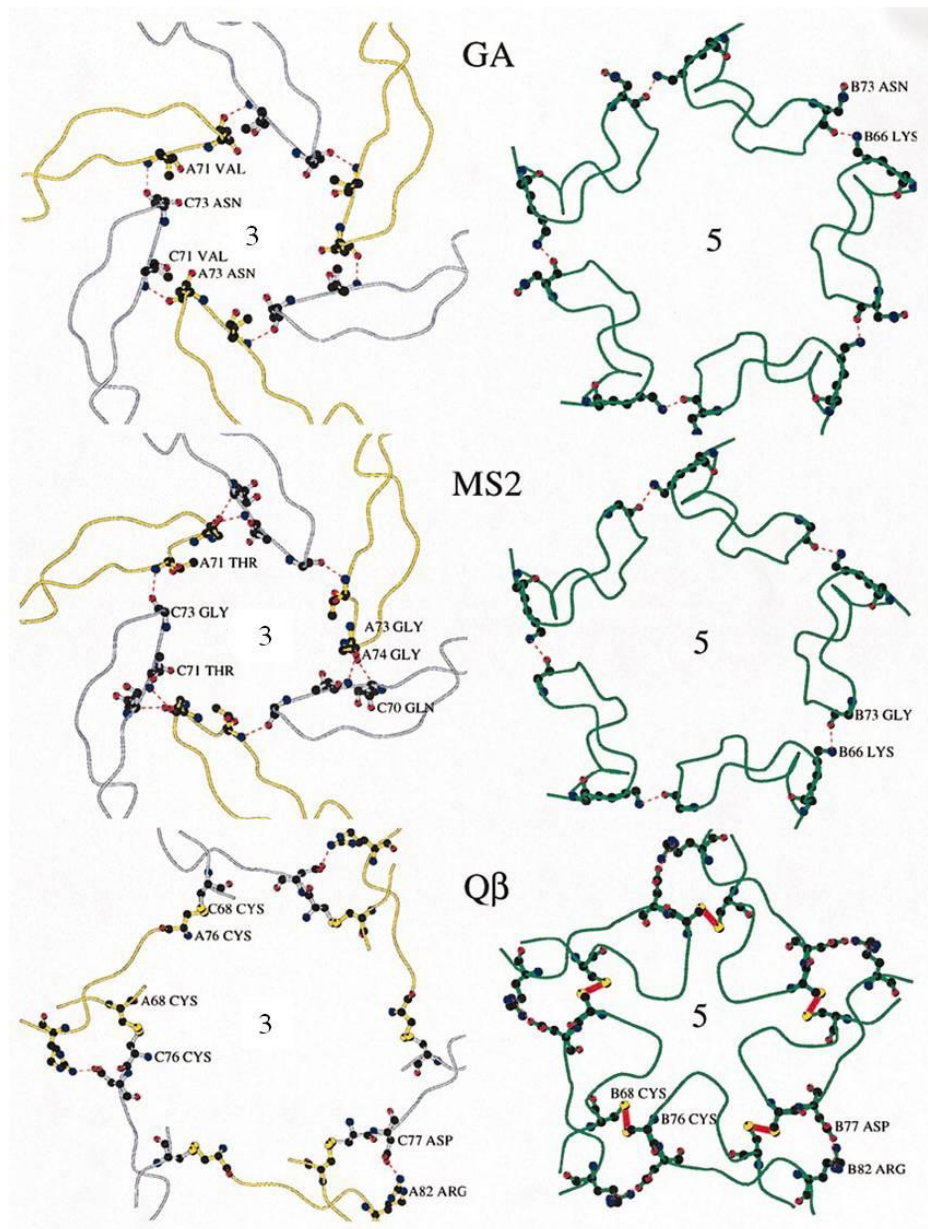


Figure 5. Les interactions le long des axes d'ordre 3 et d'ordre 5 qui relient les boucles (Tars et *al.*, 1997).

La protéine de capside de tous les phages est liée à une structure tige-boucle spécifique de l'ARN viral. Le fragment d'ARN est lié de manière asymétrique à travers les dimères de protéines. Cette liaison ARN-capside est représentée de manière schématique en Figure 6 avec pour exemple le phage MS2. Il existe également des pores au niveau de cette capside protéique de diamètre variant entre 7 et 16 Å. Ceux-ci sont plus larges chez Qβ que chez MS2 et GA (Golmohammadi et *al.*, 1993).

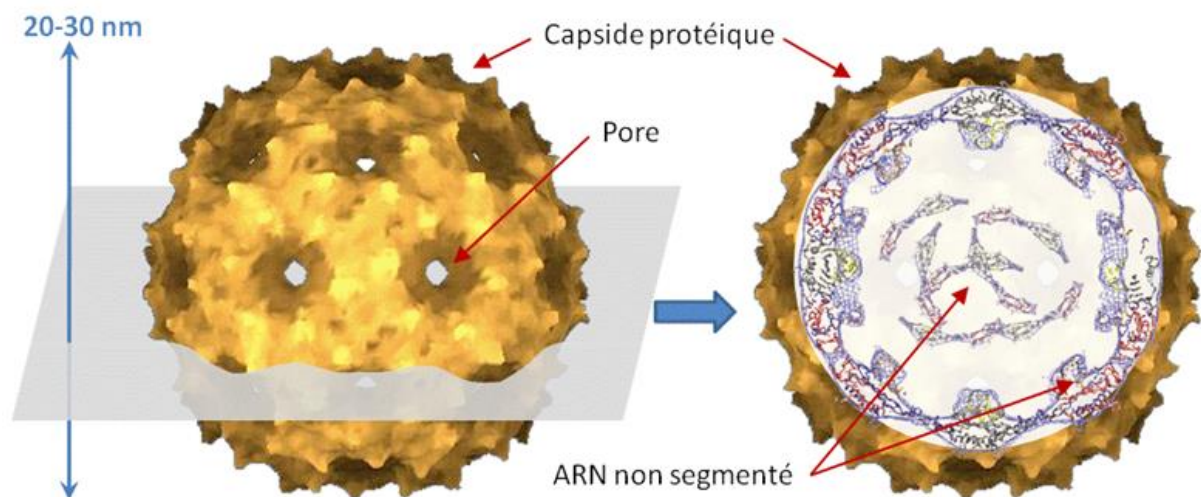


Figure 6. Structures interne et externe du bactériophage MS2. (Référence PDB using VIPERdB, the Virus Particles Explorer 2ms2).

La liaison ARN-capside a au moins deux fonctions: elle est responsable de la spécificité de l'encapsulation de l'ARN mais sert aussi de site d'initiation pour l'assemblage *in vivo*. Il existe d'autres interactions protéines-ARN observées chez le phage MS2 qui ne sont pas conservées chez les autres phages (Tars et *al.*, 1997). Une illustration schématique des résidus conservés et variables dans le site de liaison de l'ARN entre les phages MS2, Q β et GA est montrée en Figure 7. Il s'avère que les résidus qui diffèrent entre les phages occupent à peu près les mêmes positions.

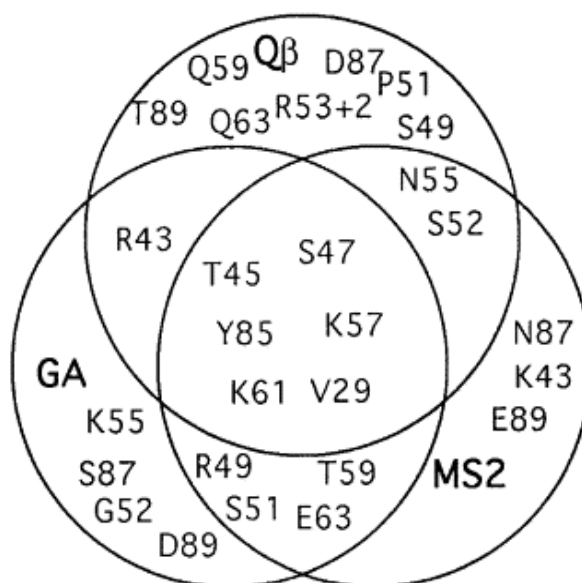


Figure 7. Diagramme des acides aminés conservés et variables au niveau du site de liaison de l'ARN de MS2, Q β et GA (Tars et *al.*, 1997).

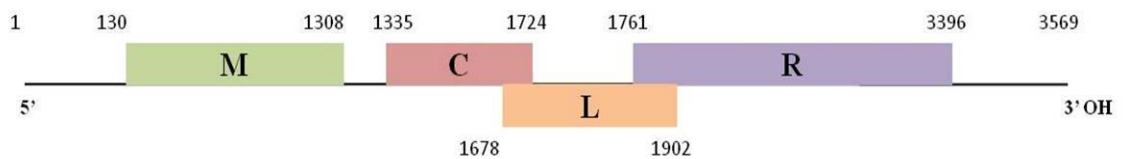
Plusieurs expériences montrent que la protéine de maturation du phage MS2 serait en interaction avec l'ARN (Shiba et Suzuki, 1981). Cette association serait importante pour l'empaquetage de l'ARN dans les virions au niveau du cytoplasme bactérien. Il a été prouvé que des virus dépourvus de la maturase ont un ARN mal empaqueté qui dépasse de la capsid et est dégradé par les nucléases (Heisenberg, 1966). La densité d'ARN accolé à l'intérieur de la capsid n'est pas constante pour tous ces phages.

II.1.2. Organisation du génome viral

Le génome des phages ARN F-spécifiques est constitué d'un ARN simple brin non segmenté de polarité positive. Pour les *Levivirus*, la taille du génome varie de 3466 nucléotides pour le phage GA à 3577 nucléotides pour le phage fr. Chez les *Allolevivirus*, il varie de 4217 nucléotides pour Q β à 4276 nucléotides pour le phage SP. Cet ARN présente quatre gènes dont trois sont communs aux *Leviviridae* et un seul dont va dépendre l'appartenance au genre du phage (Figure 8). On distingue ainsi :

- le gène de la protéine de capsid représentée en 180 copies, qui est l'unité constitutive de la capsid phagique,
- le gène de la protéine de maturation représentée en une copie au niveau de la capsid virale et nécessaire à la reconnaissance du site de fixation au niveau du pili sexuel de la bactérie hôte,
- le gène de la réplique, ARN polymérase ARN dépendante, nécessaire à la multiplication du génome viral au sein de la cellule hôte.
- Pour les *Levivirus*, le dernier gène code une protéine de lyse et pour les *Allolevivirus*, il code une protéine « readthrough » qui assure la lyse par interaction avec la protéine de maturation (Klovins et *al.*, 2002).

Levivirus, exemple du phage MS2



Allolevivirus, exemple du phage Q β

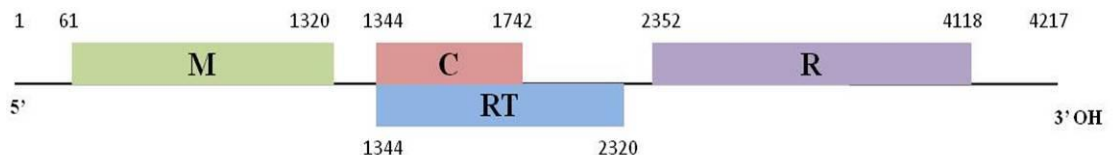


Figure 8. Organisation génétique de l'ARN des bactériophages MS2 et Q β . (Priano et *al.*, 1995; Bollback et Huelsenbeck, 2001; Fauquet et *al.*, 2005). M : gène de la protéine de maturation, C : gène de la protéine de capsid, R : gène de la réplicase, L : gène de la protéine de lyse, RT : gène de la 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 numéros d'accès suivant : MS2 (NC_001417); Q β (AY099114).

II.1.3. Réplication

Les bactériophages ARN F-spécifiques reconnaissent le pili sexuel des bactéries *E. coli* avant d'effectuer leur multiplication. La première étape de la réplication est l'adsorption ou fixation du phage sur ce pili. Cette adsorption entraîne le clivage de la protéine de maturation et la libération de l'ARN viral vers l'intérieur de la bactérie. Les différentes protéines codées par l'ARN sont exprimées dont la réplicase. Généralement, les réplicas des *Levivirus* répliquent faiblement les *Allolevivirus* et vice versa. Cette réplicase va s'assembler avec d'autres protéines de *E. coli* (protéine ribosomale S1 et les facteurs d'élongation de la traduction EF-Tu et EF-Ts) pour former l'ARN polymérase active. Une quatrième protéine appelée facteur d'hôte non associée au complexe de la polymérase est nécessaire pour synthétiser le brin négatif d'ARN. Les membres des deux genres utilisent différents facteurs d'hôte. Pour la synthèse du brin positif d'ARN, en plus de la réplicase, les facteurs EF-Tu et EF-Ts sont requis. Plus tard dans l'infection, les dimères de protéine de capsid agissent comme des répresseurs traductionnels du gène de la réplicase par attachement à une boucle d'ARN, l'opérateur qui contient le site de départ de ce gène. Ce complexe protéine-ARN est considéré comme le site nucléaire de l'encapsidation de l'ARN. Les virions néoformés s'assemblent dans le cytoplasme autour de l'ARN viral. Les sites d'assemblage de la protéine

de maturation et de la protéine readthrough ne sont pas clairement connus mais il est admis que celles-ci s'assemblent lors d'une étape plus précoce. Ces virions sont ensuite libérés par lyse de la bactérie-hôte. Le nombre de phages libérés par une bactérie infectée peut atteindre jusqu'à plusieurs milliers pour les *Leviviridae*.

II.2. Le phage Phi X 174

Le phage Phi X 174 fait partie de la famille des *Microviridae* et du genre *Microvirus*. Ce phage fut le premier organisme dont l'ADN fût séquencé, en 1977 par Frédérick Sanger. Le phage Phi X 174 est constitué d'une capsidie protéique d'environ 25 nm de diamètre et d'un génome à ADN simple brin, circulaire, de polarité positive. Du fait de la similarité de leur diamètre, le phage Phi X 174 est souvent utilisé dans des études comparatives avec les bactériophages ARN F-spécifiques (Aronino et *al.*, 2009; Attinti et *al.* 2010). Il fait parti des coliphages somatiques, la souche hôte la plus commune pour ce phage est la bactérie *E. coli* C.

II.2.1. La capsidie

La formation de la capsidie va faire intervenir différentes protéines dites structurales (Figure 9). Dans un premier temps, on observe l'association de protéines majeures de capsidie, (la protéine F) en pentamère formant ainsi le complexe 9S. Parallèlement, on observe la formation du complexe 6S, correspondant à l'association en pentamère de la protéine G qui est la protéine majeure de la structure dite en pointe (« *spike* »). Cinq protéines B, protéines d'échafaudage interne, vont se fixer à la face interne du complexe 9S, induisant un changement conformationnel permettant l'interaction entre le complexe 9S, le complexe 6S et la protéine H (protéine mineure de la structure en pointe). Durant la morphogénèse, les protéines d'échafaudage jouent un rôle important permettant l'assemblage des différentes protéines structurales, notamment via l'induction de changements conformationnels, afin de former une procapsidie pouvant recevoir le génome. Ces protéines d'échafaudage ne sont que temporairement présentes dans la structure mais leur absence conduit à des structures non-fonctionnelles (Dokland et *al.*, 1999). A ce stade, on est alors en présence du complexe 12S (5 protéines F, 5 protéines G, 1 protéine H et 5 protéines B), auquel va venir s'ajouter cinq tétramères de protéine D (protéine d'échafaudage externe), formant ainsi le complexe 18S.

Sous l'influence de la protéine D, douze copies du complexe 18S s'assemblent afin de former la procapside. Cette structure arbore donc 12 sommets sur lesquels est présentée la structure dite de pointe (5 protéines G et 1 protéine H). Cette procapside va maturer pour aboutir à des particules infectieuses, les virions. Cette maturation consiste à l'entrée d'une copie d'ADN puis au retrait des protéines d'échafaudage (Uchiyama et Fane, 2005). L'entrée de l'ADN aurait lieu au travers d'un « pore » créé par l'organisation des protéines F en interaction avec les protéines D. Ce pore situé à l'intersection des 3 axes de symétrie serait la seule ouverture à la surface de la capsid assez large pour laisser passer une molécule d'ADN. L'introduction de l'ADN à l'intérieur de la procapside est réalisée grâce à l'interaction avec le complexe de préinitiation. La maturation de la particule se poursuit avec le retrait des protéines d'échafaudage: dans un premier temps les protéines B puis les protéines D. On aboutit alors au virion mature (Uchiyama et Fane, 2005). Chaque virion va alors pouvoir infecter une cellule hôte pour effectuer un nouveau cycle réplcatif.

Le phage Phi X 174 est un phage relativement simple, de structure icosaédrique $T=1$ (20 faces, 12 sommets), constitué de quatre protéines de capsid J (5 kDa), F (48 kDa), G (19 kDa) et H (kDa) (Aoyama et *al.*, 1981; Hayashi, 1989). La capsid d'environ 25 nm de diamètre ne présente pas de pore à sa surface.

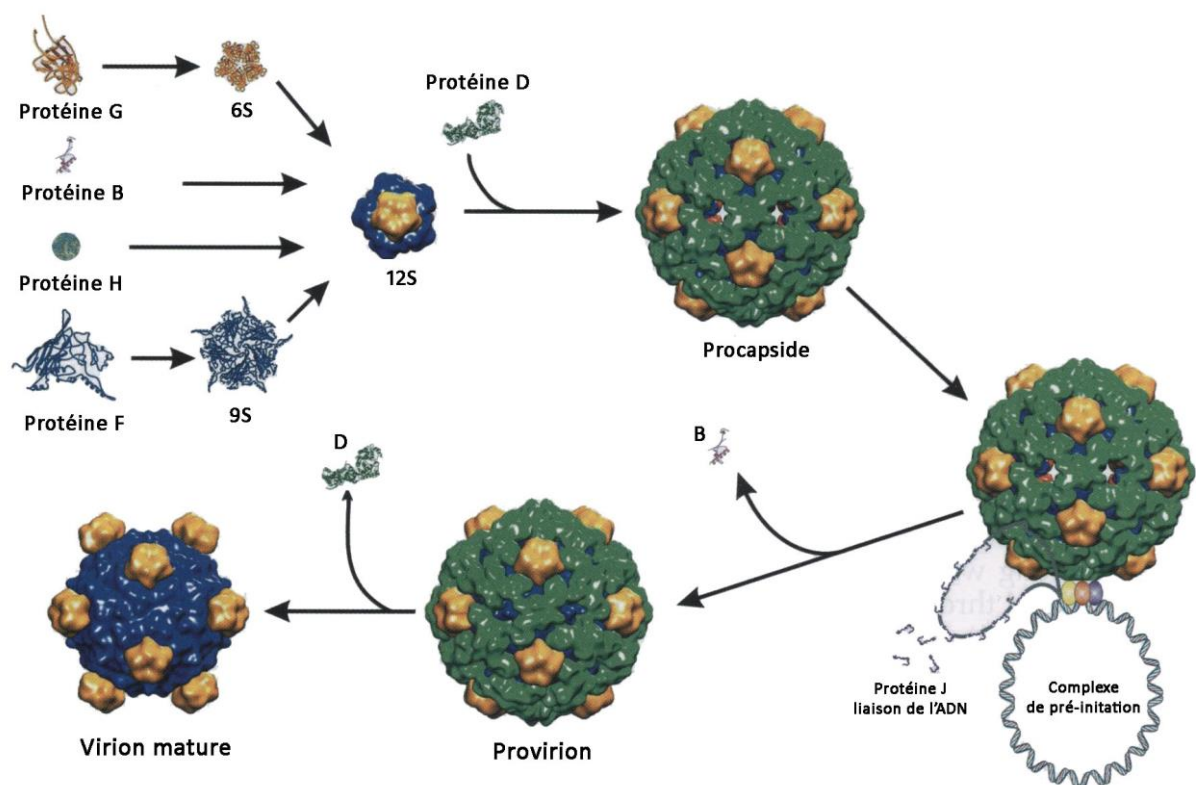


Figure 9. Morphogenèse de la capsid des Microvirus. (Fauquet et *al.*, 2005).

II.2.2. Organisation du génome viral

L'ADN du phage Phi X 174 est composé de 5386 nucléotides et code 11 protéines (dont quatre sont des protéines de capsid) (Tableau 3).

Tableau 3. Protéines codées par l'ADN du phage Phi X 174 et leurs fonctions (Adapté de Fauquet et *al.*, 2005).

Protéines	Nombre de copies	Fonctions
A	-	Protéine de clivage
A*	-	Inhibition de la synthèse d'ADN de la cellule hôte
B	60	Protéine d'échafaudage interne
C	-	Inhibition de l'ADN db
D	240	Protéine d'échafaudage externe
E	-	Protéine de lyse
F	60	Protéine majeure de capsid
G	60	Protéine majeure de la structure de la pointe de la capsid
H	12	- Protéine majeure de la structure de la pointe de la capsid - Protéine pilote impliquée dans l'injection de l'ADN dans la capsid
J	60	Protéine de liaison à l'ADN
K	-	Augmentation de l'infektivité par augmentation du nombre de particules relâchées durant la lyse

Ces protéines présentent une disposition atypique, retrouvée chez les *Microvirus*, le chevauchement des gènes (Figure 10). Sept des onze gènes présentent une partie de séquence chevauchante avec au moins un autre gène (les gènes A à E et le gène K). Les gènes organisés dans un cadre de lecture décalé (A*, B, K et E) codent des protéines non-essentielles (A* et K), des protéines n'affectant pas la formation de particules (protéine de lyse E), ou des protéines tolérant les substitutions (protéine d'échafaudage interne B). Généralement, les gènes codant des protéines de structure ne partagent pas de séquence avec des gènes chevauchants (Fauquet *et al.*, 2005).

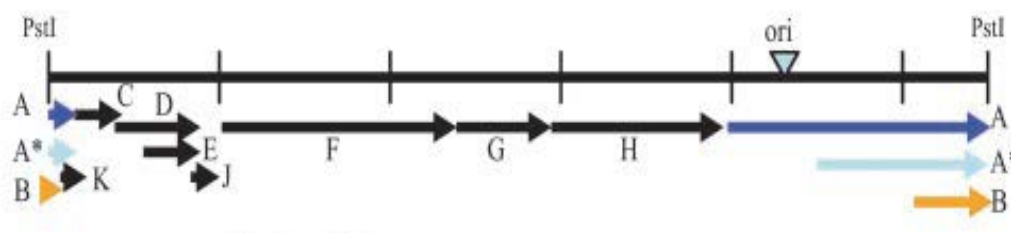


Figure 10. Représentation de l'organisation des gènes le long du génome de Phi X 174 (Smith *et al.*, 2003).

II.2.3. Réplication

La réplication des *Microvirus* se fait via deux voies indépendantes, la morphogenèse de la procapside et la synthèse de l'ADN. Après l'entrée de l'ADN dans les bactéries, la réplication de l'ADN stade I commence. Ce processus convertit l'ADN simple brin infectieux (brin positif) du génome circulaire en une molécule double brin fermée de manière covalente appelée forme répllicative de l'ADN I (RFI). Aucune protéine virale n'est impliquée. Avec la synthèse du brin négatif, la transcription peut débuter. Bien que l'expression génétique des *Microvirus* ne dépende pas de mécanisme complexe agissant en trans pour assurer la régulation temporelle, la synchronisation relative des quantités de protéines virales synthétisées est commandée par un ensemble très complexe de *cis*-promoteurs, terminateurs de transcription et de sites de liaison ribosomale. La synthèse de l'ADN stade II est dépendante de la protéine virale A qui s'attache de manière covalente à l'ADN par clivage du brin positif de RFI au niveau de l'origine de réplication, ceci génère les molécules RF II. La réplication du brin positif implique un mécanisme de cercle roulant alors que la synthèse du brin négatif s'effectue via un mécanisme similaire à la première étape de la réplication. La synthèse de l'ADN stade II continue jusqu'à ce qu'une copie de la protéine virale C se lie à l'ADN simple brin déplacé lors de l'initiation d'un nouveau cycle de synthèse de l'ADN stade

II, qui termine la réplication ADN double brin. Cette liaison de la protéine C entraîne la formation du complexe de pré-initiation ADN stade III constitué d'une copie de la protéine A, une copie de la protéine C, des protéines de la cellule hôte et une hélicase d'ADN associée avec la protéine II lors de la synthèse de l'ADN stade II. Ce complexe de préinitiation va ensuite s'associer avec la procapside conduisant à la morphogenèse de la capside virale et au final du virion.

II.3. Le phage PRD1

Le bactériophage PRD1 est un coliphage, de 65 nm de diamètre, membre de la famille des *Tectiviridae*. Il infecte des bactéries gram-négatif de différentes familles, certaines *Pseudomonas*, *Escherichia* ou encore *Salmonella*. C'est un modèle couramment utilisé pour représenter des virus de « grande » taille et pour l'étude de l'hydrophobicité du fait de la présence de sa membrane. Il est également fortement utilisé pour l'étude des bactériophages dans les sols (Schijven et Hassanizadeh, 2000; Schijven et *al.*, 2002).

II.3.1. La capside

PRD1 est un virus à structure icosaédrique, sans queue et possédant sous sa capside, une membrane protéolipidique faisant son originalité. Une vingtaine de protéines structurales vont intervenir dans la formation d'une procapside contenant la membrane (Tableau 4).

Tableau 4. Protéines de PRD1 et leurs fonctions. (Selon Fauquet et *al.*, 2005).

Protéines	Gènes	Fonctions	Localisations
P1	I	ADN polymérase	Cytoplasme
P2	II	Adsorption	Complexe de reconnaissance
P3	III	Protéine majeure de capsid	Capsid
P5	V	Permet fixation de P2	Complexe de reconnaissance
P6	VI	Empaquetage	Portail
P7	VII	Injection de l'ADN	Complexe de reconnaissance
P8	VIII	Protéine terminale	ADN
P9	IX	Empaquetage dans le virion	Portail
P10	X	Assemblage	Membrane cellulaire
P11	XI	Injection de l'ADN	Surface de la membrane
P12	XII	Fixation à l'ADN sb	Cytoplasme
P14	XIV	Injection de l'ADN	Sommets
P15	XV	Endolysine	Cytoplasme
P16	XVI	Rôle dans l'infection	Membrane virale
P17	XVII	Assemblage	Cytoplasme
P18	XVIII	Injection de l'ADN	Membrane virale
P19	XIX	Fixation à l'ADN sb	Cytoplasme
P20	XX	Empaquetage dans le virion	Portail
P22	XXII	Empaquetage dans le virion	Portail
P30	XXX	Stabilité de la capsid	Capsid
P31	XXXI	Base pour la structure des sommets	Capsid
P32	XXXII	Injection de l'ADN	Membrane virale
P33	XXXIII	Assemblage	Cytoplasme
P34	XXXIV	?	Membrane virale
P35	XXXV	Holine	Membrane plasmique de l'hôte

La capsid est composée d'une protéine structurale majeure, la protéine P3 (43 kDa) et d'une protéine structurale mineure, P30 (9 kDa). La protéine P3 s'associe en trimère pour former 240 capsomères dans la capsid. Les capsomères sont disposés de manière isométrique dans la capsid formant une pseudo symétrie icosaédrique $T=25$. La protéine P3 interagit avec certains groupements portés par les lipides de la membrane ou encore avec des protéines enchâssées dans la membrane protéolipidique, mais la protéine P3 n'est pas ancrée dans cette

membrane (Benson et *al.*, 1999). La protéine P30 se situerait sur les bords des facettes, formés par les capsomères, reliant les sommets et jouant un rôle de « stabilisateur » au sein de la capside (Rydman et *al.*, 2001).

L'organisation géométrique des faces de la capside donne lieu à la présence de sommets. Ceux-ci vont présenter des structures particulières. Des structures, dites de pointes, appelées « *Spike complex* » ou complexes de reconnaissance, dans lesquelles interviennent 3 protéines: P31, P5 et P2 (Figure 11). La protéine P2 est responsable de la reconnaissance et fixation au récepteur présent à la surface de la cellule hôte. Une quatrième protéine intervient dans ce complexe, c'est la protéine P16, ancrée dans la membrane, qui stabilise un peu plus ce complexe. Elle pourrait également avoir son importance dans la transmission à la membrane du signal de fixation à un récepteur bactérien (Abrescia et *al.*, 2004). Un des sommets de la capside présente une structure unique, il est nommé « portail », ou « *unique vertex* ». Il est constitué de 4 protéines (P20, P22, P6 et P9) (Figure 11) et intervient pour une fonction essentielle dans le cycle de vie de PRD1, celle d'introduire le génome dans la procapside (Strömsten et *al.*, 2003).

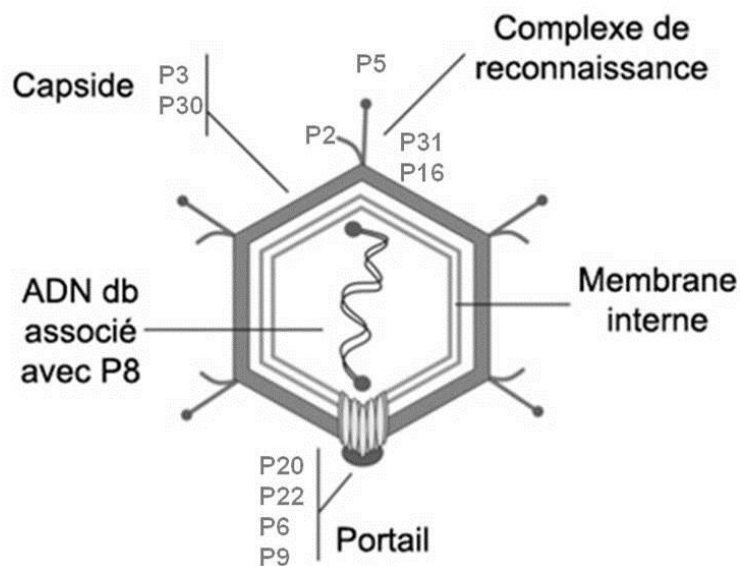


Figure 11. Représentation schématique de la structure du bactériophage PRD1. L'arrangement exact des protéines au niveau du « unique vertex » n'est pas démontré. (Ziedaite, 2008).

La membrane située sous la capside provient de l'hôte infecté. La composition de la membrane plasmique est modifiée par l'enchâssement de protéines virales, mais aussi en terme de composition lipidique. La membrane du virion est enrichie en PE (phosphatidylethanolamine) et voit sa teneur en PG (phosphatidylglycerol) réduite, par rapport à la membrane de l'hôte (Ziedaite, 2008). Elle est approximativement composée de 50% de lipides et 50% de protéines (Strömsten et *al.*, 2003).

II.3.2. Organisation du génome viral

Le bactériophage PRD1 possède un ADN double brin, sous forme linéaire, de 14 925 paires de bases (Savilahti et Bamford, 1993). L'ADN de PRD1 possède des ITR (Inverted Terminal Repeat) de 110 pb dont la séquence est très conservée dans l'espèce (Figure 12). Ces ITR contiennent l'origine de réplication minimale de 20 pb. Il a également été démontré que les ITR facilitaient la fixation de certaines protéines accessoires participant à la réplication de l'ADN. On retrouve des protéines terminales (P8) liées de façon covalente aux extrémités 5' du génome. Ce génome va être introduit à l'intérieur de l'hôte afin de permettre la réplication pour aboutir à une multiplication virale

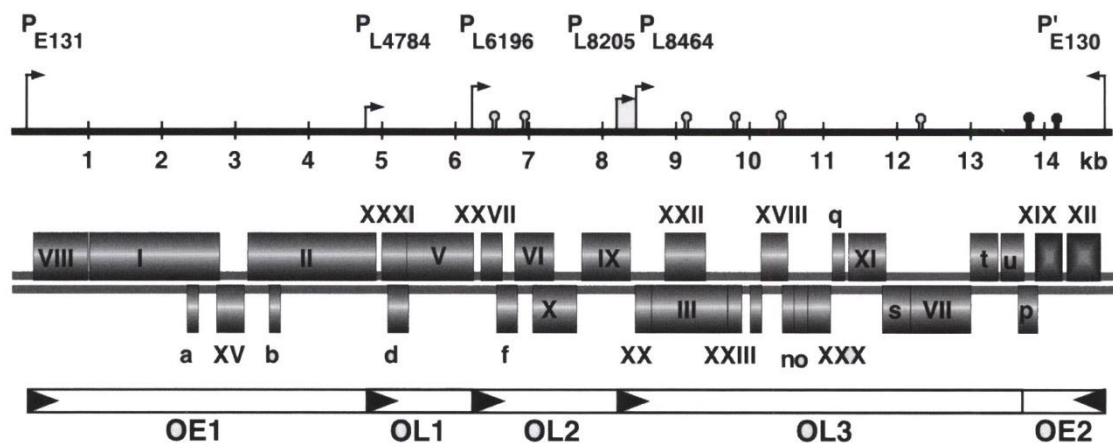


Figure 12. Représentation du génome de l'entérobactériophage PRD1 indiquant l'organisation des gènes et des promoteurs dans la direction de lecture (selon Fauquet et *al.*, 2005). La première ligne représente les promoteurs et les terminateurs. Celle du centre représente l'ordre des gènes. La dernière ligne représente les opérons et leur direction de lecture. (E=Early, tôt ; L= Late, tardif). Les nomenclatures des gènes et des protéines sont corrélées, chaque protéine a le même numéro que le gène.

II.3.3. Réplication

Le phage PRD1 infecte une large gamme de bactéries gram-négatif présentant nécessairement un plasmide conjugatif de type IncP, IncN ou IncW. Ces plasmides encodent des systèmes *mpf* (*mating pair formation*) impliqués dans la synthèse de filaments extracellulaires, type pilus, intervenant dans le contact et le rapprochement de la cellule donneuse et de la cellule réceptrice dans le contexte de transfert du plasmide (Rydman et *al.*, 1999). Ces complexes représentant les récepteurs bactériens, sont donc nécessaires pour la reconnaissance et la fixation de PRD1 sur la bactérie (Grahm et *al.*, 1997). Par exemple, une cellule contenant le plasmide RP4 (type IncP) présentera à sa surface environ 60 récepteurs reconnus par PRD1 chez *Salmonella typhimurium* et environ 25 chez *Escherichia coli* (Mindich et *al.*, 1982; Ziedaite, 2008).

La Figure 13 résume schématiquement le cycle de vie de PRD1. L'injection de l'ADN va se faire via le « *spike complex* » (P2, P5 et P31 + P16) ainsi que d'autres protéines impliquées dans l'entrée de l'ADN dans la cellule: P7, P11, P18, P14 ou encore P32 (Grahm et *al.*, 2002). Ce sont des protéines virales associées à la membrane (exceptée la protéine P11 qui n'est pas une protéine intégrée mais associée à la surface de la membrane). La fixation du bactériophage provoque l'ouverture au niveau du sommet. La membrane passe alors d'une conformation sphérique à une forme tubulaire et se déplace au travers du complexe de reconnaissance, avec à sa surface les protéines citées. La protéine P11 intervient dans le franchissement de la première barrière de l'hôte, la membrane externe. Cette première étape permet à P7 d'accéder à la couche de peptidoglycane et de la dégrader. La structure tubulaire franchit ensuite la membrane cytoplasmique.

Le génome se retrouve à l'intérieur de l'hôte où il va subir la transcription-traduction ainsi que la réplication. Cette réplication est initiée par un mécanisme « *protein-primed* », la liaison covalente des protéines P8 aux extrémités 5' de l'ADN. La réplication peut être simultanément initiée à partir des 2 extrémités 5' de l'ADN. Les gènes d'expression précoce sont ceux codant pour la protéine terminale (P8), l'ADN polymérase (P1), 2 protéines de fixation à l'ADN (P12 et P19) (Savilahti et Bamford, 1993). Apparaissent au cours du temps les différentes protéines impliquées dans le cycle de vie de PRD1. Certaines vont aller s'associer à la membrane cytoplasmique de l'hôte tandis que d'autres vont s'associer à l'ADN ou encore, rester dans le cytoplasme de la cellule. Les protéines virales membranaires s'enchâssent dans la membrane, les protéines P3 s'auto-assemblent, en trimères, dans le

cytoplasme. La trimérisation de P3 est dépendante de protéines codées par l'hôte: GroEL et GroES. Hänninen et *al.* (1997), supposent que ces protéines chaperonnes interviennent sur d'autres processus dans l'assemblage de PRD1. Le bactériophage synthétise des protéines impliquées dans l'assemblage de virions : P10, P17 et vraisemblablement P33. Ces protéines interagissent avec la capside, la membrane et les protéines qui y sont enchâssées, mais ne se retrouvent pas dans la structure du virion mature (Hänninen et *al.*, 1997; Ziedaite, 2008). Elles sont considérées comme des facteurs d'assemblage. La protéine P10 s'associe à la membrane de l'hôte dans laquelle sont insérées les protéines virales. Cette association entraîne le changement conformationnel de la membrane en une vésicule. Ensuite les protéines P10 se dissocient de la membrane pour laisser interagir les protéines de la capside P3 et P30. (Rydman et *al.*, 2001). Ces événements tendent à la formation d'une capside associée à la membrane mais ne contenant pas le génome, c'est la procapside.

L'empaquetage de l'ADN est possible grâce à la structure décrite précédemment: le portail ou « *unique vertex* ». Au moment de réaliser ce processus, la protéine P9 (ATPase) se fixe à l'ADN via la protéine P8. Ensuite la protéine P9, associée à l'ADN, va interagir avec la protéine P6 au niveau du portail. Enfin, la protéine P9 joue son rôle d'ATPase et permet le déplacement de l'ADN au travers du portail, via l'hydrolyse d'ATP. La protéine P9, en tant que protéine structurale, reste associée à cette structure chez le virion mature. Au cours de l'étape d'empaquetage, la membrane subit ses dernières modifications conformationnelles. Les liens entre la capside et la membrane deviennent plus étroits (Ziedaite, 2008; Strömsten et *al.* 2005). On aboutit alors à des virions complets à l'intérieur de l'hôte.

La dernière étape dans le cycle de réplication de ces virions consiste à sortir de l'hôte pour se retrouver dans l'environnement cellulaire. Un canal au travers de la membrane cytoplasmique va se former grâce aux protéines P15 et P35 (holine, protéine intégrée à la membrane), la rendant ainsi perméable. Cela va permettre à la protéine P15, une endolysine, d'accéder à la couche de peptidoglycane et de la dégrader. Le processus de lyse est initié par la chute du taux d'ATP, par hydrolyse, dans la cellule au moment de l'empaquetage de l'ADN. Cette chute du taux d'ATP entraîne l'intégration de la protéine P35 à la membrane cytoplasmique, jusqu'alors associée à GroE. La présence des holines dans la membrane cause la fuite, non spécifique, d'ions K^+ , ceci provoque la dissipation du potentiel de membrane et ainsi l'ouverture des holines permettant le passage des molécules d'endolysine. La seule présence de la membrane externe n'est généralement plus capable de préserver l'intégrité de la cellule qui est alors lysée (Ziedaite, 2008; Ziedaite et *al.*, 2005). Cependant, en présence

d'une certaine concentration en ions bivalents, la membrane externe est stabilisée et reste donc le dernier rempart pour l'intégrité cellulaire.

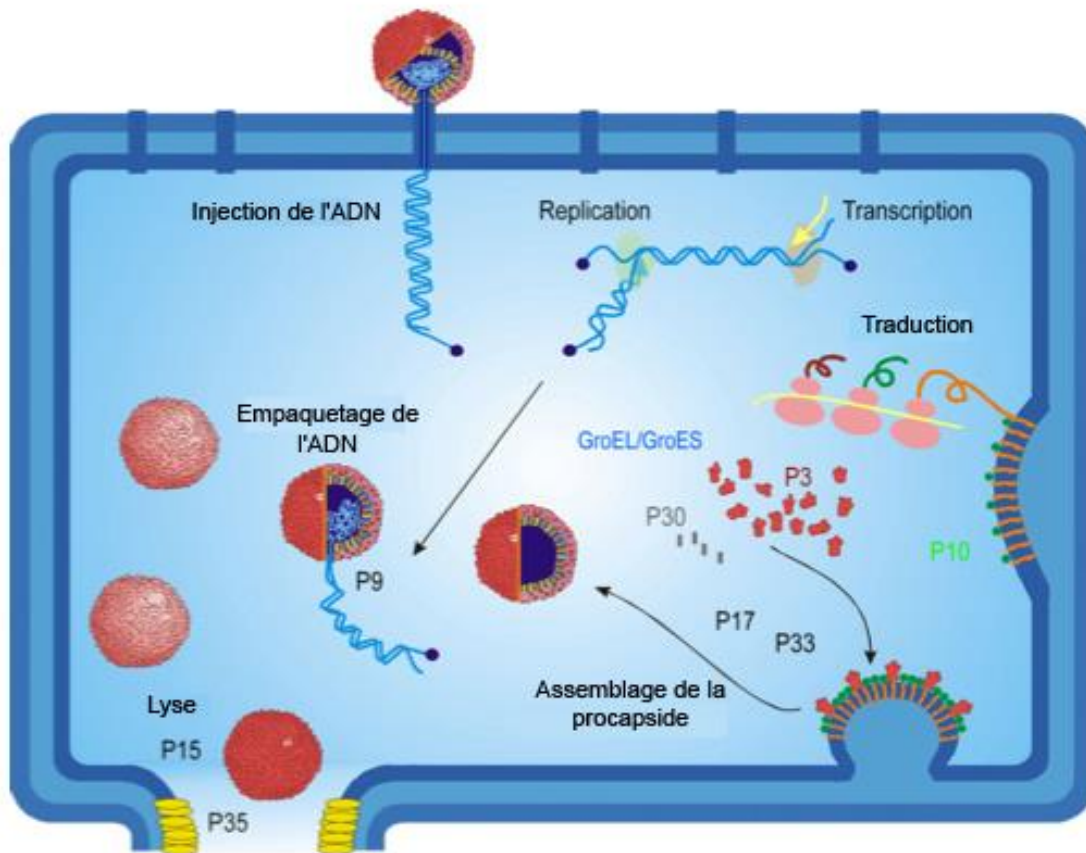


Figure 13. Représentation schématique du cycle de vie du bactériophage PRD1. (Ziedaite, 2008).

II.4. Les VLPs

Il s'agit de capsides protéiques dépourvues de génome. Ces particules ont la particularité d'être non pathogènes, puisqu'elles ne contiennent pas d'ARN viral nécessaire à la réplication et d'être morphologiquement et antigéniquement identiques aux virus dont elles sont issues (Jiang et *al.*, 1992).

II.4.1. Intérêt des VLPs

Les VLPs sont très utilisées dans le domaine structural. Elles peuvent servir de substituts de virus notamment pour les *Norovirus* car à l'heure actuelle, et malgré les nombreuses recherches entreprises, aucun système cellulaire n'a encore permis de multiplier

les *Norovirus in vitro* (Duizer et *al.*, 2004). Une importante barrière à l'étude du comportement de ces virus dans l'environnement à échelle autre que celle du laboratoire, réside dans l'impossibilité d'introduire des pathogènes potentiels dans les eaux de station d'épuration. Les VLPs, substituts recombinants non infectieux, totalement inoffensifs, apparaissent alors comme un outil modèle. En effet, grâce au développement de ces pseudoparticules virales, la structure des *Norovirus* a été décrite par cryomicroscopie électronique et cristallographie aux rayons X (Prasad et *al.*, 1999). La capacité des VLPs de *Rotavirus* et *Norovirus* à se substituer aux virus a été démontrée dans l'eau de mer et les coquillages (Loisy, 2004).

Les VLPs sont également beaucoup utilisées dans le domaine clinique pour la conception des vaccins car l'immunisation à l'aide de ces particules conduit à une synthèse d'anticorps reconnaissant la particule virale native. Utilisées comme antigène vaccinal, elles ont une structure et une morphologie similaires à celles des virions et possèdent les épitopes conformationnels nécessaires à l'induction des anticorps neutralisants. Les VLPs possèdent toutes les propriétés nécessaires pour constituer un bon candidat vaccinal (Estes et *al.*, 2000):

- Elles sont stables après lyophilisation et une exposition à pH 2,5; pH intestinal (Estes et *al.*, 2000).
- Elles sont fortement immunogéniques après injection par voie parentérale chez les animaux (Estes et *al.*, 2000) et après administration orale ou intra nasale chez la souris (Ball et *al.*, 1998; Guerrero et *al.*, 2001).
- Elles sont également sans danger et immunogéniques après administration orale chez des volontaires testés positivement pour des anticorps anti-norovirus (Ball et *al.*, 1998).

Il existe déjà des vaccins à base de VLPs utilisés dans des cas de cancer du col utérin contre les papillomavirus humains oncogènes, PVH-16 et 18 retrouvés dans environ 70 % de ces cancers. Ces vaccins sont très prometteurs car leur efficacité avoisine les 100 % de protection (Harper et *al.*, 2004). Des études préliminaires chez la souris ont montré une réponse immunitaire mucoale et sérique après administration orale de tabac ou de pomme de terre exprimant des VLPs (Santi et *al.*, 1996; Tacket et *al.*, 2000). La possibilité d'un vaccin comestible a été confirmée chez des volontaires humains (Tacket et *al.*, 2003). Ces résultats sont encourageants pour l'utilisation des VLPs en tant que candidat vaccinal.

II.4.2. Synthèse des VLPs

Le principe de la synthèse des VLPs est basé sur le fait que l'expression des protéines virales de capsid, dans un système, induit l'auto-assemblage de VLPs, ainsi ces protéines prennent une taille et une conformation dans l'espace, semblables à celles de la particule virale. (Jiang *et al.*, 1992). Cette synthèse comprend plusieurs étapes:

- La première consiste à produire des plasmides recombinants contenant le gène codant pour la protéine de capsid virale.
- Une étape de transformation dans des cellules compétentes de type *E.coli* permet la recombinaison entre l'ADN de la cellule et le plasmide recombinant.
- Après sélection des cellules compétentes, celles-ci sont multipliées et suite à un processus d'extraction, les VLPs sont libérées dans le surnageant cellulaire.

En 1992, l'expression des protéines de capsid VP1 et VP2 codées par l'ORF2 et l'ORF3 du virus de Norwalk dans le système baculovirus, a permis la production de VLPs de ce virus (Jiang *et al.*, 1992). La stabilité de ces VLPs a été examinée dans différentes conditions de pH et de température; ainsi, elles sont fortement stables lorsque le pH est acide ce qui pourrait être une adaptation naturelle des virus qui infectent le tractus gastro-intestinal (Aussar *et al.*, 2006). Depuis des VLPs ont été produites à partir de l'expression dans le système baculovirus de protéines de capsid des souches de norovirus GI (Kitamoto *et al.*, 2002) et de norovirus GII (Dingle *et al.*, 1995). Des VLPs de norovirus ont également été produites à partir du système d'expression du virus de l'encéphalite équine, permettant ainsi une production dans des cellules de mammifères (Baric *et al.*, 2002). Ces VLPs sont identiques à celles produites dans le vecteur d'expression baculovirus.

Actuellement, plusieurs laboratoires synthétisent des VLPs du bactériophage MS2 (Pickett et Peabody, 1993; Mastico *et al.*, 1993; Legendre et Fastrez, 2005; Lima *et al.*, 2006, Peabody *et al.*, 2008). La construction de ces VLPs consiste à synthétiser la protéine de capsid du bactériophage MS2 à l'intérieur d'une bactérie (*E. coli*) ou d'une levure (*S. cerevisiae*). Pour cela, les bactéries et les levures en question sont rendues compétentes puis transformées par insertion d'un plasmide portant le gène de la protéine de capsid du bactériophage MS2. Les cellules transformées sont sélectionnées afin d'engendrer le processus de production de protéines. La particule virale dépourvue de son génome se formera au final par auto assemblage des protéines de capsid synthétisées.

Ces différents modèles phagiques constituent des modèles de particules molles multicouches à structures très différentes: un modèle à une seule couche, les VLPs (capside virale uniquement), des modèles à deux couches, les phages ARN F-spécifiques (capside à pores + génome) et le phage Phi X 174 (capside sans pore + génome) et enfin un modèle à trois couches, le phage PRD1 (capside + membrane + génome). L'étude des propriétés interfaciales sur ces différents modèles permettrait de mettre en évidence et d'approfondir le concept de particules molles multicouches s'il existe une différence de comportement entre ces différents modèles.

III. VIRUS ET PARTICULES MOLLES: PROPRIETES INTERFACIALES DES VIRUS

Les propriétés interfaciales d'un virus caractérisant son devenir dans l'environnement se définissent principalement par sa charge électrostatique et par sa balance hydrophile/hydrophobe.

III.1. La charge électrostatique

Nos virus d'intérêt sont constitués essentiellement d'un génome à ARN ou ADN et d'une capside qui est essentiellement de nature protéique. Les protéines constitutives de la capside sont composées d'acides aminés capables d'exprimer une charge non seulement au niveau des chaînes latérales mais également au niveau des terminaisons (carboxyles ou amines). En effet, les différents groupements des acides aminés (NH_2 , COOH , SH ... situés dans la chaîne latérale ou aux extrémités de la protéine) définis par leurs pK_a sont capables de s'ioniser en fonction du pH d'un milieu donné donnant ainsi une certaine charge globale à la protéine qu'ils constituent. A partir des valeurs de pK_a , il est possible de déterminer le point isoélectrique (pI) théorique d'une protéine. Ce pI correspond à la valeur de pH pour laquelle la charge globale de la protéine en question est nulle.

Ainsi, la charge d'une particule virale est généralement estimée de manière qualitative à partir du point isoélectrique qui est donc la valeur de pH pour laquelle la charge globale du virus est nulle. Elle est négative pour des pH supérieurs au pI et positive pour des pH

inférieurs au pI (Gerba, 1984). Le pI donne donc une estimation de la charge du virus dans certaines conditions de pH. Des points isoélectriques peuvent être déterminés de manière expérimentale ou théorique pour les virus. Le pI théorique d'un virus est déterminé à partir de la composition en acides aminés constituant la protéine de capsid. Il exclut la contribution du génome au niveau de la charge virale globale. Langlet et *al.* (2008b) effectue un calcul théorique du point isoélectrique de bactériophages à partir des pKa latéraux des acides aminés de la protéine de capsid sans tenir compte de la structure en trois dimensions de la capsid, le calcul est effectué en faisant abstraction du repliement des protéines et des liaisons peptidiques. Selon cette méthode les pI des bactériophages ARN F-spécifiques varient de 9,7 pour les phages SP et GA à 9 pour le phage MS2 (Tableau 5).

Tableau 5. pI théoriques de la protéine de capsid de quatre phages ARN F-spécifiques (calculés à partir de <http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/MobylyePortal/portal.py?form=iep>, Langlet et *al.*, 2008b).

Bactériophages	pI théoriques
MS2	9
GA	9,7
Q β	9,5
SP	9,7

Penrod et *al.* (1996) ont auparavant effectué des modélisations de la capsid du phage MS2 et λ et ont déterminé des valeurs de pI pour ces derniers. Ces valeurs sont obtenues à partir des pKa des acides aminés à l'intérieur de la protéine tenant ainsi compte des liaisons peptidiques. Lorsqu'on prend en considération les acides aminés de la capsid entière, le pI serait supérieur à 9 pour le phage MS2. Ainsi, lorsque le calcul est effectué à partir de la séquence entière en acides aminés de la protéine de capsid du bactériophage MS2, plusieurs auteurs sont en accord avec une valeur de $pI > 8$ (Penrod et *al.*, 1996, Schaldach et *al.*, 2006, Langlet et *al.*, 2008a). Néanmoins, Penrod et *al.* (1996) ont également effectué une modélisation uniquement à base des acides aminés situés sur la surface externe de la capsid et le pI serait alors de 4 pour le phage MS2. Cette modélisation du pI de la capsid trouve certaines limites lorsqu'il s'agit d'expliquer le comportement du phage lors de processus d'adhésion. En effet, il est impossible à partir du pI de savoir quel virus exprime la charge négative ou positive la plus importante pour un pH donné. De plus dans ces travaux, lors de

l'étude de la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique, il demeure des charges même à des conditions de hautes forces ioniques ce qui ne pourrait s'expliquer que par la présence d'une charge électrostatique interne résiduelle car à très haute force ionique, la charge de surface (capside) est complètement neutralisée (Ohshima, 1995; Duval et Ohshima., 2006; Langlet et *al.*, 2008a). L'estimation du pI d'un virus par l'étude de sa capsidie uniquement reste donc très approximative d'autant plus que les valeurs calculées sont différentes de celles obtenues par expérimentation.

Langlet et *al.* (2008a) suite à des expérimentations, obtiennent un pI mesuré de 3,5 pour le bactériophage MS2 complet. D'autres auteurs confirment le pI très bas du phage MS2 (Overby et *al.*, 1966; Redman et *al.*, 1997). Deux approches s'opposent alors pour expliquer la différence importante entre le pI théorique de la capsidie plutôt basique et le pI très acide du virus complet. Langlet et *al.* (2008a) suggèrent un impact du génome sur la charge globale du virus en calculant un pI théorique de 9 pour la seule capsidie du phage MS2 et de 2,9 pour le génome de ce phage. Penrod et *al.* (1996) ne prennent en compte que les acides aminés en surface de la capsidie pour avoir une valeur de pI assez faible correspondant la valeur expérimentale. Le pI pourrait alors être expliqué par la contribution de la capsidie du phage mais également celle du génome.

L'obtention de pI expérimentaux peut être effectuée à l'aide de différentes méthodes. Les premières furent basées sur des techniques de focalisation électrique. Le principe de cette technique est de créer un gradient de pH dans lequel pourront se déplacer les virus soumis à un champ électrique. Arrivés au pH correspondant à leur pI , ils s'immobiliseront car leur charge nette sera nulle: le nombre de charges positives est égale au nombre de charges négatives. La révélation de la zone de pH à laquelle les virus ont arrêté de migrer peut se faire soit par marquage radioactif du virus avant la migration soit par analyse des différentes zones de gel pour déterminer laquelle contient le plus grand nombre de virus infectieux. Ces techniques de radiomarquage auraient tendance à dénaturer les protéines natives de la particule.

Une autre technique de détermination expérimentale du pI est la microélectrophorèse. Elle consiste en la mesure de la vitesse du virus dans un champ électrique. La vitesse rapportée au champ électrique détermine la valeur de la mobilité électrophorétique (μ). Ici, le pI correspond à la valeur de pH pour laquelle la mobilité électrophorétique est nulle. Les données de mobilité électrophorétique sont quantitatives et permettraient donc de faire une

comparaison entre deux virus (Redman et *al.*, 1997; Schaldach et *al.*, 2006). Langlet et *al.* (2008b) comparent la mobilité électrophorétique de trois bactériophages ARN F-spécifiques: MS2, Q β et GA. Néanmoins, la mobilité électrophorétique ne donnerait pas directement accès à la charge du virus mais plutôt à une estimation de celle-ci à certaines valeurs de pH.

Des valeurs expérimentales de pI ont été déterminées pour des virus pathogènes pour l'homme et pour des bactériophages (Tableau 6).

Tableau 6. Points isoélectriques (*pI*) expérimentaux de certains virus pathogènes pour l'homme (A) et de bactériophages (B) (adapté de Gerba, 1984; Jin et Flury, 2002).

A) Points isoélectriques de virus pathogènes pour l'homme

Famille	Genre	Virus	<i>pI</i>	Références
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	Poliovirus 1 (Brunhilde)	4,5 ; 7,0	Mandel (1971)
		Poliovirus 1 (Chat)	7,5 ; 4,5	Ward (1978)
		Poliovirus 1 (Mahoney)	8,2	Floyd et Sharp (1978a)
		Poliovirus 1 (Sabin LSc)	6,6	Zerda (1982)
		Poliovirus 2 (Sabin T2)	6,5, 4,5	Murray et Parks (1980)
		Poliovirus 2 (P712-Ch-2ab)	4,5 ; 7,5	Taylor et al. (1981)
		Coxsackievirus A21	6,1 ; 4,8	Murray et Parks (1980)
		Echovirus 1 (4CH-1)	5,5	Zerda, 1982
		Echovirus 1 (R115)	6,2	
		Echovirus 1 (V212)	6,4	
		Echovirus 1 (V239)	5,3	
		Echovirus 1 (V248)	5,0	
		Echovirus 1 (Farouk)	5,1	Murray et Parks (1980)
	<i>Hepatovirus</i>	VHA	5,8 ^a	Kukavica-Ibrulj et al. (2004)
	<i>Rhinovirus</i>	Rhinovirus	6,4	Korant et al. (1975)
<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	Reovirus 3 (Dearing)	3,9	Floyd et Sharp (1978a)
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i> (Souches recombinées)	rNorwalk virus	5	Redman et al. (1997)
		Funabashi (VLP)	5,9	Goodridge et al. (2004)
		Norwalk (VLP)	5,9	
		Seto (VLP)	6,0	
		Hawaii (VLP)	6,0	
		Kashiwa (VLP)	5,5	
		Narita (VLP)	6,9	
<i>Parvoviridae</i>	<i>Parvovirus</i>	Parvovirus AA4. x 14	2,6	Salo et Mayor (1978)
<i>Poxviridae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	Virus Vaccinia (Lister)	5,1 ; 3,8	Mouillot et Netter (1977)
		Variola virus (Smallpox Harvey)	5,9 ; 3,3	
				Douglas et al. (1969)

B) Points isoélectriques de certains bactériophages

Famille	Genre	Virus	<i>pI</i>	Références
<i>Leviviridae</i>	<i>Levivirus</i>	MS2	2,2 - 3,9	Zerda et Gerba, (1984) Yuan et al. (2008)
<i>Leviviridae</i>	<i>Allolevivirus</i>	Q β	2,7 - 5,3	Overby et al. (1966) Langlet et al. (2008)
<i>Myoviridae</i>	<i>T4-like virus</i>	T4	2 - 5	Childs et Birnboim (1975) Aronino et al. (2009)
<i>Microviridae</i>	<i>Microvirus</i>	Phi X 174	2,6 - 7	Brorson et al. (2008) Aronino et al. (2009)
<i>Tectiviridae</i>	<i>Tectivirus</i>	PRD1	3 -4	Loveland et al. (1996)

Il arrive que les valeurs du *pI* diffèrent grandement selon les méthodes utilisées (Michen et Graule, 2010). Pour le phage Phi X 174, le *pI* varie entre 6 et 7 par chromatofocalisation (Brorson et al., 2008), il est de 6,6 par focalisation électrique capillaire (Horka et al., 2007) alors que Aronino et al. (2009) déterminent une valeur de 2,6 pour ce phage par mobilité électrophorétique. Ces derniers auteurs ne mentionnent aucune purification du stock viral avant les mesures. De même la valeur du point isoélectrique de l'enterovirus humain B varie de 4 par focalisation isoélectrique en solution aqueuse dense (Butler et al., 1984) à 6,4 par focalisation électrique sur gel d'agarose (Zerda et Gerba, 1984). L'état de la particule aurait aussi son influence sur la détermination du point isoélectrique, en effet, selon les conditions de mesure, les virus peuvent se retrouver sous forme d'agrégats (Langlet et al., 2008b, Mattle et al., 2011) qui tendraient à fausser la valeur de *pI* obtenue, également, selon la méthode de mesure, le facteur « perméabilité » pourrait faire varier la contribution des couches constitutives du virus sur les propriétés interfaciales globales de la particule virale. Par exemple, la mobilité électrocinétique par son flux migratoire tendrait à sonder plus le génome par rapport à une méthode telle que la focalisation électrique.

Quantitativement parlant, le potentiel zêta a souvent été assimilé à la charge des virus (Taylor et Bosmann, 1981; Hughes et al., 2002; Schaldach et al., 2006). Ce potentiel décrit la charge de surface existant à l'interface liquide-solide. Il est un indicateur de la chimie de surface et permet d'étudier par exemple l'efficacité des traitements de modifications de surface ou les phénomènes d'adsorption et de désorption. Ce potentiel est ainsi valable pour des surfaces possédant une limite nette, on parlera de particules 'dures'. Pour les structures biologiques, on ne

parle plus de surface mais il a été défini une notion d'interface. En effet, les particules biologiques présentent une perméabilité hydrodynamique qui pourrait permettre aux structures internes d'avoir un rôle sur les différentes propriétés de la particule entière. Cette notion d'interface est définie comme étant l'espace comprenant l'ensemble des structures virales (capside, génome) qui peuvent interagir entre elles et avec le milieu environnant. Il ne s'agit pas d'une limite nette entre le virus et son environnement. Dague et *al.* (2006) ont montré que pour les bactéries il n'existait pas de charge de surface mais plutôt une localisation des charges dans un volume interfacial. Les virus présentent une certaine souplesse et perméabilité à leur interface. Les concepts associés au potentiel zêta développés pour des particules dures engendreraient donc des approximations très importantes au niveau de l'estimation de la charge d'une particule virale par transposition.

Schaldach et *al.*, (2006) ont effectué une modélisation de la charge de surface des phages MS2, Q β et du virus de Norwalk. Ils en déduisent que pour les deux phages ARN F-spécifiques, le génome aurait une influence majeure sur les interactions électrostatiques des particules virales avec une surface. Pour le virus de Norwalk cette influence serait mineure d'après le modèle de cette étude car aucune différence n'est observée entre les données expérimentales sur des VLPs de ce virus et la modélisation de toutes les charges (capside + génome). Ce résultat est expliqué par un écrantage électrostatique selon les auteurs. Cependant, pour déterminer la charge des virus, il calcule un potentiel zeta valable uniquement pour des particules dures (Duval et Ohshima, 2006). Dans son calcul, il inclut néanmoins la séquence complète de la capsidie mais aussi celle du génome entier. Cette approche consiste donc à projeter toutes les charges des différentes couches du virus à la surface sans tenir compte du paramètre hydrodynamique.

Une seconde approche existe, suggérant clairement que les virus sont des particules molles dont la charge des structures internes a une influence sur la charge totale de la particule. Plus qu'une surface, il faudrait donc plutôt parler d'interface virale. En effet, lors de la mesure de la mobilité électrophorétique, deux paramètres principaux interviendraient dans les propriétés électrostatiques du virus: sa charge et son hydrodynamique (Langlet et *al.*, 2008a). Selon ces auteurs, pour comparer deux virus en termes de charge, il est nécessaire d'étudier la mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique et pas seulement en fonction du pH comme cela a toujours été effectué auparavant (Figure 14). La pente de la courbe révèle le ratio de densité de charge interne sur la densité de charge externe. De plus, la présence d'une valeur non nulle de mobilité électrophorétique à haute force ionique serait une caractéristique principale des particules dites molles (Ohshima, 1995). Par modélisation (Figure 14), à perméabilité égale, lorsque l'on fait varier la densité de charge interne en l'augmentant, cette pente devient plus grande caractérisant

plus de charges et une neutralisation plus rapide de ces charges. Cette détermination de la charge prendrait donc un sens lorsque l'on compare deux particules virales de tailles similaires entre elles en termes de mesure de mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique.

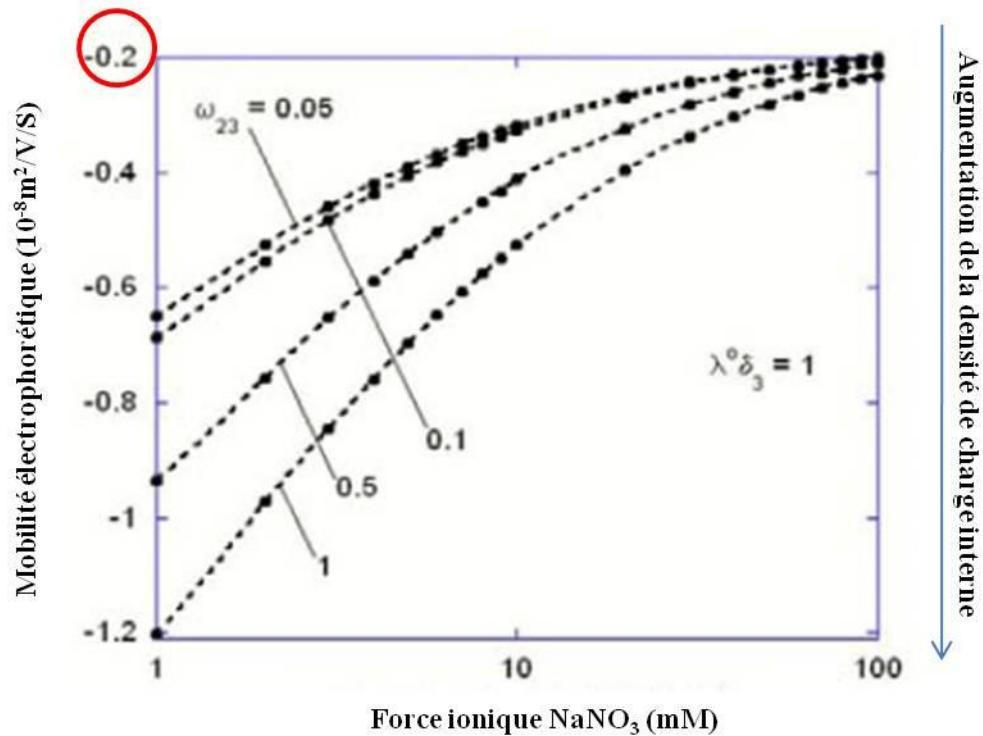


Figure 14. Impact de la quantité d'acide nucléique (ARN) à proximité de la capside (ω_{23}) dans des conditions où la perméabilité du flux (λ_0^{-1}), est de l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la capside (δ_3) (Langlet et *al.*, 2008a).

III.2. La balance hydrophile/hydrophobe

En fonction des acides aminés la constituant, des structures secondaires et tertiaires, la capside virale va présenter des domaines hydrophiles et des domaines hydrophobes (Mix, 1974): on parle de balance hydrophile-hydrophobe. Cette dernière est considérée comme essentielle pour prédire la capacité d'adhésion des virus à une surface (Gerba, 1984).

Plusieurs méthodes existent pour estimer le caractère hydrophile-hydrophobe telles que la mesure de l'angle de contact et l'utilisation de concentrations salines croissantes afin de provoquer l'agrégation dans le milieu. L'utilisation de méthodes macroscopiques qui consistent à «mesurer» la balance hydrophobe/hydrophile de virus (et plus généralement des micro-organismes) par l'analyse de leur affinité pour un solvant de polarité donnée (Lytle et Routson, 1995; Kos et *al.*,

2003) ont été sévèrement critiquées. L'interprétation des résultats est délicate car lors de l'estimation du caractère hydrophobe des particules, le caractère hydrophile/hydrophobe des sorbants de mesure ainsi que leurs charges ne sont pas assez connus. Par exemple, Busscher *et al.* (1995) et Ahimou *et al.* (2001) ont démontré que la plupart des solvants utilisés dans les tests MATS (Microbian Adhesion Tests to Solvents) ainsi que d'autres surfaces/substrat références employées dans la chromatographie d'interaction hydrophobe (CIH) (Wolff *et al.*, 2010), présentent une certaine charge électrostatique et peuvent par conséquent interagir électrostatiquement avec des virus. Tout ceci affecte ainsi l'estimation de leur degré d'hydrophobicité. Une méthode récente proposée par Attinti *et al.* (2010), basée sur des mesures de force d'interaction entre une pointe de nitrure de silicium recouverte par des virus et une surface hydrophobe par microscopie à force atomique (AFM) semble être une alternative et une approche très prometteuse. Néanmoins, les auteurs n'ont pas exclu clairement le fait que le glutaraldéhyde, utilisé pour immobiliser des virus sur la pointe AFM, pourrait biaiser leurs mesures de force hydrophobes.

De plus en plus, la détermination du caractère hydrophobe s'effectue par la caractérisation de l'adhésion du micro-organisme sur un support plus ou moins hydrophobe. (Lukasik *et al.*, 2000; van Voorthuizen *et al.*, 2001). La plupart du temps, il s'agit de supports industriels peu caractérisés de manière spécifique en dehors du caractère hydrophile ou hydrophobe. Sur une base (semi-) quantitative, il existe encore un réel manque de données concernant l'estimation du caractère hydrophobe d'un virus.

D'un point de vue théorique, dans une solution au repos, les particules virales sont soumises à l'agitation thermique. Ce mouvement des particules est appelé mouvement brownien. Cette agitation thermique peut déstabiliser une solution colloïdale en augmentant la probabilité que les colloïdes se rencontrent et ainsi passer d'une solution monodispersée où toutes les particules ont la même taille à une solution polydispersée contenant des agrégats de tailles différentes. En solution les grosses particules soumises au mouvement brownien se déplacent plus lentement que les petites. En mesurant la vitesse de déplacement, il est alors possible de déterminer la taille d'une particule à partir de l'équation de Stokes-Einstein. Il s'agit là d'une autre approche indirecte pour l'estimation du caractère hydrophobe de particules biologiques. Langlet *et al.*, (2008b) ont effectué des mesures de tailles sur différents bactériophages ARN F-spécifiques. Les résultats obtenus indiquent que les phages MS2 s'agrègent lorsque le pH est inférieur à leur point isoélectrique quelle que soit la force ionique. Les phages Q β s'agrègent différemment en fonction de la force ionique. Les phages GA et SP sont agrégés quelles que soient

les conditions de pH et de force ioniques. Il a donc été établi que ces deux derniers phages étaient les plus hydrophobes.

Pour plusieurs auteurs, les interactions hydrophobes sont d'une grande importance dans le milieu aqueux d'un point de vue quantitatif (van Oss, 2003). Les phages MS2 et Phi X 174 s'adsorbent sur une membrane hydrophobe en écrantant les forces électrostatiques (Shields et Farrah, 2002). Ces interactions sont importantes et majoritaires pour l'attachement de MS2 à des surfaces solides. Néanmoins, le caractère hydrophobe varie d'un virus à l'autre: la part des interactions hydrophobes est considérée comme négligeable lors de l'étude de l'adhésion du bactériophage PRD1 sur des supports minéraux (Loveland et al., 1996).

La notion d'interface virale est une notion très récente suite à quelques études sur les particules dites « molles » (Oshima et al., 2006; Langlet et al., 2008a). De plus en plus, il est admis que le potentiel zêta ne peut en aucun cas représenter la charge interfaciale des virus (Duval et Gaboriaud, 2010) qui ne peuvent pas être considérés comme des surfaces planes. En effet, les propriétés interfaciales de la particule virale notamment la charge électrostatique globale de la particule font intervenir chaque couche constitutive (capside, génome, membrane...). L'étude de la liaison entre ces propriétés interfaciales suivant le concept de particules molles multicouches et les phénomènes d'adhésion/agrégation est essentielle.

IV. LES MECANISMES D'ADHESION/AGREGATION

IV.1. Les forces colloïdales

Selon les propriétés de surface des virus, du support et des conditions physico-chimiques du milieu, certaines interactions prédomineront par rapport à d'autres. Deux théories ont été élaborées pour décrire les forces d'interaction liées à l'adhésion/agrégation: la DLVO (Derjaguin et Lanadau, 1941 ; Verwey et Overbeek, 1948) et la xDLVO. Dans la théorie DLVO, seules les interactions électrostatiques et les interactions de van der Waals sont prises en compte. D'autres types d'interactions comme les interactions hydrophobes peuvent jouer un rôle important et sont donc incluses dans le modèle xDLVO.

IV.1.1. Les interactions électrostatiques

Une surface organique dans un milieu polaire présente généralement une charge électrique nette à la surface de la particule. Elles s'obtiennent suite à la protonation-déprotonation de groupements ionisables: des groupements d'acides aminés ($-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$), des groupements phosphates, l'adsorption spécifique d'ions. Quelle que soit l'origine de la charge de surface, celle-ci est compensée pour respecter l'électro-neutralité de la solution. Ainsi, entre deux colloïdes présentant une charge de même signe, l'énergie d'interaction est positive et se traduit par une répulsion entre ces deux éléments. A l'inverse, entre deux colloïdes de charges opposées, c'est une interaction attractive qui s'établit. L'intensité de ces forces électrostatiques est inversement proportionnelle à la distance: plus les colloïdes sont éloignés plus l'intensité de ces forces diminue. L'implication des interactions électrostatiques dans l'adhésion virale a été largement étudiée (Lukasik *et al.*, 2000; van Voorthuizen *et al.*, 2001; Shields et farrah, 2002 ; Zhuang et Jin, 2003). Penrod *et al.* (1996) dénote l'implication de ces interactions lors de l'élimination des phages MS2 et λ par filtration sur quartz avec une prédominance des forces électrostatiques répulsives lors du mécanisme de filtration (quartz et phages tous deux chargés négativement); de même, Redman *et al.* (1997) dénote l'importance de la nature et de la magnitude des interactions électrostatiques entre des VLPs de Norovirus et le quartz lors du processus de filtration. Une approche plus détaillée des interactions électrostatiques entre particules dites « molles » ou entre ces particules et une surface a été effectuée par Duval *et al.* (2011) selon les paramètres physico chimiques du milieu et des particules elles mêmes. En effet, selon la force ionique du milieu par exemple, les différentes couches constitutives de la particule molle ont un impact plus ou moins prononcé sur les interactions avec les particules voisines ou avec une surface donnée.

IV.1.2. Les interactions de van der Waals

Elles sont d'origine électrique et proviennent de l'interaction entre les électrons d'une molécule et les charges d'une autre. Les interactions de van der Waals possèdent des énergies d'interaction plus faible que celles des forces électrostatiques (Sigg *et al.*, 2006). Elles sont d'origine dipolaire et sont toujours présentes dans le système dispersé. Elles sont de nature attractive le plus souvent à courtes distances (0,3-0,8 nm) mais à très courtes distances ($< 0,3$ nm) ces interactions deviennent répulsives par interpénétration des nuages électroniques. La portée des forces d'attraction de van der Waals implique donc que l'influence attractive d'une particule puisse s'étendre sur une certaine distance à partir de sa surface. Ceci est à l'origine du phénomène

de floculation qui se traduit par l'agglomération des particules. Cependant il existe divers mécanismes qui permettent d'écranter ces forces d'attraction par exemple en favorisant les répulsions électrostatiques ou par l'adsorption de polymères à la surface des particules.

IV.1.3. Les interactions hydrophobes

Elles peuvent être jusqu'à 100 fois supérieures aux interactions de van der Waals entre deux colloïdes et ne peuvent en ce sens pas être négligées (van Oss et *al.*, 1996). Ces interactions ont été décrites pour l'adhésion de plusieurs virus à des surfaces (Lytle et Routson, 1995; Shields et Farrah, 2002). Bales et *al.* (1993) montrent qu'en greffant des groupes hydrophobes à des billes de silice, la rétention de MS2 sur celles-ci augmentait. Pour certains virus, elles deviennent les interactions majoritaires à haute force ionique (Lukasik et *al.*, 2000; van Voorthuizen et *al.*, 2002).

IV.2. Aspects théoriques des mécanismes d'adhésion/agrégation

IV.2.1. Le mouvement Brownien

Dans une solution en position statique, les particules sont soumises à une certaine agitation thermique c'est-à-dire qu'elles ne sont jamais immobiles et interagissent de façon permanente entre elles. Cette interaction va conduire à des changements directionnels. Ainsi, le mouvement Brownien se définit comme étant le mouvement aléatoire, «perpétuel» et chaotique, dans les trois directions de l'espace, de particules en suspension dans un fluide. En solution, les petites particules soumises à ce concept, se déplacent rapidement tandis que les plus grosses sont plus lentes. Du mouvement Brownien résulte la diffusion Brownienne dont les effets peuvent être perçus au niveau macroscopique puisqu'elle permet aux particules de rester dispersées et donc de ne pas s'agréger ou sédimenter sous certaines conditions. A partir de ce principe, il est possible d'étudier l'adhésion de particules virales sur différents supports en condition statique.

IV.2.2. La DLVO et ses limites

La stabilité des particules sphériques monodispersées de même type est expliquée de manière quantitative par la DLVO. Cette théorie permet de calculer les diagrammes énergétiques des interactions répulsives existant entre les charges portées par les particules colloïdales de même nature (dites de double couche électrique) et les interactions attractives résultants des forces de van der Waals. Le potentiel énergétique résultant de ces deux interactions peut être calculé et utilisé pour prédire la stabilité des colloïdes. L'allure générale des courbes (Figure 15) représentant l'énergie totale (E_T) en fonction de la distance entre deux particules est souvent caractérisée par :

- Un maximum primaire correspondant à la barrière énergétique à franchir pour permettre l'attachement ou le détachement des particules.
- Un minimum primaire traduisant une énergie attractive très forte et irréversible. Celle-ci se développe à courte distance par rapport à la surface de la particule.
- Un minimum secondaire traduisant une énergie attractive résiduelle de faible amplitude. Celle-ci se développe à une plus grande distance de la surface de la particule.

Ainsi les colloïdes sont soumis à deux grands types de forces. Les forces attractives qui se définissent par les forces de van der Waals (E_A) liées à la structure et à la forme des colloïdes ainsi qu'à la nature du milieu. Les forces de répulsion quant à elles se définissent par la répulsion électrostatique (E_R) liée aux charges superficielles des colloïdes. L'énergie totale des colloïdes vaut alors : $E_T = E_A + E_R$ (Figure 15).

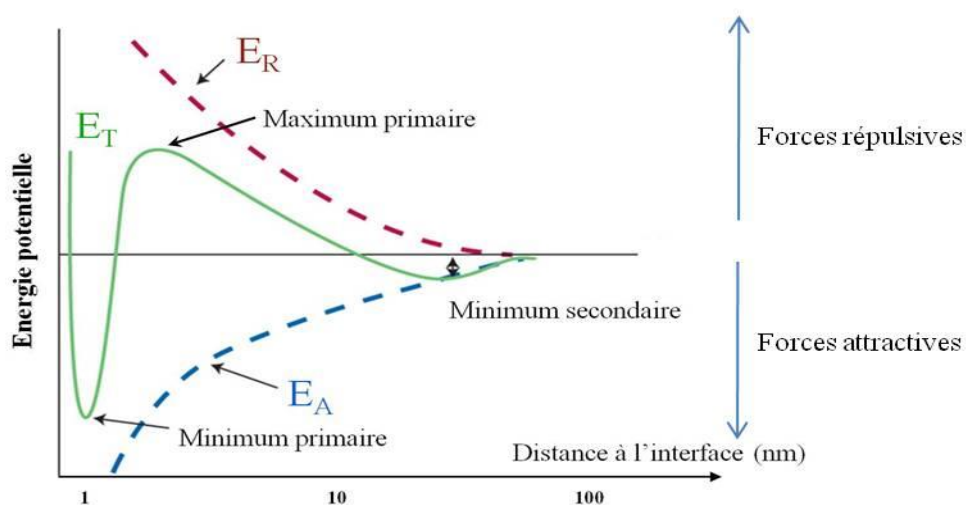


Figure 15. Profil énergétique E_T résultant des différentes forces entrant dans la théorie de la DLVO (selon Malescio, 2003). E_A : forces d'attraction (van der Waals), E_R : forces de répulsion (électrostatique), E_T : énergie totale.

Lorsque les hypothèses de la théorie de la DLVO sont valables, les énergies d'interaction totales prédites sont en accord avec les mesures expérimentales (Israelachvili, 1992). Cependant, dans de nombreux cas, ce modèle est difficilement transposable à différents systèmes et ne décrit pas correctement les énergies d'interaction. Ainsi, de faibles variations par rapport aux conditions de validité décrivant les forces de van der Waals ou les forces électrostatiques entraînent des erreurs importantes. En effet, il existe des forces dites non-DLVO constituant la troisième composante énergétique et jouant un rôle non négligeable, il s'agit des interactions hydrophobes. Une évolution de la DLVO (xDLVO) a été proposée afin d'inclure ces interactions (van Oss, 1996 ; Hermasson, 1999). Néanmoins, il reste certains facteurs qui n'étant pas pris en compte pourrait avoir une influence directe sur la validité des équations. Celles-ci ne seraient valables que pour des milieux de faible force ionique, plus on augmente la force ionique, plus les interactions électrostatiques seront écrantées et donc leurs effets en terme de portée diminueront. De plus, si la surface de la particule est rugueuse, les forces de van der Waals ne seront pas correctement décrites du à l'impact des aspérités sur les interactions (Walz, 1998; Shellenberger et Logan, 2002). De même s'il s'agit de particules « molles » présentant une perméabilité hydrodynamique, les principes de la DLVO deviennent restreints pour l'explication des propriétés interfaciales de cette particule prenant en compte les différentes couches constitutives de la particule et ne la considérant plus uniquement comme une surface plane (Duval et Gaboriaud, 2010).

De nombreuses autres forces non-DLVO (interactions hydrodynamiques, forces de proximité, forces de salvation, liaisons hydrogène) plus délicates à prendre en compte ont été décrites (Ninham, 1999) et contribuent en plus des exemples cités plus haut à la difficulté rencontrée pour accorder cette théorie aux observations expérimentales. La simplicité initiale du modèle se perd dans la multitude de nouveaux paramètres adaptés à chaque système.

IV.2.3. Mécanisme d'agrégation

Déstabiliser la solution, c'est agir sur le système de manière à réduire la portée des répulsions électrostatiques. Les particules vont ainsi se coller les unes aux autres et former des agrégats. Par exemple, en modifiant la force ionique du milieu ou le pH, la stabilité des colloïdes en suspension peut être fortement influencée. En effet, l'ajout de sel, permettrait de neutraliser les charges de surface des particules et ainsi diminuer la portée des forces électrostatiques. De plus, au point isoélectrique des particules en solution, pH pour lequel la charge moyenne à la surface de la particule est nulle, il n'y a donc plus de répulsion électrostatique de longue portée et la stabilité du

système est alors minimale. Par contre, dès que l'on s'éloigne un peu de cette zone instable de pH, le système redevient stable.

Lorsqu'il n'existe aucune barrière répulsive entre les particules c'est-à-dire que chaque collision conduit à la formation d'une liaison irréversible entre deux particules, les agrégats présentent une structure lâche. Par contre si la probabilité de collage entre les particules est très faible, les agrégats sont plus compacts (Lin et *al.*, 1989). Les structures d'agrégats ainsi définies, on distingue ensuite deux grands types de mécanismes (Figure 16):

- DLCA (Diffusion Limited Cluster Aggregation): Il n'y a aucune répulsion entre les particules et la probabilité d'adhésion est donc forte. Pour un agrégat compact, la porosité créée par les particules doit être faible, les vides sont comblés par d'autres particules. Cependant, considérant la probabilité d'adhésion forte, les particules censées combler les vides sont capables d'adhérer avant d'avoir atteint ces vides.
- RLCA (Reaction Limited Cluster Aggregation): Il existe une barrière de répulsion et la probabilité d'adhésion est presque nulle. Les particules sont capables d'explorer de nombreux sites avant de s'adhérer définitivement. Ici, il y a plus de chance de combler la porosité.

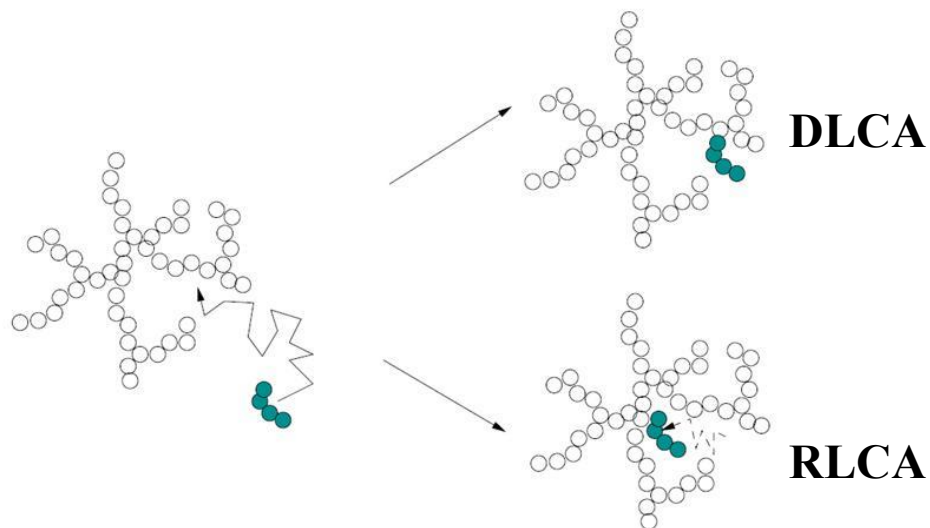


Figure 16. Impact de la probabilité de collision sur la structure des agrégats suivant le mécanisme DLCA ou RLCA (Adapté de Thill, 1999).

IV.3. Les facteurs physico chimiques influençant l'adhésion/agrégation

L'adhésion/agrégation des virus est dépendante de facteurs à la fois physiques, chimiques et biologiques. La variation d'un ou plusieurs de ces facteurs peut être à l'origine de la réversibilité du processus (Gassilloud & Gantzer, 2005). Identifier et comprendre l'influence de ces paramètres va permettre de mieux caractériser l'attachement des particules virales dans l'environnement et par conséquent l'adaptabilité des méthodes de traitement.

IV.3.1. Composition et concentration en ions

Ces ions interviennent aussi bien dans les processus d'agrégation que dans les processus d'adhésion. L'influence de ces ions est caractérisée par leur nature, leur valence et leur concentration. La nature de l'ion, cation ou anion, va être à l'origine de l'influence de celui-ci: les cations vont interagir avec les charges négatives tandis que les anions vont interagir avec les charges positives. La valence de l'ion est également caractéristique de l'ion, on différencie alors les ions monovalents des ions plurivalents. Le rôle de ces ions va être variable selon les conditions de l'expérience. En effet, puisque les ions interfèrent via les charges exprimées, il est important de connaître la charge des bactériophages et du support dans les conditions expérimentales.

Ces ions impactent l'adhésion des virus de deux manières: la modification des propriétés électrostatiques de surface du sorbant et la compétition pour les sites de fixation (Zhuang et Jin, 2008). Dans leurs résultats d'expérience sur l'adhésion de bactériophages (MS2 et Phi X 174) à la goethite, Zhuang et Jin (2008) constatent des effets différents entre deux anions: phosphate (PO_4^{3-}) et carbonate (CO_3^{2-}). Le premier réduit l'adhésion des virus par compétition sur les sites de fixation et augmentation des forces répulsives. Ces ions phosphates vont interagir au niveau des charges positives. Ainsi, les sites chargés positivement ne seront plus disponibles pour l'adhésion des bactériophages. De plus, ces phosphates fixés expriment toujours une charge négative, augmentant ainsi la répulsion entre le phage et la goethite. L'ion carbonate, augmente l'adhésion des bactériophages en générant, après réaction avec la goethite, des sites chargés positivement supplémentaires. Les deux anions influencent donc de manière opposée l'adhésion de bactériophages.

Pham et *al.* (2009) ont étudié l'influence de deux cations différents (Ca^{2+} et Mg^{2+}) sur l'attachement du bactériophage MS2 à une matrice négativement chargée. Il s'avère que les deux ions de même valence ont un impact différent sur l'adhésion. L'ion calcium favorisant plus

l'adhésion du phage. Les auteurs supposent un phénomène de pontage. En effet, un ion Ca^{2+} est impliqué dans deux liaisons ioniques différentes: l'une avec le support et l'autre avec le phage. Pour l'ion magnésium, les auteurs définissent un simple écrantage des charges à la surface du support et du phage. Le résultat est une diminution de la répulsion entre le support et les phages.

La force ionique du milieu est également un paramètre majeur influençant le comportement des particules virales. La force ionique (mol.l^{-1}) tient compte de la concentration molaire et de la valence des ions en solutions selon la formule suivante :

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

avec c_i la concentration molaire de l'ion et z_i sa valence (Langlet, 2008c).

Shields et Farrah (2002) mettent en évidence, qu'à pH neutre, l'augmentation de la force ionique provoque une diminution de l'adhésion du bactériophage MS2 (chargé négativement) sur une membrane hydrophile chargée positivement. Dans le cas de l'étude d'adhésion à une membrane hydrophobe, les auteurs constatent cette fois l'effet inverse, c'est-à-dire qu'une augmentation de la force ionique favorise l'adhésion de MS2. Ces observations traduisent un écrantage des charges réduisant ainsi les interactions électrostatiques et mettent alors en évidence l'influence des forces hydrophobes. On parle de compression de la double couche entourant le colloïde, correspondant à une diminution de la densité de charges effective des particules. Cette compression serait responsable du rapprochement des particules entre elles: l'agrégation (Shields et Farrah, 1983, Gerba, 1984). Dans le cadre d'étude sur la rétention du bactériophage MS2 au travers d'une colonne de sédiments, Walshe et *al.* (2010) suggèrent que la réduction de la double couche, liée à l'augmentation de la force ionique, permet une meilleure adhésion de MS2 à la matière.

Langlet et *al.* (2008a) indiquent que les virus doivent être considérés comme des particules molles du fait de leur perméabilité. Ils suggèrent notamment une influence de la force ionique sur cette perméabilité. A faible force ionique ($[\text{NaNO}_3] < 20 \text{ mM}$), la capside du bactériophage MS2, arborant des pores, présente une perméabilité hydrodynamique importante permettant à la charge négative de l'ARN de s'exprimer. Au contraire, lorsque la force ionique du milieu augmente, la perméabilité diminue ne laissant plus qu'une contribution négligeable de la part du génome à la charge globale.

En conclusion, l'augmentation de la force ionique modifie l'interaction des virus avec les autres éléments de l'environnement (autres virus, autres colloïdes, surfaces) principalement via la

réduction des interactions électrostatiques répulsives, la formation de ponts salins et la modification de la perméabilité des particules virales.

IV.3.2. pH

Le pH du milieu entraîne la protonation ou déprotonation des groupements ionisables du virus. Il contrôle donc la charge nette des virus non enveloppés et des autres particules présentes, en termes de nature et densité. Rappelons que la charge globale de la particule virale est nulle pour une valeur de pH correspondant au point isoélectrique (pI).

Dowd et *al.* (1998) suite à une expérience de circulation d'une suspension phagique au travers d'une colonne de sable à pH neutre, réalisent un rapport afin de définir la quantité de bactériophages retenus au sein de la colonne. Connaissant la concentration en phage dans le volume affluant et après avoir déterminé la quantité dans le volume effluent, ils observent une corrélation entre le pourcentage de phages retenus et leur point isoélectrique. L'expérience se déroule à pH 7 et ils constatent que plus la valeur de pI se rapproche de 7 moins il y a d'adhésion. En considérant une valeur de pI de 6,6 pour Phi X 174, les auteurs observent une rétention moindre au sein de la colonne par rapport au bactériophage MS2 dont le pI est proche de 3,9. Les auteurs l'expliquent par une quantité de charges négatives moins importante à l'interface virale et donc moins d'adhésion liée aux interactions électrostatiques.

Zhuang et Jin (2008) ont réalisé une expérience d'adhésion sur la goethite avec les bactériophages Phi X 174 ($pI = 6,6$) et MS2 ($pI = 3,9$). L'expérience est réalisée à deux pH différents; 7,5 et 9,3. Dans le premier cas, le support est quasiment neutre électriquement alors que dans la seconde condition la goethite présente une charge négative. Les résultats indiquent une meilleure adhésion à pH 7,5. En effet, à ce pH, plus de charges positives sont présentes, correspondant à plus de sites d'adhésion. La maîtrise du pH de l'expérience est donc un paramètre primordial afin d'appréhender l'état de charge des différents éléments.

IV.3.3. Hydrophobicité

Comme décrit précédemment, les forces hydrophobes viennent s'ajouter aux forces électrostatiques et interactions de van der Waals afin de définir l'attachement des virus. Shields et Farrah (2002) et Aronino et *al.* (2009) mettent en évidence l'hydrophobicité variable entre virus. Leurs études, basées sur l'adhésion/élution de virus à une matière hydrophobe (octyl-Sepharose), concluent que le bactériophage Phi X 174 est de nature hydrophile contrairement notamment au bactériophage MS2 qui est plus hydrophobe. Attinti et *al.* (2010) ont réalisé des mesures d'angle de contact sur des supports recouverts de virus. Leurs résultats indiquent que le bactériophage Phi X 174 présente un angle de contact inférieur à celui de MS2 donc il est plus hydrophile, ou moins hydrophobe que MS2. Dans certaines conditions ces forces hydrophobes sont la cause majeure de l'adhésion des virus. Lytle et *al.* (1999) procèdent à une expérience d'adhésion de phages, dont Phi X 174, sur des membranes hydrophobes et chargées négativement. Le pH est ajusté entre 7,1 et 7,3. En considérant un *pI* de 6,6, les auteurs estiment que le bactériophage présente une charge globale faiblement négative. Ils démontrent qu'à haute force ionique, lors de l'écrantage des charges négatives des membranes et du phage, les interactions non-ioniques (principalement les interactions hydrophobes) sont responsables de l'attachement des bactériophages sur des membranes. En effet, dans leur expérience, l'ajout d'un surfactant non-ionique perturbe grandement l'adhésion des virus sur ces membranes, prouvant l'influence primordiale des forces non-ioniques dans ces conditions. Ainsi, selon les conditions de l'expérience, les interactions hydrophobes peuvent être un des éléments majeurs de l'adhésion des bactériophages, confirmant qu'elles ne doivent pas être négligées.

IV.3.4. Hydrodynamique

Dans les conditions environnementales tout comme dans les systèmes d'expérimentation en colonne, les caractéristiques du flux, vecteurs de virus, constituent un ensemble de paramètres essentiels influençant le comportement des particules virales. Dans les diverses études, ce flux est caractérisé par son débit. Le débit de ce flux peut avoir un impact relatif au comportement de la particule. Walshe et *al.* (2010) considère que l'augmentation du débit favorise la traversée du milieu au travers des « canaux » de diamètre plus important, on parle alors d'évitement d'une partie des interstices selon leur taille. De ce fait, dans cette étude, on observe que l'augmentation du débit provoque une arrivée plus rapide et à plus forte concentration du bactériophage MS2. Les auteurs constatent que l'influence du débit est encore plus marquée dans le cas de particules

virales associées à des colloïdes, cas de la suspension non filtrée. En effet, ces colloïdes font office de vecteur pour le transport des virus et l'on s'attend à ce qu'ils augmentent la rapidité et la distance de transport lors d'expérience où une suspension virale traverse une colonne. Walshe et *al.* (2010) rapportent que dans les eaux naturelles, une grande proportion (77%) des virus est associée à des particules en suspension, tout en restant infectieux. Dans ces conditions, les auteurs indiquent que le débit serait le paramètre majeur influençant le transport des virus parmi tous les facteurs étudiés (pH, force ionique, présence de matière organique). McKay et *al.* (2002) mettent également en évidence l'importance du débit et observent une corrélation linéaire entre l'augmentation du débit et la récupération de particules virales dans l'effluent, pour le bactériophage MS2.

IV.3.5. Température

La température est un paramètre de l'environnement influençant le comportement et notamment l'adhésion et l'inactivation des particules virales (Allwood et *al.*, 2004). En théorie, l'augmentation de la température du milieu augmente l'agitation thermique favorisant les collisions entre particules et ainsi l'adhésion potentielle de celles-ci, que ce soit entre elles (agrégation) ou sur des sites d'adhésion présents sur une surface. Cependant une augmentation trop importante de la température a un impact sur la stabilité des protéines de capsid et donc sur la survie des virus et leurs capacités d'adhésion. Ainsi la température aura une importance variable selon le modèle viral du fait de la composition de sa capsid (Feng et *al.*, 2003).

IV.3.6. Surface de contact

Afin de déterminer l'adhésion des particules virales en conditions environnementales, des expériences dites en colonne sont réalisées (Sobsey et *al.*, 1995; Jin et *al.*, 2000). Celles-ci consistent en une colonne de sédiments, dont les propriétés sont connues. A travers la colonne, des volumes de suspension virale peuvent circuler. Dans ces conditions, la porosité de la matrice utilisée pour constituer la colonne est un paramètre à considérer. La porosité est définie comme l'ensemble des interstices pouvant contenir des fluides. Ainsi, la porosité peut être exprimée par le rapport entre le volume interstitiel et le volume total. La taille des grains composant le milieu est également un facteur important. Plus le grain de la matrice est petit, plus il y a de surface de contact avec le fluide. Par exemple, en considérant un même volume de grains sphériques, une diminution de 50 % du diamètre induit une surface de contact deux fois plus importante (Knappett

et *al.* 2008). Ainsi, la rétention des virus au sein du milieu est favorisée par une porosité importante et une petite taille de grain, permettant un contact accru entre le fluide contenant les virus et les sites d'adsorption du milieu. La présence de rugosité (aspérités) rendant une surface plus ou moins homogène pourrait donc jouer un rôle quant à l'adhésion des virus sur cette surface.

IV.3.7. Matière organique

La matière organique présente dans l'environnement est un élément supplémentaire venant s'ajouter à la liste des paramètres influençant le comportement des virus. La matière organique en solution présente des charges et pourrait entrer en compétition avec les virus pour l'adhésion via des interactions électrostatiques. C'est ce qu'indique Walsche et *al.* (2010) en démontrant une diminution de l'adhésion des virus dans leur colonne de sédiments, liée à l'augmentation de la concentration en matière organique dissoute. Pham et *al.* (2009) démontrent qu'en présence de matière organique naturelle, l'adhésion des virus peut être plus ou moins facilitée en fonction des ions présents en solution. Ainsi les ions Ca^{2+} permettent la formation de liaisons pontantes entre les multiples charges négatives de la matière organique et celles des virus. La matière organique, de par le nombre de sites chargés pouvant potentiellement interagir avec les charges portées par les virus, accroît le décalage entre le comportement des virus en condition expérimentale et en condition environnementale.

En conclusion, les interactions entre les particules virales et l'environnement sont un processus complexe dépendant d'une multitude de paramètres allant de la structure même de la particule aux propriétés physicochimiques du milieu. Ces influences variables rendent difficile le lien entre l'interprétation des expériences et l'estimation de l'adhésion ou de l'agrégation en condition environnementale. L'étude du phénomène adhésion/agrégation se révèle spécifique au virus utilisé et aux différentes conditions étudiées à savoir l'état de purification de la solution virale.

2e partie

Impact du génome sur les propriétés
interfaciales du bactériophage MS2 et
influence de la méthode de purification

L'objectif de cette deuxième partie est de valider de manière expérimentale l'hypothèse de l'impact du génome sur la charge électrostatique du phage MS2 émise de manière théorique par Langlet et *al.*, (2008a). Raisonnant en termes d'interface virale, ces auteurs à l'aide du profil radial de la distribution de densité calculée sur la base de mesures obtenues en cryo-électromicroscopie pour le phage MS2 ont développé un modèle, montrant de manière théorique une influence des couches internes sur la charge électrostatique globale de cette particule virale. Dans la littérature, cette notion d'interface reste très nouvelle concernant les virus bien qu'elle ait été démontrée pour d'autres particules biologiques (bactéries).

Pour mettre en évidence cet impact des structures internes concernant le bactériophage MS2, nous avons dans un premier temps comparé les profils d'agrégation et les caractéristiques électrocinétiques des phages MS2 avec les *Virus Like Particles* (VLPs) correspondantes. La mesure de ces propriétés interfaciales a été effectuée en milieux aqueux dans des conditions de pH et de force ionique contrôlées à l'aide de l'appareil Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). La sensibilité de cet appareil a nécessité des concentrations virales élevées supérieures à 10^9 UFP/ml. Lors de cette première comparaison, les suspensions virales ont été purifiées par dialyse (Langlet et *al.*, 2008a).

Dans un second temps, l'influence de la méthode de purification a été évaluée sur ces deux types de particules virales. Cet aspect permettrait de déterminer si les supposées différences observées entre les particules complètes et les particules synthétiques seraient dues ou non à un possible impact du protocole de purification adopté avant l'étude des propriétés interfaciales.

I. Impact de l'ARN interne sur l'agrégation et l'électrocinétique: comparaison entre MS2 et VLPs correspondantes

Le point isoélectrique du phage MS2 diffère lorsqu'il est mesuré de manière expérimentale et de manière théorique uniquement à partir des acides aminés de la capside constituant ce phage. La question se pose alors de savoir quels sont les éléments constitutifs du phage participant à cette valeur basse de point isoélectrique. De leurs travaux sur le bactériophage MS2 en question, Langlet et *al.* (2008a) déduisent qu'il existe une certaine perméabilité hydrodynamique au flux et aux solvants à l'intérieur des particules virales déterminée à partir de mobilités électrophorétiques expérimentales. L'influence de ce paramètre conduirait donc à l'implication de toutes les couches

structurales du virus dans les propriétés dites interfaciales. Nous avons pour la première fois comparé la mobilité électrophorétique des particules de MS2 avec les *Virus Like Particles* (VLPs) correspondantes. Les VLPs sont des particules virales dépourvues de génome viral. Cette comparaison en termes de charge électrostatique et de capacité d'agrégation permettrait de démontrer principalement l'impact du génome sur ces propriétés.

Les résultats montrent un comportement différent entre les phages complets et les particules dépourvues de génome. Les profils d'agrégation diffèrent totalement entre les deux types de particules. On distingue des VLPs qui s'agrègent uniquement à la valeur du point isoélectrique et à faible force ionique tandis que le phage MS2 s'agrège quelle que soit la force ionique à partir de son point isoélectrique jusqu'aux valeurs de pH plus acides. Le comportement des VLPs ainsi observé traduit alors typiquement les interactions intervenant entre particules molles (Duval et *al.*, 2011). En effet, la présence d'agrégation au point isoélectrique et à faible force ionique uniquement montre l'implication plus ou moins importante des différentes couches constitutives du phage. A haute force ionique (100 mM), ces interactions sont gouvernées par l'implication des capsides majoritairement qui par des forces répulsives entre elles, empêche l'agrégation des particules. A faible force ionique (1 mM), l'implication des structures internes devient plus importante, à la valeur du point isoélectrique, les forces attractives deviennent prédominantes et engendrent l'agrégation.

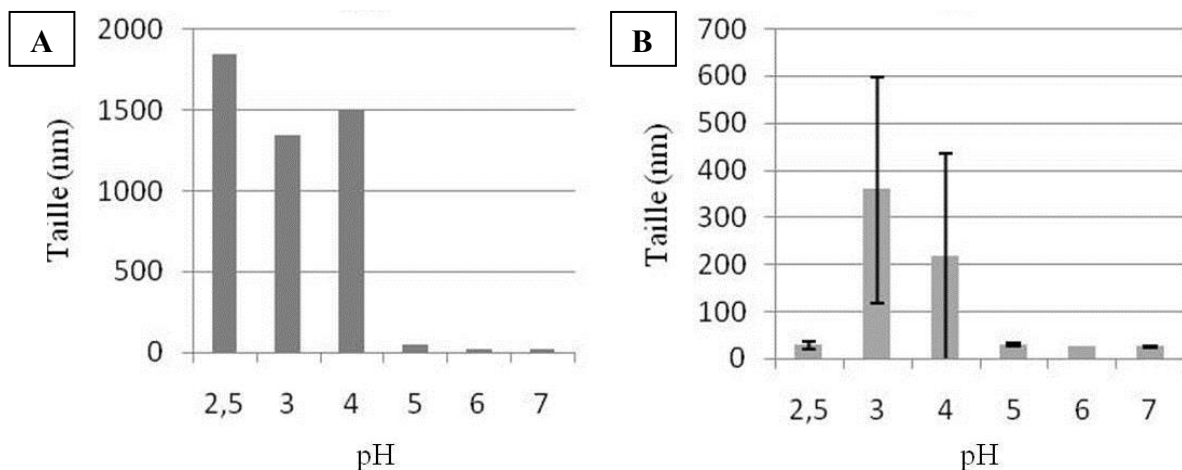


Figure 17. Diamètre des phages MS2 (A) et des VLPs-MS2 (B) en fonction du pH à 1 mM de NaNO₃.

Afin de comparer les densités de charge électrostatique des deux types de particules virales, la charge a été estimée à partir de la représentation de la mobilité électrophorétique en fonction du logarithme de la force ionique. En effet, selon Langlet et *al.* (2008a), la pente de cette courbe représente le ratio densité de charge interne par rapport à la densité de charge externe

d'une particule virale. Le plateau observé à haute force ionique est la caractéristique principale des particules dites molles et serait un reflet de leurs différentes perméabilités (Langlet et *al.*, 2008a). Les résultats en Figure 18A montrent un comportement électrocinétique différent entre ces deux types de particules avec une pente plus abrupte pour le virus complet indiquant que le phage MS2 possède une densité de charge interne négative plus importante par rapport aux VLPs. Les données expérimentales ont pu permettre de modéliser de manière qualitative le comportement de ces deux types de particules virales estimant ainsi la perméabilité et la densité de charge interne de chaque particule illustrée dans les Figures 18B et 18C. La Figure 18C reflète ainsi une charge interne plus élevée pour le phage MS2 et la Figure 18B une perméabilité plus importante pour les VLPs. L'ensemble des résultats obtenus remet en cause l'utilisation des VLPs comme modèle des phages complets correspondants due à la variabilité des propriétés interfaciales entre ces deux types de particules.

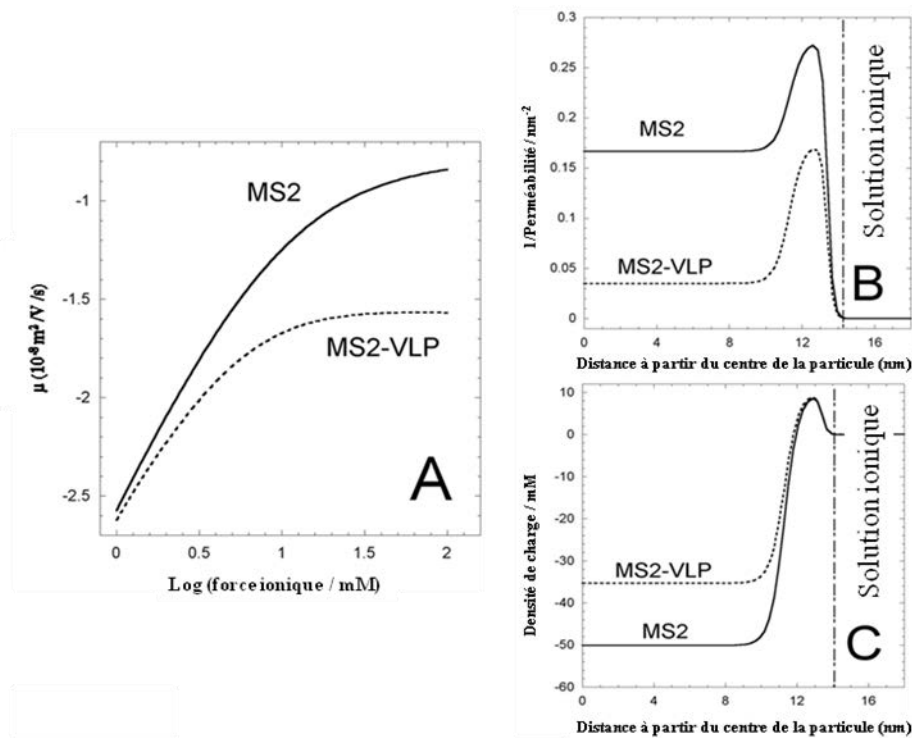


Figure 18. (A) Reconstruction qualitative du positionnement respectif de la mobilité par rapport à des courbes de force ionique pour MS2 et VLPs-MS2. Cette figure illustre l'impact électrostatique et hydrodynamique de la partie interne des particules virales sur la mobilité électrophorétique μ . Les données ont été obtenues en utilisant la théorie de Langlet et *al.* (2008a) sur l'électrohydrodynamique de particules molles à multicouches. A cet effet, les profils spatiaux de la friction ($\sim 1/\text{Perméabilité}$) et de la densité de charge (exprimée en concentration de groupes équivalents ionisés) à travers les particules sont ceux détaillés dans les panneaux B et C, respectivement. Comme base de ces calculs, nous avons considéré les paramètres d'hétérogénéité, épaisseur des différentes couches, génome et capside (valeurs détaillées dans Langlet et *al.* (2008a) pour le phage MS2).

Impact of Internal RNA on Aggregation and Electrokinetics of Viruses: Comparison between MS2 Phage and Corresponding Virus-Like Particles[†]

C. Dika,¹ J. F. L. Duval,^{2,*} H. M. Ly-Chatain,¹ C. Merlin,¹ and C. Gantzer^{1*}

Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy-Université, CNRS, Faculté de Pharmacie, 54000 Nancy, France,¹ and Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, CNRS, 54501 Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France²

Received 23 February 2011/Accepted 18 May 2011

We compare for the first time the electrokinetic and aggregation properties of MS2 phage (pH 2.5 to 7, 1 to 100 mM NaNO₃ electrolyte concentration) with those of the corresponding virus-like particles (VLPs), which lack entirely the inner viral RNA component. In line with our previous work (J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer, and J. F. L. Duval, *Biophys. J.* 94:3293–3312, 2008), it is found that modifying the content of RNA within the virus leads to very distinct electrohydrodynamic and aggregation profiles for MS2 and MS2 VLPs. Under the given pH and concentration conditions, MS2 VLPs exhibit electrophoretic mobility larger in magnitude than that of MS2, and both have similar isoelectric point (IEP) values (~4). The electrokinetic results reflect a greater permeability of MS2 VLPs to electroosmotic flow, developed within/around these soft particles during their migration under the action of the applied electrical field. Results also support the presence of some remaining negatively charged component within the VLPs. In addition, MS2 phage systematically forms aggregates at pH values below the IEP, regardless of the magnitude of the solution ionic strength, whereas MS2 VLPs aggregate under the strict condition where the pH is relatively equal to the IEP at sufficiently low salt concentrations (<10 mM). It is argued that the stability of VLPs against aggregation and the differences between electrokinetics of MS2 and corresponding VLPs conform to recently developed formalisms for the stability and electrohydrodynamics of soft multilayered particles. The differences between the surface properties of these two kinds of particles reported here suggest that VLPs may not be appropriate for predicting the behavior of pathogenic viruses in aqueous media.

Understanding the behavior of virus particles of enteric pathogens (e.g., norovirus, hepatitis A virus) in terms of aggregation or adhesion is mandatory for addressing appropriately the processes involved in, e.g., viral dissemination or water treatment (9, 11). In that respect, much effort is now devoted to the analysis of the so-called surface properties of viruses, which are impacted by solution pH, ionic strength, or the presence of organic matter (20). The importance of viral surface properties within the framework of water treatment is well illustrated by the relationship between the efficiency of membrane filtration for removing viruses and the charge and degree of hydrophobicity of these biocolloids (11).

According to standard formulations of Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) representation and electrokinetic theories for hard (impermeable) particles, a parameter commonly used as an indicator for the sign and magnitude of charge carried by a virus in a solution of given pH is the difference between the pH and the so-called isoelectric point (IEP) of the virus, defined as the pH value at which virus

electrophoretic mobility is zero (14). Within the regime of partial dissociation of charges located at the surface, the higher (or lower) the solution pH is than the IEP, the more negative (or positive, respectively) is the viral charge, and the reverse is true for a pH value lower than the IEP. Along this line of reasoning, MS2 phage is classically viewed as a model system for defining the performance of membrane or sand filtrations with respect to removal of pathogenic viruses. One reason for this is the low IEP of MS2 phage (about 3.5), which corresponds to the (supposedly) worst possible situation (20, 25) in terms of (repulsive) electrostatic interactions between the virus and the membrane and thus membrane removal efficiency in aqueous media at neutral pH. Note that this use of MS2 as a model system (25, 27) has been adopted despite the limited knowledge on the surface properties of pathogenic viruses, such as noroviruses. A major difficulty for studying noroviruses is that they are nonculturable and therefore cannot be produced in sufficiently high concentration for appropriate physicochemical analysis. As a result, one alternative apart from considering MS2 as a model system consists of the use of synthetic viral particles known as virus-like particles (VLPs). Usually, VLPs are produced after the structural genes of a given virus capsid protein are expressed and then self-assemble to form a supposedly empty (virus-like) particle. The first norovirus VLPs were produced for the Norwalk virus in 1992, and this initiated the use of these particles as model systems (7) for understanding and predicting the behavior of viruses in filtration processes (17, 21) or in terms of persistence in shellfish

* Corresponding author. Mailing address for C. Gantzer: Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, Nancy-Université, CNRS, 5 Rue Albert Lebrun, F-54250 Nancy, France. Phone: 33 3 83 68 22 91. Fax: 33 3 83 68 23 78. E-mail: Christophe.Gantzer@pharma.uhp-nancy.fr. Mailing address for J. F. L. Duval: Laboratoire Environnement et Minéralurgie, Nancy-Université, CNRS, 15 Avenue du Charmois, 54501 Vandœuvre-Lès-Nancy, France. Phone: 33 3 83 59 62 63. Fax: 33 3 83 59 62 55. E-mail: Jerome.Duval@ensg.inpl-nancy.fr.

[†] Published ahead of print on 27 May 2011.

(13). Norovirus VLPs are morphologically and antigenically similar to the viruses from which they are derived, except that they are lacking the viral genome and therefore are not pathogenic. Both types of particles were shown to exhibit similar stability features regarding their integrity with respect to pH and temperature conditions (1a).

While IEP data surely contribute to addressing the overall charge/surface properties of viruses as a function of pH, it must be recognized that they only partly reflect the electrostatic properties of these particles. The IEP value of viruses, which are paradigms of permeable (soft) multilayered biocells (10), is significantly impacted by their permeability to external flow (electroosmotic flow developed during the migration of the particles under the action of the externally applied field), as theoretically and experimentally demonstrated by Langlet et al. (10). The IEP of soft multilayered particles is generally a complex, ionic-strength-dependent signature of the intertwined electrostatic and permeability properties of the whole particle. Contrary to common belief, the IEP does not depend solely on the nature of the viral surface charge (in particular, pK value), i.e., the charge located at the outer edge of the capsid part of the virus. Instead, it is governed by the respective physicochemical characteristics (e.g., nature and spatial distribution of charges, permeability) of the layers constituting the particle, i.e., the inner RNA and the outer proteic capsid in the case of F-specific RNA bacteriophages (e.g., MS2) and noroviruses.

For MS2 phage, the measured IEP value (~ 3.5 to 3.9) is lower than that expected if considering the capsid (IEP of >8) (10, 15, 19) only. As detailed previously (10), the dependence of electrophoretic mobility of MS2 phage on solution ionic strength is typical of that classically encountered for soft (i.e., permeable) particles. In particular, the interpretation of data according to rigorous theory for multilayered soft-particle systems (like MS2) evidenced that permeability of MS2 to electroosmotic flow allows a significant intrusion of flow within the inner RNA component. In turn, IEP value and MS2 mobility are significantly impacted by particle permeability and nature of the charges (e.g., number density and pK dissociation values) located within the heart of the virus. Then, the measured electrophoretic mobility significantly reflects the chemical composition of the virus genome, for which the zero point of charge is about 2.9 (10). This dismisses the interpretation of the low IEP value given by Penrod et al. (15), who argued that the IEP value and thereby the virus mobility reflect the sole contribution of the amino acids located at the outer edge of the capsid. Such line of reasoning is indeed incompatible with the presence of a finite mobility plateau value (nonzero plateau value) at large ionic strengths. This plateau denotes a strong permeation of the virus to flow (see computations in reference 10) and therefore a strong contribution of internal RNA in defining the electrokinetics of MS2 as a whole. Such behavior is characteristic of permeable colloids, whereas a monotonous decrease of the mobility toward zero value is expected for hard (i.e., impermeable) biocolloidal systems (3, 4) under high-salinity conditions.

In line with these elements, much theoretical and experimental work now clearly evidences that electrophoretic mobility of soft bioparticles, like viruses or bacteria, cannot simply be converted into a zeta potential or interpreted in terms of sur-

face charge (3). Instead, to achieve a quantitative interpretation of the electrokinetic response of viruses, a rigorous evaluation of the fundamental electrohydrodynamic equations must be carried out, taking into account the variations in soft-material density, chemical composition, and degree of flow penetration from the center of the virus (RNA part) to the outer peripheral shell layer (capsid part) (10).

To the best of our knowledge, available reports in the literature on the physicochemical properties of noroviruses over a large range of ionic strengths and pH values are based on data collected for VLPs, which are viewed as surrogates. Because previous studies (9, 10, 11) suggested a significant role of the internal genome in governing the overall electrokinetic properties of (complete) viral particles, the question arises whether or not VLPs may truly be considered model systems for their pathogenic equivalents. In this study, we report the first comparison between a virus (in this case, MS2) and its corresponding VLPs in terms of electrokinetic and aggregation properties. Qualitative comparison of the electrophoretic mobilities, measured for these particles as a function of ionic strength and pH, gives insight into their respective electrostatic and flow permeability properties. Furthermore, size measurements were carried out to provide additional information on the stability of these viruses with respect to aggregation, recalling that stability is governed partly by the charge properties of the virus. Major differences are found for the two types of viral particles examined. This means that VLPs may not be suitable model systems for predicting behavior of pathogenic viruses, mainly because of the significant impact of the internal genome on the overall physicochemical properties of viruses.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of suspensions of MS2 F-specific RNA phage. MS2 bacteriophage was obtained from a reference culture (ATCC 15597-B1). The phage was replicated according to the procedure NF EN ISO 10705-1 (October 2001; 1) using *Escherichia coli* Hfr K-12 (ATCC 23631) as host cells. After replication, the suspension of phage was centrifuged (Beckman model J2-22, $27,000 \times g$, 60 min, 4°C), and the supernatant was filtered using a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ membrane (Millex-GP; Millipore). The suspension was then purified by dialysis with a $100,000$ -molecular-weight cutoff (131420; Spectrum), first against deionized water for 14 h and then against NaNO_3 1 mM , pH 6.7 , for 14 h. In a final step, the phage suspension was filtered once more using a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ membrane and stored in NaNO_3 1 mM at 4°C prior to any measurement. The viral concentration obtained following the above-described protocol was $\sim 3.10^{11}$ PFU ml^{-1} .

Synthesis of MS2 VLPs. The plasmid pETCT, containing the MS2 capsid gene cloned under the control of a T7 promoter, was kindly provided by D. S. Peabody (University of New Mexico) and introduced into strain BL21(DE3) of *E. coli* (12) using standard transformation procedures (18). MS2 VLPs were produced from strain BL21(DE3)(pETCT) according to the method of Lima et al. (12), with slight modifications. Briefly, *E. coli* BL21(DE3)(pETCT) was cultivated in LB (lysogeny broth) supplemented with $50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin (pETCT selection) at 37°C . At an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.6 , the culture was induced for the production of the capsid protein with 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) for 3 h at 37°C . Cells were then collected by centrifugation ($6,000 \times g$, 20 min, 4°C), resuspended in a 1 mM solution of NaNO_3 at pH 8 (1/5 of the initial volume), and further treated with 0.05 mg ml^{-1} of lysozyme for 30 min at room temperature, after which they were finally sonicated for 3 min at 51 W . Cell debris was eliminated by centrifugation ($13,500 \times g$, 20 min, 4°C), and the VLP-containing supernatant was filtered through a $0.22\text{-}\mu\text{m}$ membrane (Millex-GP) before storage at 4°C . Proteins from the collected capsid were analyzed both by SDS-PAGE with Coomassie blue staining and by transmission electronic microscopy to further ascertain the self-assembly of the proteins as VLPs and their "empty" character (Fig. 1D). SDS-PAGE results obtained for both MS2 and VLPs revealed the same bands, including that corresponding to the coat protein ($14,000\text{ Da}$). However, the absence of maturase in the proteic capsid of

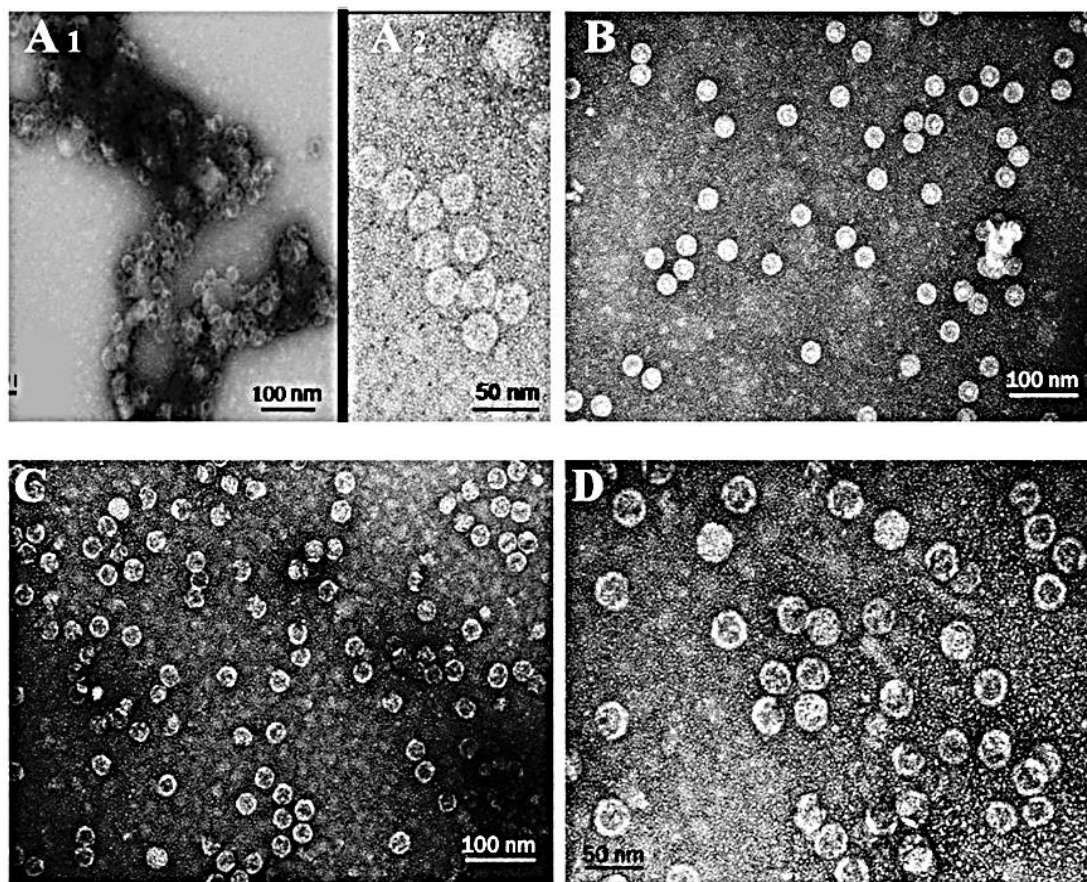


FIG. 1. Transmission electron microscopy of MS2 bacteriophage (A and B) and MS2 VLPs (C and D) at pH 3 (A and C) and pH 7 (B and D). MS2 phage and VLPs initially obtained in NaNO_3 1 mM solution were adsorbed on the grids and negatively stained with uranyl acetate. Samples were observed with magnifications of $\times 50,000$ (bar, 100 nm) and $\times 80,000$ (bar, 50 nm).

VLPs cannot be demonstrated because its concentration is 180 times lower than that of the major capsid proteins.

Transmission electron microscopy. The samples of interest in this study were adsorbed on grids and negatively stained with 2% uranyl acetate. Then, they were examined at 200 kV and magnifications of $\times 80,000$ and $\times 50,000$ using a Philips CM20 electronic microscope.

Size and electrophoretic mobility measurements. Prior to size and electrophoretic mobility measurements, MS2 and MS2 VLPs were filtered to eliminate possible large aggregates (0.22 μm). The sensitivity of the apparatus requires working with high viral suspension concentrations (up to 10^9 PFU ml^{-1}). Samples were then poured into a polypropylene tube directly screwed into a personal computer (PC)-monitored titrator connected to a Zetasizer NanoZS instrument. Size and electrophoretic mobility were measured as a function of pH (range of 2.5 to 7) in NaNO_3 electrolyte (concentration in the range of 1 to 100 mM) at $22 \pm 0.1^\circ\text{C}$ using a Zetasizer NanoZS instrument (He-Ne red laser, wavelength of 633 nm; Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom). Experiments were driven by Dispersion Technology Software (DTS), provided by Malvern Instruments. Electrophoretic mobilities were measured by laser Doppler electrophoresis, also known as phase analysis light scattering. The rate of change of the phase shift between the scattered light and a reference beam is correlated to the particle velocity and thus allows for evaluating the electrophoretic mobility. The size distribution of the viral suspensions under investigation was determined using dynamic light scattering (DLS), also incorporated in the ZetaSizer NanoZS instrument mentioned above. DLS allows the measurement of the Brownian motion of the particles, that is, the time dependence of the intensity fluctuations. The diffusion coefficient (D) of the viruses can be extracted from appropriate fitting of the autocorrelation function. As a first approximation, the diffusion coefficient can be converted into particle size using the Stokes-Einstein equation.

Investigation of the effects of pH and ionic strength on viral size and electrophoretic mobility was carried out using an Autotitrator MPT-2 (Malvern, United Kingdom). It enables automatic variation of pH and ionic strength upon addition of predefined volume increments of HCl 0.1 M and NaOH 0.1 M and volume increments of NaNO_3 0.1 mM, 1 mM, or 500 mM (all solutions were filtered with a 0.22- μm membrane). For a given pH and salt concentration, size and electrophoretic measurements were realized three to four times to ensure the repeatability of the results.

RESULTS

MS2 and MS2 VLP size measurements. The stability properties of MS2 and MS2 VLPs with respect to aggregation were determined by size measurements under different conditions of pH (from 2.5 to 7) and ionic strength (1, 10, and 100 mM). From results shown in Fig. 2A, we conclude that MS2 phage is in nonaggregated form for pH values greater than 4, irrespective of the ionic strength level in solution. Under such conditions, the diameters of the particles vary between 20 and 30 nm, which is in agreement with the size reported for MS2 particles (22, 23, 24). The size of the MS2 particles as obtained by DLS is supported by independent electron microscopy measurements (Fig. 1B) that confirm the presence of isolated viral particles all over the grid of observation. Conversely, for pH

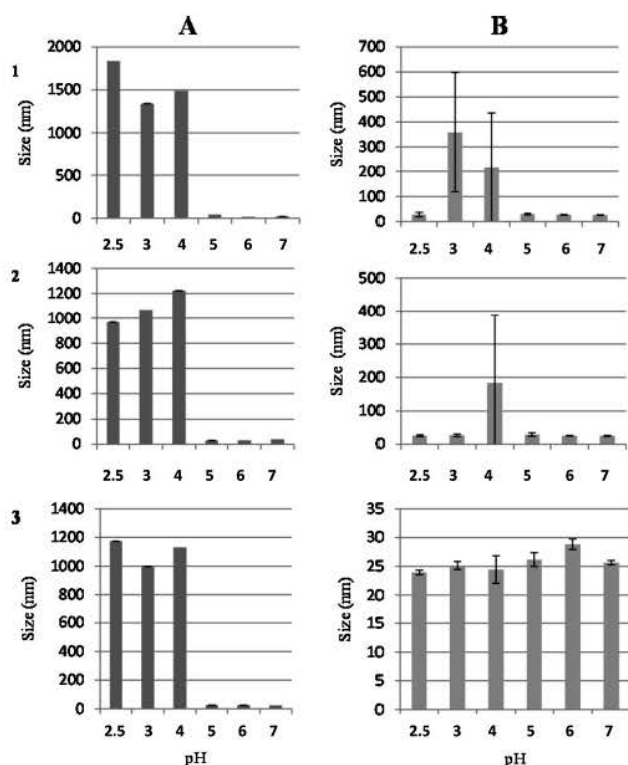


FIG. 2. Size (diameter) measurements for MS2 phage (A) and MS2 VLPs (B) as a function of pH (indicated) and NaNO₃ salt concentration (1 mM [1], 10 mM [2], and 100 mM [3]). Error bars indicate standard deviations.

values lower than or equal to 4, MS2 phage systematically forms aggregates over the entire range of salt concentrations examined. The mean effective size of these aggregates is between 1.2 μ m and 1.8 μ m. These results are in agreement with electron micrographs (Fig. 1A1) which clearly depict assemblies of viruses in contact with each other all over the grid. Magnification of these particle assemblies (Fig. 1A2) further suggests that the viral particles maintain their native structure within the aggregates.

Figure 2B displays the size measured for the VLPs as a function of pH and ionic strength. Clearly, the stability of MS2 VLP suspensions against aggregation dramatically differs from that of MS2 phage. Aggregation is detected for pH of $\sim$ 3 to 4 at low electrolyte concentrations (1 mM and 10 mM), while suspensions of VLPs are stable against aggregation at 100 mM over the entire range of pH values tested. Aggregates of VLPs, when present, exhibit a mean size of about 200 to 300 nm, i.e., smaller than that obtained for MS2 aggregates at low pH. Keeping in mind the presence of MS2 VLP aggregates in a narrow pH window, electron microscopy reveals isolated MS2 VLPs at pH 3 and 7 in 1 mM NaNO₃ (Fig. 1C and D). The absence of aggregates at pH 3 from electron microscopy analysis seems to contradict the size measurements reported in Fig. 2B and obtained independently using NanoZS equipment. This discrepancy might be explained by the high instability of the VLP suspensions within a narrow pH window, so that, in turn, only small differences in pH from one VLP suspension to

another may lead to the observation or lack of observation of VLP aggregates. This explanation is supported by the recent analysis by da Silva et al. (2) on the adsorption/aggregation properties of norovirus genogroup I and II (GI and GII) VLPs. These authors indeed argued that the "observed variability in [sticking coefficient] near the pI [i.e., isoelectric point] may be due to small differences in bulk pH that cause dramatic shift in charge balance."

All data discussed above were obtained in an experimental setup with continuous decreases in the pH and with the measurements of particle size carried out for a selection of pH values as shown in Fig. 2. This tends to demonstrate that MS2 VLP aggregation is a reversible phenomenon when the pH is gradually decreased below 3 to 4, which is not the case for MS2 phage. In order to rule out the possibility that MS2 aggregates obtained at pH 4 were in an irreversible state when the pH was further decreased, aggregation experiments were repeated in batches at pH values set independently. Here again, MS2 aggregation was systematically observed for pH values below 4. This suggests that, under such pH conditions, attractive forces associated with MS2 phage are dominant over repulsive forces.

Electrokinetics. The above-described aggregation profiles clearly point out basic differences regarding MS2 and MS2 VLP surface particles. Such differences in behavior were further investigated by electrokinetics. The electrophoretic mobilities (here denoted as μ) for MS2 phage and VLPs were measured as a function of pH in NaNO₃ solutions of concentration 1 mM, 10 mM, and 100 mM (Fig. 3). As a general comment, for a given salt concentration, the absolute value of the mobility ($|\mu|$) decreases when the solution pH is decreased and eventually changes sign at sufficiently low pH, as observed for VLPs. In addition, for both VLPs and MS2, $|\mu|$ decreases upon increase of salt concentration at fixed pH, in agreement with an increased screening of the particle charges by ions present in the medium (3, 10). However, the profiles of μ versus pH are significantly different for MS2 phage and corresponding VLPs. The striking feature is that μ measured for VLPs changes sign at pH values less than 3 to 4, while for MS2 phage, μ basically remains negative over the entire range of pH values. As noted in the Discussion, this basic difference in electrokinetic response of MS2 and MS2 VLPs coincides with the different stability properties of these particles against aggregation (Fig. 2). Langlet et al. (10) indeed demonstrated that predictions of soft-particle electrokinetic theory failed to recover mobility data of MS2 phage at lower pH values. Theoretical electrophoretic mobilities were systematically larger than experimental data and underpinned a clear change of sign in mobility, unobserved in experiments for MS2. The reason for the above-described discrepancy is that the theory outlined in reference 10 is valid strictly for isolated particles and is not applicable for aggregates, around/within which electroosmotic flow stream lines significantly differ from situations seen with isolated particles. Unlike MS2, VLPs do not aggregate at low pH, which is consistent with a clear change of sign for the electrophoretic mobility. The variation of μ with pH for VLPs roughly follows a sigmoid curve, reminiscent of that typically obtained for particles whose charge stems from the dissociation of amphoteric groups. Quantitatively, for a given salt concentration, $|\mu|$ measured at a pH of $\sim$ 7 for VLPs is larger than that for MS2 phage under similar pH and ionic strength con-

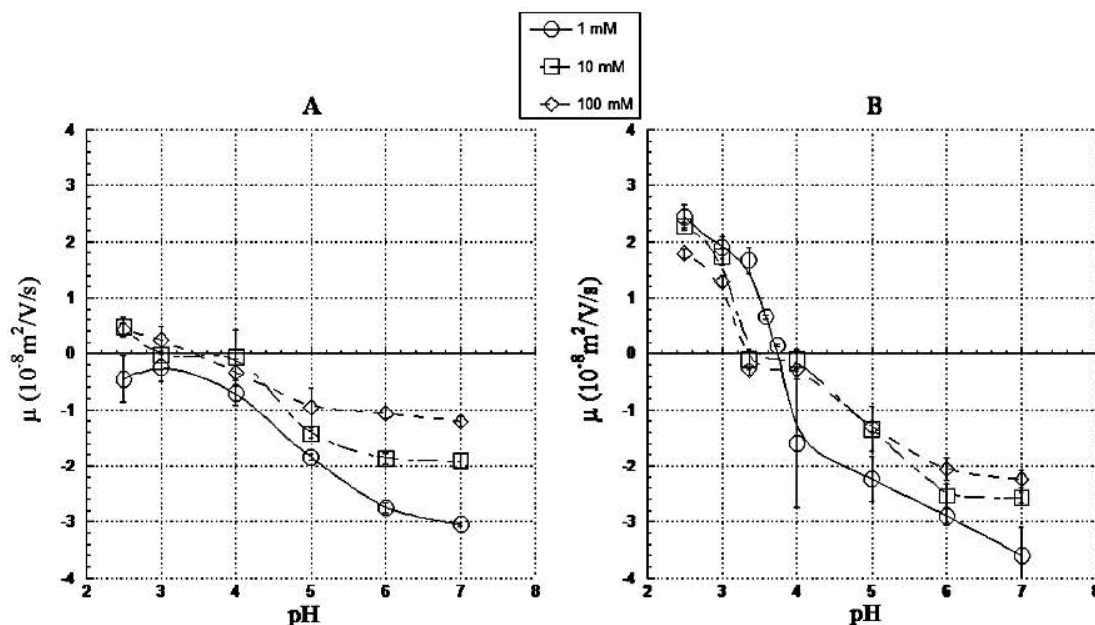


FIG. 3. Electrophoretic mobility of MS2 bacteriophage (A) and MS2 VLPs (B) as a function of pH for three NaNO_3 electrolyte concentrations, 1 mM, 10 mM, and 100 mM (indicated). The solid and dotted lines are only guides to the eye. Measurements were done in triplicate. Error bars indicate standard deviations.

ditions. When the pH is decreased, the rate of decrease for $|\mu|$ is higher for VLPs than for MS2 phage. From the data shown in Fig. 3, we obtain an IEP of about 3.4 to 3.8 for the VLPs, while that for MS2 is around 3.5, a value obtained by extrapolating to low pH the mobility measured for the nonaggregated form of MS2 at high pH.

The dependence of μ on salt concentration is shown in Fig. 4 for VLPs and MS2 under pH conditions where both types of particles are stable against aggregation (pH = 7). In the inset, mobility data are plotted according to a linear scale of salt concentration. As previously mentioned, $|\mu|$ decreases with increasing salt concentration as a result of particle charge screening. At sufficiently high concentrations, $|\mu|$ reaches asymptotically a nonzero plateau value. The presence of this plateau is typical for the soft (permeable) nature of the particles investigated, thereby confirming the inadequacy of converting mobility data into zeta potential or surface charge (3, 4). At a given electrolyte concentration, $|\mu|$ of VLPs is systematically larger than that of MS2. In addition, the rate of decrease of $|\mu|$ with increasing salt concentration is higher for MS2 than for VLPs. As extensively noted in the Discussion, the theory reported in reference 10 for electrokinetics of soft multilayered particles, like viruses, fully supports these experimental findings (Fig. 5).

DISCUSSION

From their analysis of electrokinetics of MS2 phage, Langlet et al. (10) concluded that MS2 phage is a paradigm of multilayered soft (or permeable) particles with the inner RNA and the outer proteic capsid as components, both permeable to external fluid flow as experienced by the virus in electrophoresis. The main purpose of the current study is to refine our understanding of the impact of the viral genome on the phys-

icochemical properties of the virus, which are known to affect virus behavior under environmental conditions or the capacity for virus removal during water treatment. To do so, electrophoretic mobilities and particle sizes were compared for MS2 and corresponding VLPs as a function of pH and salt concentration.

MS2 phage and mobility data in literature. Penrod et al. (14) measured the electrophoretic mobility (μ) of MS2 in the pH range of 3 to 9 at a 10 mM NaCl concentration. Their results indicated that μ is independent of pH for pH values greater than 5, with a μ value of $\sim -0.7 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The mobility further decreased in magnitude with decreasing pH, and then it changed sign at low pH to reach a μ value of $\sim 0.5 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at a pH of ~ 3 . The obtained IEP for MS2 was estimated at 3.5. Redman et al. (17) analyzed the electrophoretic mobility of MS2 under the same conditions and obtained identical results. In the current work, mobility was measured at three NaNO_3 solution concentrations (1 mM, 10 mM, and 100 mM) in the pH range of 2.5 to 7 (Fig. 3). For the 10 mM concentration at pH 7, the mobility (μ) value of $\sim -2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ is much lower than that obtained by Penrod et al. (14) and Redman et al. (17) under similar conditions, whereas results at a pH of 2.5 (μ value of $\sim 0.5 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$) are similar. There is no obvious explanation for this difference. It may be linked to the preparation and purification of phage suspension. We avoided the use of CsCl gradient purification, which has been shown to favor virus aggregation in some instances. This aggregation is known to strongly impact electrokinetics (10). Zolotukhin et al. (28) showed that treatment with CsCl leads to a reduction of viral infectivity in recombinant adeno-associated virus as a result of probable particle aggregation. Hosokawa et al. (6) also demonstrated that the standard method of ultracentrifugation in CsCl for preparing a high titer of purified recombinant ade-

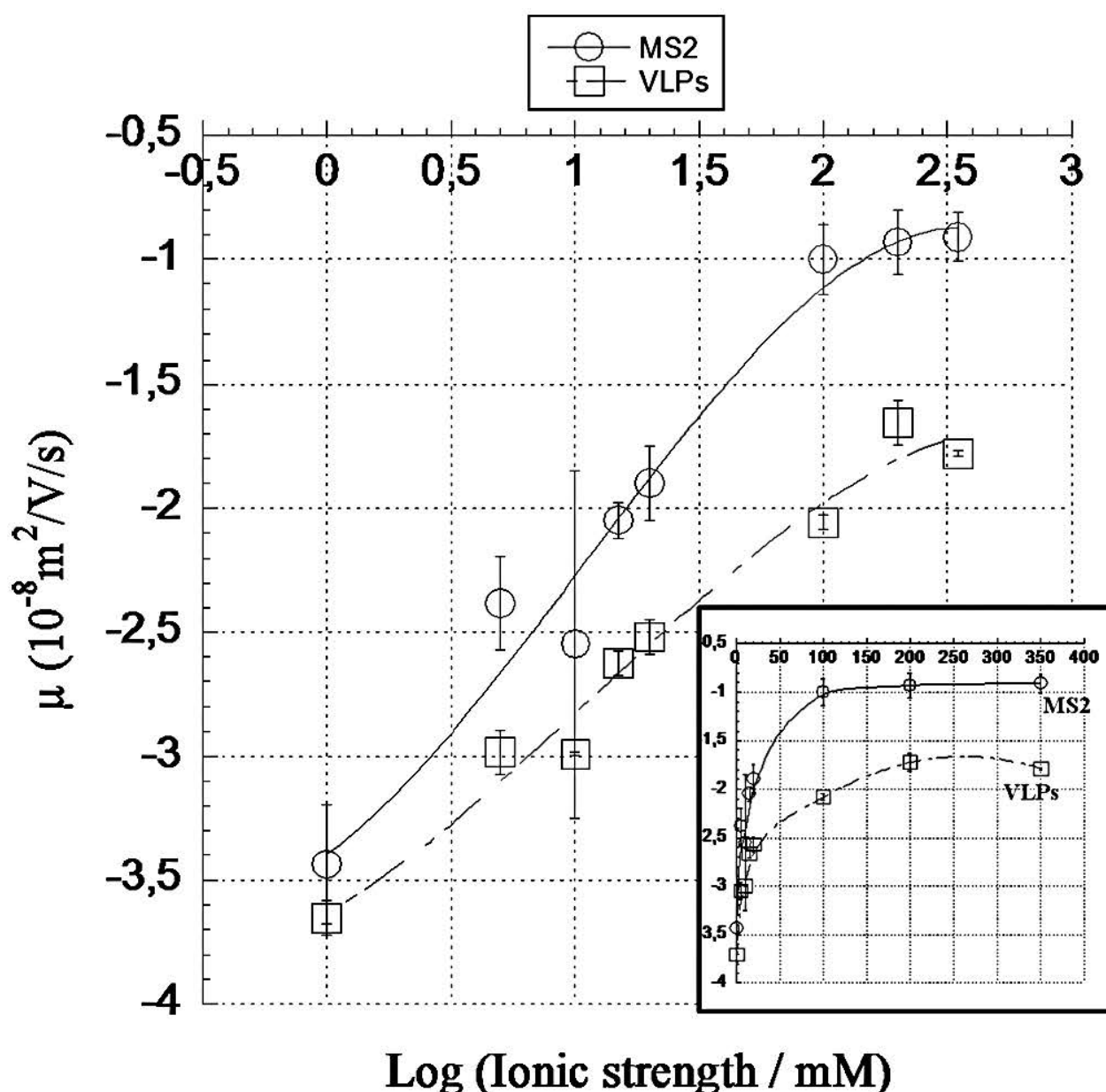


FIG. 4. Electrophoretic mobilities of MS2 bacteriophage and MS2 VLPs as a function of log of ionic strength at pH 7. The solid and dotted lines are only guides to the eye. (Inset) Electrophoretic mobilities of MS2 bacteriophage and MS2 VLPs as a function of ionic strength (linear scale) at pH 7. Error bars indicate standard deviations.

novirus leads to a complete loss of adenovirus activity, again possibly connected to virus aggregation. Finally, as proof of the importance that should be given to the preparation procedure of the viral suspension, Wright et al. (26) evidenced that adeno-associated virus vectors purified by double CsCl gradient ultracentrifugation are systematically aggregated at low ionic strengths. This clearly highlights that any comparison between electrokinetics of different viral particles is relevant provided that measurements are carried out under identical conditions (e.g., nature of electrolyte) and on isolated viral particles using similar purification protocols. These important elements were taken into consideration here for an appropriate analysis of

electrokinetics of MS2 and corresponding VLPs. Size measurements and electron microscopy revealed that, under conditions where aggregation is absent ($\text{pH} > 4$) (Fig. 2), the sizes of MS2 VLPs are similar to those of complete viruses. However, the inner part of VLPs appears less electron dense, supporting the idea that VLPs lack the inner viral RNA component.

Electrophoretic mobility. Upon sole consideration of IEP values obtained for MS2 and MS2 VLPs (3.5 to 3.9), one could conclude that surface properties of viruses are governed solely by the more external amino acid residues of the capsid (15). However, this hypothesis does not support either the evolution of the electrokinetic profile as a function of the ionic strength

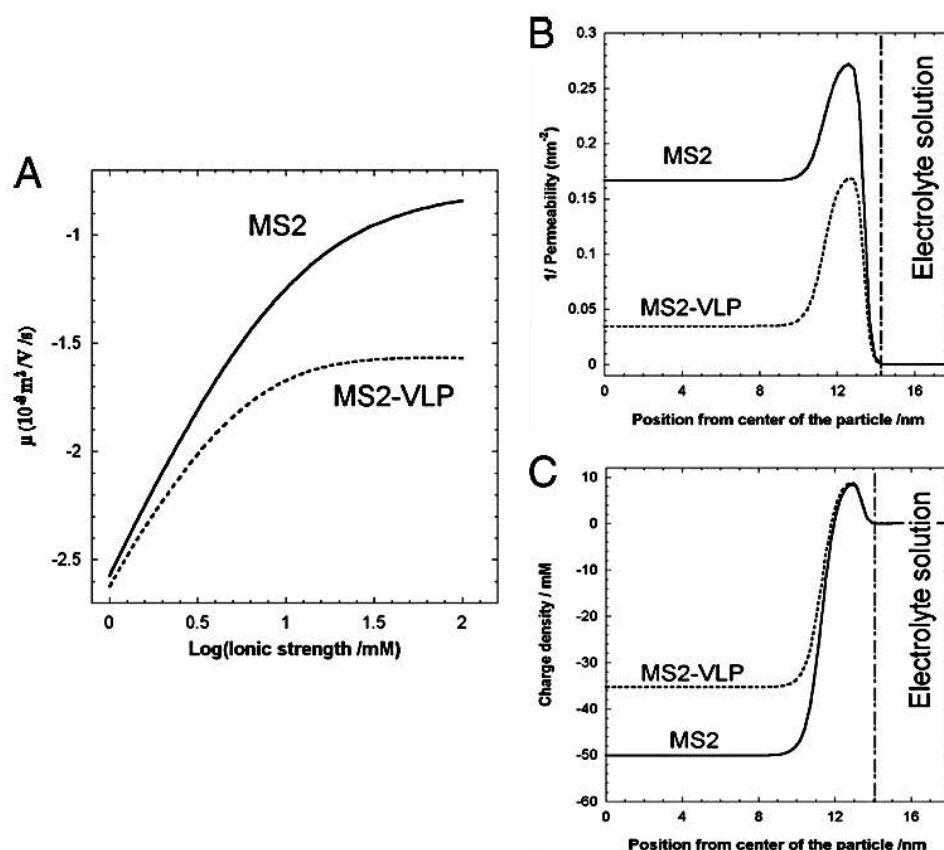


FIG. 5. (A) Qualitative reconstruction of the respective positioning of the mobility versus ionic strength curves for MS2 and MS2 VLPs. This figure illustrates the electrostatic and hydrodynamic impacts of the inner part of viral particles on the electrophoretic mobility (μ). The data were obtained using the theory detailed in reference 10 for the electrohydrodynamics of soft multilayered particles. The spatial profiles for the friction ($\sim 1/\text{permeability}$) and charge density (expressed in concentration of equivalently ionized groups) across the particles are detailed in panels B and C, respectively. As a basis for these calculations, we considered for the heterogeneity parameters (quantities α in reference 10) and for the inner RNA and capsid thicknesses the values detailed in reference 10 for MS2 phage.

(presence of a plateau in mobility, typical of a significant particle permeability) (4, 10) or the aggregation profiles of the virus, which also clearly reflect the behavior of a soft multilayered particle, as detailed below. In line with the theory and experiments reported by Langlet et al. (10), the IEP value of ~ 3.5 for MS2 is typical for the high permeability of this virus to electroosmotic flow. The pH values defining zero charge density for the inner RNA part of the virus and the capsid shell are about 2.9 and 9, respectively. If MS2 phage were sensu stricto impermeable to external flow, then electrokinetics would reflect the dissociation properties solely of the amino acids within the capsid, with a resulting IEP of about 9. This hypothesis is, however, not correct, in view of the IEP of ~ 3.5 obtained for MS2. For hard (impermeable) particles, electroosmotic flow field lines follow the contour of the particle, while for soft particles, like viruses, which exhibit a certain degree of permeability, those flow field lines penetrate within the particle. The IEP of 3.5 indicates that electrokinetics is able to probe charge properties (i.e., nature, distribution, and dissociation) of the inner RNA component of the MS2 phage, in line with the marked mobility plateau reached at large ionic strengths. In theory, the pH values that neutralize the density of charges carried by the inner RNA and outer capsid are 2.9

and 9, respectively (10). Then, the proteic capsid of MS2 carries at a pH of 7 a positive net charge, while the inner RNA is negatively charged under such a pH condition. With the assumption that VLPs are entirely devoid of any RNA constituent, the mobility for these particles would be positive over the range of ionic strengths examined in this study. Our results obviously indicate that this scenario is not possible and thereby support the presence of some internal negatively charged component at pH 7 for the MS2 VLPs, possibly associated with the presence of host-derived RNAs but also with proteins or other materials from host bacteria where VLPs are assembled. This internal component is significantly probed by the flow in electrophoresis experiments, which explains the low IEP value observed for the VLPs and the presence of a plateau in mobility at large ionic strengths. A question then arises about the nature of the inner material of MS2 VLPs. By nature, this cannot be viral RNA. However, bacterial components, including bacterial RNA, could fill, at least partially, the “empty” inner space of the VLPs, as demonstrated by Pickett and Peabody (16).

Because from the literature much information is known about the structure of MS2 and about the nature, quantity, and radial distribution of the charges it carries, theoretical compu-

tation of MS2 mobility as a function of pH can be performed using an advanced electrohydrodynamic model for isolated (i.e., not aggregated) multilayered particles, as detailed in reference 10. The nonlinear Poisson Boltzmann and Brinkman equations considered in the formalism detailed previously (10) allow for the computation of the spatial distributions of electrostatic and hydrodynamic fields all across the virus, as well as the distribution profiles of ions from the center of the virus to the bulk electrolyte solution. The effect of the externally applied electric field (electrophoresis) on the distributions of these key physical quantities is explicitly taken into account. Evaluation of particle electrophoretic mobility is then possible from the asymptotic behavior of the electroosmotic flow field at infinite distances from the virus. In particular, Langlet et al. (10) demonstrated that electrophoretic mobility data for MS2 could be very well reproduced by this theory in the pH range where aggregation is absent ($\text{pH} > 4$) but that important discrepancies appeared at lower pH ($\text{pH} < 4$). The modeling largely overestimates the magnitude of the mobility in the pH range where there is aggregation. It further highlights that an "S-type" dependence on pH is expected for the mobility (μ) of isolated viruses, with a clearly defined change in sign of mobility at low pH, similarly to that observed in the case of VLPs.

Quantitative evaluation of the electrokinetic response of VLPs using detailed data describing VLP chemical composition is currently impossible due to the lack of knowledge on the inner-material quantity, nature, and charge repartition for this type of particle. Despite this limitation, the comparison between the theoretical and experimental dependencies of μ on pH as obtained for MS2 (10) qualitatively corroborates that the behavior of μ at low pH for VLPs is in agreement with that typically expected for isolated viral particles containing a negatively charged inner component surrounded by a proteinaceous shell. The absence of aggregation for VLPs at low pH is further independently confirmed here by size measurements.

Let us now comment on the respective densities of the inner negatively charged components carried by MS2 VLPs and MS2 phage and discuss how any underlying differences could be reflected in the profiles of mobility versus salt concentration. In their analysis of electrokinetics of soft multilayered particles, Langlet et al. (10) evaluated the effect of internal charge density of MS2 phage on the concentration dependence of mobility, while maintaining constant the charge density within the most external layer of the particle and the typical flow penetration. For particles with a significant flow penetration compared to the thickness of the external layer (in the case of MS2 phage [10]), results show that increasing the magnitude of the inner charge density of the particle results in a stronger increase (in magnitude) of the mobility with decreasing electrolyte concentrations from 100 mM to 1 mM. In other words, the slope of the curve μ versus logarithm of the salt concentration is most important for permeable multilayered particles characterized by a high density of charges in their inner part. This trend agrees with data shown in Fig. 4 where the dependence on ionic strength for the mobility (μ) of MS2 VLPs lacking inner RNA is less pronounced than that observed for MS2 phage. The results shown in Fig. 4 further demonstrate that the μ values measured for MS2 and VLPs in the plateau regime significantly differ. A possible reason for such a difference is the effect of the inner material of the particle on the overall

permeability properties. Since the internal part of VLPs is not as dense as that for MS2 phage, the hydrodynamic resistance offered by the inner particle component is expected to be more significant in the case of MS2, thereby reducing MS2 mobility (in magnitude) compared to that of VLPs, which is in line with data shown in Fig. 4. In addition, the absence of maturase protein in VLPs may lead, together with the "empty character" of these particles, to a proteic capsid that is more porous and less structured (or less compact) than that of MS2, where maturase protein and/or internal RNA contributes to conferring a certain integrity or compactness to the capsid. As a result, flow penetration within VLPs would be greater than that within complete MS2 phage.

The previously discussed electrostatic and hydrodynamic impacts of internal-material content on the electrophoretic mobility of MS2 and MS2 VLPs are illustrated in Fig. 5. The figure shows electrokinetic profiles computed from the theory of Langlet et al. (10) for a particle with distinct internal and external components, with variations in the internal charge density and/or the overall particle permeability. The thickness of the constituting layers as well as the sign of the inner and outer charge densities is chosen to approach the case of complete MS2 phage under the condition of a pH of 7. From the data shown in Fig. 5, we conclude that a concomitant decrease in the inner particle charge density and increase in particle permeability qualitatively reproduce the respective positioning of the mobility versus salt concentration profiles measured for MS2 VLPs and complete MS2 phage. We emphasize that it is not possible to quantify the difference between the density of internal host material for VLPs and that of RNA for MS2 because so far there are no detailed data on the conformation of the VLP coat protein and the chemical composition of the inner host material of VLPs.

Aggregation. The data shown in Fig. 2 underline that the stability properties of VLP suspensions against aggregation not only differ from those obtained for MS2 suspensions but also do not follow the classical picture expected from conventional DLVO theory for colloidal stability. According to the latter, it is predicted that upon increase of ionic strength, the compression of the electric double layer developed around the interacting particles leads to a significant decrease and/or suppression of the repulsive electrostatic forces between neighboring particles, thereby favoring their aggregation. Additionally, it is expected from this theory that attractive interactions (e.g., Van der Waals) are systematically dominant for particles carrying a zero net charge, thus leading to instability. In case of MS2 VLPs, however, we observe that aggregates are formed at a pH about equal to the IEP for sufficiently low ionic strength (below 10 mM) and that particles remain in isolated form at 100 mM salt concentration irrespective of the pH value. To explain the high stability of VLPs in 100 mM NaNO_3 over the pH range from 2.5 to 7 compared to that of MS2, we may argue that the presence/absence of maturase in MS2/VLPs, respectively, modifies the steric contribution of the overall interaction between the particles, thus leading to different stability properties, as hypothesized by da Silva et al. (2) in their analysis of norovirus GI and GII VLP stability. However, recalling that steric repulsions are of shorter range than electrostatic interactions (especially at low ionic strengths), one should also measure a remarkable stability of the VLPs at low ionic strengths in the pH range from 2.5 to 7, where large-range repulsive inter-

actions exist in addition to the aforementioned steric contribution. This is not observed for VLPs that are destabilized for some critical pH value near the IEP. Invoking steric interactions cannot be sufficient to explain the variation in stability of VLPs with varying ionic strengths and pH values. In the analysis by da Silva et al. (2) on the adsorption/aggregation properties of norovirus GI and GII VLPs, the extreme stability of those particles at high ionic strength, similar to that obtained here for MS2 VLPs, “may be unique to VLPs, where the lack of RNA could change particle stability.” This hypothesis by da Silva et al. (2) is exactly the one we support as described below from interpretation of MS2 and VLP size measurements.

To qualitatively understand the peculiar and *a priori* “abnormal” stability behavior of VLPs at 100 mM, we reason in terms of the theory recently developed by Duval et al. (5) for predicting the magnitude of electrostatic interactions between particles that consist of concentric layers carrying functional groups with different dissociation properties. Duval et al. (5) demonstrated that the sign and magnitude of the electrostatic interactions between multilayered particles are basically determined by the charge properties of the layers located within a depth of the order of the Debye length κ^{-1} . This distance reflects the typical distance for electrostatic interactions between particles or equivalently the characteristic extension of the electric double layer around/within the particle (see, for instance, references 4 and 5 for expression of κ^{-1} versus salt concentration). For viruses which consist of an inner RNA component of radius δ_1 of ~ 11.3 nm and an outer capsid shell of thickness δ_2 of ~ 2.1 nm (10), the contribution of the internal RNA component in determining the repulsive electrostatic interactions between neighboring viruses is therefore governed by the dimensionless number $\kappa\delta_2$. The electrostatic interactions between VLPs should then be strictly governed by the nature and the dissociation properties of the functional groups located within the capsid shell under the condition $\kappa\delta_2 \gg 1$, which is met at sufficiently high salt concentration. Under the other limiting condition, where $\kappa\delta_2 \ll 1$, electrostatic interactions are determined mainly by the details of nature/distribution of charges within the internal particle component. For intermediate conditions, the electrostatic interactions depend on the charge properties of both the capsid and the inner part of the virus. For 100 mM, 10 mM, and 1 mM salt concentration conditions, we find $\kappa\delta_2$ values of ~ 2.2 , 0.7, and 0.2, respectively. Accordingly, at 100 mM, the capsid thickness is significantly above the typical Debye length κ^{-1} , and it is then the capsid region of the VLPs that significantly determines their electrostatic interactions. As a result, we expect that repulsive interactions between VLPs systematically take place for a pH of < 9 , i.e., the pH range where the capsid shell is positively charged.

In the pH range of 2.5 to 7 investigated in this study, the net charge carried by the capsid never reaches a zero value, so that the electrostatic interactions between VLPs cannot be rigorously cancelled in this pH range. From stability data at 100 mM (Fig. 2), we infer that the finite magnitude of the repulsive electrostatic forces between VLPs in the pH range of 2.5 to 7 is always sufficient to counterbalance the short-range attractive forces and thus prevent aggregation in this pH range. With lowering electrolyte concentration, $\kappa\delta_2$ significantly decreases, and therefore the contribution of the inner material of VLPs in governing the overall electrostatic interactions gradually becomes predominant. The pH value marking the zero condition for internal charge of VLPs

is necessarily much lower than that for the capsid, as argued from the IEP measured for VLPs. Denoting as pH_c this critical pH value, one expects from the theory of Duval et al. (5) that for a $\kappa\delta_2$ value of $\ll 1$ and pH values below and above pH_c , where the inner material is positively and negatively charged, respectively, VLPs experience significant repulsive electrostatic interactions, thereby favoring stability of VLP suspensions against aggregation. These arguments qualitatively support the data of Fig. 2, which show that VLPs in 1 mM and 10 mM salt concentration are in isolated form for pH above and below a critical pH whose value is in the range from 3 to 4. This discussion, though qualitative, has the merit to provide a comprehensive explanation for the *a priori* anomalous stability properties of VLPs with varying pH values and salt concentrations. The recent theory on electrostatic interactions between multilayered particles (5) provides the physical basis for understanding these properties. At the current stage of our comprehension of the composition, spatial distribution, and dissociation of the charges located in the internal and capsid parts of VLPs, a complete quantitative theoretical evaluation of the stability diagrams for VLPs is unfortunately not possible.

The stability properties of MS2 phage are similar to those for VLPs at high pH, but important discrepancies arise at low pH ($\text{pH} < \text{IEP}$). In line with data given by Langlet et al. (10), the aggregation profiles obtained for MS2 phage are furthermore completely independent of the electrolyte concentration. This strongly suggests that interactions other than electrostatic interactions predominantly govern the stability properties of MS2, particularly at a pH that is lower than the IEP. By comparing the stability profiles of MS2 and VLPs for pH values lower than 4, we hypothesize that the presence of genome material within MS2 phage considerably increases its hydrophobic character. In other words, the presence of the viral genome could be, by its very interaction with the capsomers, responsible for particular conformations of the protein on the capsid that are not met for VLPs. In turn, the contribution of the attractive interaction forces would be more important for MS2 than for VLPs and would systematically result in particle aggregation at low pH values. It is also possible that variations in conformation/composition of the proteins constituting the capsid of VLPs and MS2 phage are not rigorously identical and lead to different stability features at low pH following variations in hydrophobicity and/or Hamaker constant. This argument is supported by two facts. First, the capsid of MS2 phage consists of 180 copies of capsid proteins and a single copy of a maturation protein, whereas the capsid of VLPs lacks the maturation protein, and second, this maturation protein is known to impact significantly the three-dimensional structure of the viral capsid (8). However, reasoning on the sole basis of the outer capsid (of MS2 or VLPs) cannot be sufficient because it does not explain the presence of a mobility plateau value at large ionic strengths. In addition, because MS2 contains only one copy of the maturase protein, compared to 180 copies of the major capsid protein, the absence of this single maturase in the VLP capsid is not likely to lead to significant electrostatic changes and thus differences in electrokinetic and stability properties between the two types of particles. Despite this uncertainty in the origin of stability differences between MS2 and VLPs at low pH, all results reported in this work clearly show some limitations in the use of VLPs as model systems for predicting virus behavior.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by program grant ANR-07-PNRA-008 (ADHERESIST) from the ANR (Agence Nationale de la Recherche).

D. S. Peabody (University of New Mexico) is acknowledged for providing the pETCT plasmid for the MS2 VLP synthesis.

REFERENCES

- Association Francaise de Normalisation. 2001. NF EN ISO 10705-1. Water quality. Detection and enumeration of F-specific RNA bacteriophages. Association Française de Normalisation, La Plaine Saint-Denis, France.
- Ausar, S. F., T. R. Foubert, M. H. Hudson, T. S. Vedvick, and C. R. Middaugh. 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *J. Biol. Chem.* **281**:19478–19488.
- da Silva, A. K., O. V. Kavanagh, M. K. Estes, and M. Elimelech. 2011. Adsorption and aggregation properties of norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environ. Sci. Technol.* **45**:520–526.
- Duval, J. F. L., and F. Gaboriaud. 2010. Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **15**:184–195.
- Duval, J. F. L., and H. Ohshima. 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* **22**:3533–3546.
- Duval, J. F. L., J. Merlin, and P. A. L. Narayana. 2011. Electrostatic interactions between diffuse soft multi-layered (bio)particles: beyond Debye-Huckel approximation and Deryagin formulation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**:1037–1053.
- Hosokawa, M., et al. 2002. Preparation of purified, sterilized, and stable adenovirus vectors using albumin. *J. Virol. Methods* **103**:191–199.
- Jiang, X., M. Wang, D. Y. Graham, and M. K. Estes. 1992. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.* **66**:6527–6532.
- Kuzmanovic, D. A., I. Elashvili, C. Wick, C. O'Connell, and S. Krueger. 2006. The MS2 coat protein shell is likely assembled under tension: a novel role for the MS2 bacteriophage A protein as revealed by small-angle neutron scattering. *J. Mol. Biol.* **355**:1095–1111.
- Langlet, J., F. Gaboriaud, J. F. L. Duval, and C. Gantzer. 2008. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes. *Water Res.* **42**:2769–2777.
- Langlet, J., F. Gaboriaud, C. Gantzer, and J. F. L. Duval. 2008. Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophys. J.* **94**:3293–3312.
- Langlet, J., et al. 2009. Efficiency of MS2 phage and Qbeta phage removal by membrane filtration in water treatment: applicability of real-time RT-PCR method. *J. Membr. Sci.* **326**:111–116.
- Lima, S. M., et al. 2006. Dissecting the role of protein-protein and protein-nucleic acid interactions in MS2 bacteriophage stability. *FEBS J.* **273**:1463–1475.
- Loisy, F., R. L. Atmar, J. Cohen, A. Bosch, and F. Le Guyader. 2004. Rotavirus VLP2/6: a new tool to track rotavirus in the marine environment. *Res. Microbiol.* **155**:575–578.
- Penrod, S. L., T. M. Olson, and S. B. Grant. 1995. Whole particle microelectrophoresis for small viruses. *J. Colloid Interface Sci.* **173**:521–523.
- Penrod, S. L., T. M. Olson, and S. B. Grant. 1996. Deposition kinetics of two viruses in packed beds of quartz granular media. *Langmuir* **12**:5576–5587.
- Pickett, G. G., and D. S. Peabody. 1993. Encapsulation of heterologous RNAs by bacteriophage MS2 coat protein. *Nucleic Acids Res.* **21**:4621–4626.
- Redman, J. A., S. B. Grant, T. M. Olson, M. E. Hardy, and M. K. Estes. 1997. Filtration of recombinant Norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions. *Environ. Sci. Technol.* **31**:3378–3383.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, vol. 1, p. 1.24–1.29. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schaldach, C. M., W. L. Bourcier, H. F. Shaw, B. E. Viani, and W. D. Wilson. 2006. The influence of ionic strength on the interaction of viruses with charged surfaces under environmental conditions. *J. Colloid Interface Sci.* **294**:1–10.
- Schijven, J. F., and M. Hassanizadeh. 2000. Removal of viruses by soil passage: overview of modeling, processes, and parameters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **30**:49–127.
- Shirasaki, N., T. Matsushita, Y. Matsui, A. Oshiba, and K. Ohno. 2010. Estimation of norovirus removal performance in a coagulation-rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs. *Water Res.* **44**:1307–1316.
- Valegård, K., L. Liljas, K. Fridborg, and T. Unge. 1990. The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2. *Nature* **345**:36–41.
- Valegård, K., L. Liljas, K. Fridborg, and T. Unge. 1991. Structure determination of the bacteriophage MS2. *Acta Crystallogr. B Struct. Sci.* **47**:949–960.
- Valegård, K., K. Fridborg, and L. Liljas. 1994. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage Qbeta. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**:105–109.
- van Voorthuizen, E. M., N. J. Ashbolt, and A. I. Schafer. 2001. Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *J. Membr. Sci.* **194**:69–79.
- Wright, J. F., et al. 2005. Identification of factors that contribute to recombinant AAV2 particle and methods to prevent its occurrence during vector purification and formulation. *Mol. Ther.* **12**:171–178.
- Zerda, K. S., C. P. Gerba, K. C. Hou, and S. M. Goyal. 1985. Adsorption of viruses to charge-modified silica. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:91–95.
- Zolotukhin, S., et al. 1999. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther.* **6**:973–985.

II. Impact du protocole de purification virale sur l'agrégation et l'électrocinétique du bactériophage MS2 et des VLPs correspondantes

L'impact de l'ARN sur les propriétés interfaciales de MS2 a été démontré de manière théorique par Langlet et *al.* (2008a) et de manière expérimentale par la comparaison entre les virus complets et les VLPs de MS2 (Dika et *al.*, 2011). Les conclusions obtenues suite à cette comparaison ont été contredites par Nguyen et *al.* (2011) traduisant des propriétés interfaciales similaires entre ces deux particules virales en termes d'agrégation et d'électrocinétique également. Après comparaison de cette étude et de nos précédents résultats, il s'est avéré que la différence majeure se situe au niveau de la purification des particules virales avant l'étude de leurs propriétés physico-chimiques. Afin d'étudier l'impact de la méthode de purification virale sur les propriétés interfaciales du bactériophage MS2, nous avons effectué une comparaison des profils d'agrégation et des profils électrocinétiques de MS2 et des VLPs correspondantes selon trois méthodes distinctes de purification. La première, consiste en une dialyse des particules (Langlet et *al.*, 2008a, Dika et *al.*, 2011). La seconde selon Nguyen et *al.* (2011), consiste en une précipitation au polyéthylène glycol (PEG) et enfin, nous avons choisi comme troisième méthode comparative, une méthode classiquement utilisée pour la purification virale, le gradient de chlorure de césium (Penrod et *al.*, 1996; Redman et *al.*, 1997; Tollefson et *al.*, 2007).

Les résultats montrent que les propriétés de stabilité et les propriétés électrohydrodynamiques des deux types de particules virales diffèrent en fonction du protocole de purification étudié. En termes d'agrégation selon la méthode de dialyse, MS2 agrège à son point isoélectrique jusqu'aux pH les plus acides. Par la purification au PEG, le phage agrège pour des $\text{pH} \leq 6$ et aucune agrégation n'est observée après le gradient de chlorure de césium (CsCl). Cependant, dans ce dernier cas, pour des $\text{pH} \leq 4$, les particules ont un diamètre d'environ 40 nm après ce protocole traduisant un certain « gonflement » pouvant être du à la présence des ions césium dans le milieu. Les VLPs quant à elles agrègent aux alentours du *pI* lorsqu'elles sont purifiées par dialyse ou par précipitation au PEG. De la même manière que le phage MS2, aucune agrégation n'est observée après le gradient de chlorure de césium. La purification au chlorure de césium est la méthode la plus sélective pour les particules virales étant donné qu'elles sont sélectionnées selon leur densité et que toutes les particules ayant des densités différentes sont éliminées. L'absence d'agrégation lors de ce protocole pourrait donc s'expliquer soit par une moindre présence de protéines contaminantes (sélection plus précise des particules virales par

rapport aux deux autres méthodes de purification dans lesquelles peuvent persister certaines protéines pouvant participer à l'agrégation et éliminées lors du gradient) dans le milieu après une telle sélection, soit par une légère modification de la conformation des virus empêchant leur agrégation ne serait-ce qu'à leur point isoélectrique.

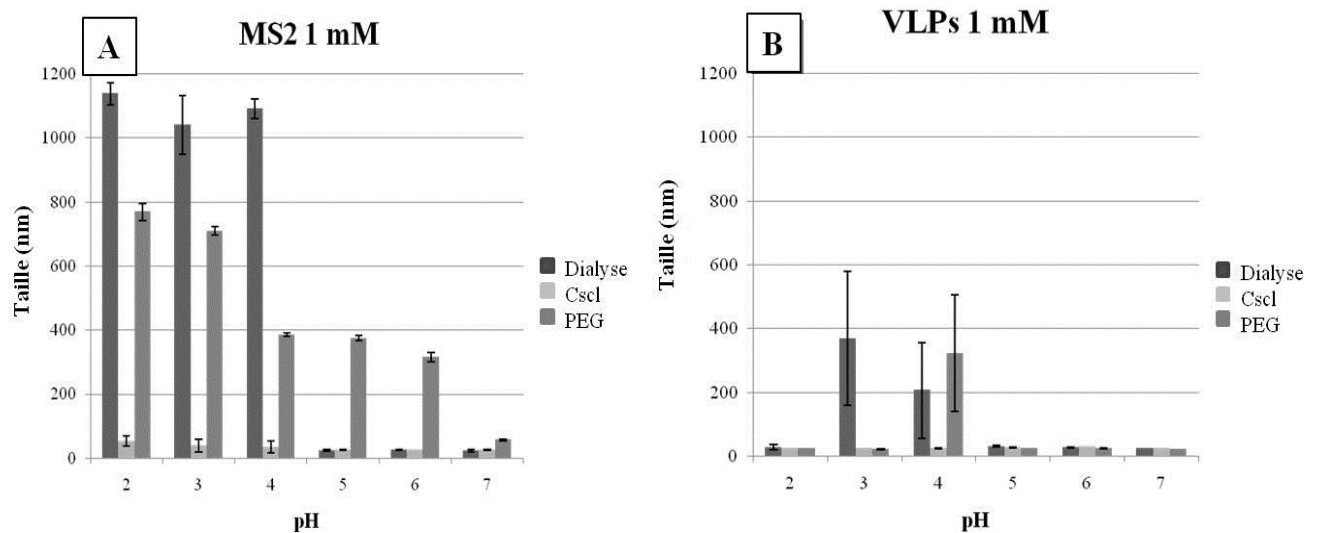


Figure 19. Diamètre des phages MS2 (A) et des VLPs-MS2 (B) en fonction du pH à 1 mM de NaNO_3 en fonction des trois méthodes de purification.

Les mesures de mobilité électrophorétiques ont été effectuées à pH 7 pour avoir toutes les particules sous forme isolée. Les résultats obtenus pour le phage MS2 sont similaires pour les méthodes de dialyse et de gradient de chlorure mais diffèrent totalement avec l'électrocinétique après la précipitation au PEG. La différence observée entre les virus complets et les VLPs par la méthode de dialyse est encore plus accentuée lorsque les particules sont purifiées par gradient de chlorure de césium allant dans le sens d'une meilleure sélection. Tout comme Nguyen et *al.* (2011), nous observons des profils électrocinétiques similaires entre les types de particules après la précipitation au PEG. Une des hypothèses de cette observation, pourrait être que le PEG, molécule neutre formerait une couche autour des particules rapprochant ainsi leurs charges électrostatiques.

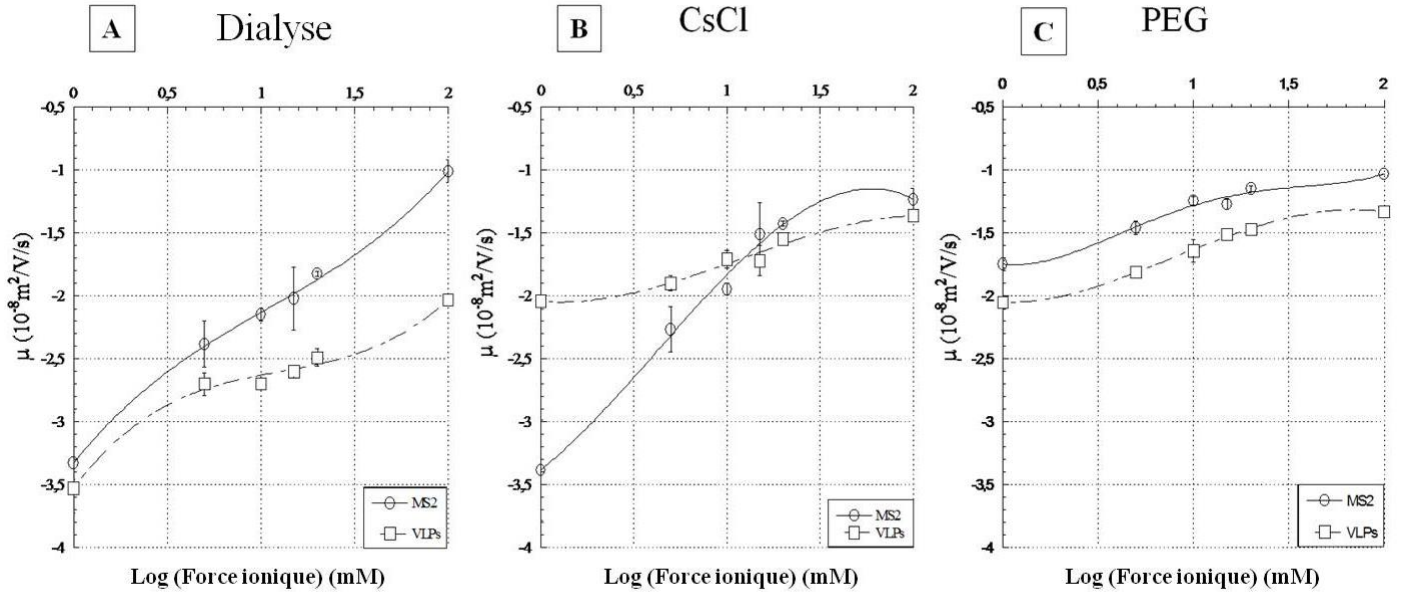


Figure 20. Mobilités électrophorétiques de MS2 et des VLPs-MS2 en fonction du logarithme de la force ionique à un pH 7. Les résultats sont présentés en fonction de la méthode de purification: la dialyse (A), l'ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (B) et la précipitation au polyéthylène glycol (PEG) (C).

En somme, des différences électrocinétiques sont observées entre MS2 et VLPs, lorsque ces particules sont purifiées par dialyse ou par gradient de chlorure de césium et aucune différence n'est observée lors de la purification au PEG. Concernant les profils d'agrégation, les trois protocoles de purification engendrent différents comportement pour les deux types de particules. La méthode par gradient de densité semble être la plus sélective pour les phages et engendre la différence la plus grande entre les virus et les VLPs. Ces résultats mettent en évidence l'importance de la méthode de purification pour l'étude des propriétés interfaciales des bactériophages.

Impact of the virus purification protocol on aggregation and electrokinetics of MS2 phages and corresponding virus-like particles†

Cite this: DOI: 10.1039/c3cp44128h

C. Dika,^{ab} C. Gantzer,^{*ab} A. Perrin^{ab} and J. F. L. Duval^{*cd}

Previous experimental and theoretical studies have established that electrokinetic and aggregation properties of soft MS2 phages are not only governed by the physico-chemical features of their proteinaceous outer surface but are also significantly impacted by those of their inner RNA component (Dika *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, **14**, 4939–4948). These conclusions contradict the recent findings of Nguyen *et al. (Soft Matter*, 2011, **7**, 10449–10456) who reported identical electrokinetic and aggregation characteristics for MS2 and corresponding virus like particles (VLPs) that lack the internal RNA component. We demonstrate here that this contradiction originates from the different purification methods adopted prior to measurements. More generally, we show that stability and electrohydrodynamics of viruses differ according to purification by (i) dialysis, (ii) isopycnic centrifugation in the cesium chloride gradient, and (iii) precipitation using polyethylene glycol (PEG). Methods (i) and (iii) lead to aggregation of MS2 phages at $\text{pH} \leq 4$ and $\text{pH} \leq 6$ in 1–100 mM NaNO_3 solutions, respectively, while under such conditions aggregation is not observed for MS2 and VLP suspensions prepared according to (ii). In addition, VLPs prepared following methods (i) and (iii) aggregate only at the isoelectric point ($\text{pH} \sim 3\text{--}4$) in 1 mM NaNO_3 solution. Electrophoretic mobility data of stable MS2 and VLP particles were further examined using a recent formalism for electrokinetics of soft multilayered colloids. The analysis qualitatively shows how the purification protocol may affect either the outer particle surface properties and/or the inner particle content. Finally, the non-DLVO aggregation behavior of MS2 and VLPs purified via the above protocols is discussed in terms of the possible change in corresponding interparticle interactions.

Received 20th November 2012,
Accepted 19th February 2013

DOI: 10.1039/c3cp44128h

www.rsc.org/pccp

1. Introduction

As a result of faecal pollution, human pathogenic enteric viruses disseminate in natural aquatic media. Their spreading depends on their surface properties which significantly govern virus's ability to adhere to food¹ or their capacity to cross water treatments (membrane filtration, sand filtration, coagulation²). For the sake of illustration, viral aggregates are more resistant than their isolated forms, as demonstrated for MS2 phages.³

Such viruses may then infect new hosts and lead to severe hepatitis or gastroenteritis epidemics.⁴ Their capacity to infect humans is strongly related to their ability to maintain their infectivity and it is further impacted by their physico-chemical surface properties,^{5,6} e.g. the magnitude of the density of charges they carry and their hydrophobic/hydrophilic character.

Because of their size (20 nm to 30 nm in diameter) and structure, F-specific RNA bacteriophages of the type MS2 are commonly considered as relevant non-pathogenic surrogates to investigate the fate and behavior of pathogenic viruses in aquatic media.^{2,6,7} In detail, the MS2 phage consists of an inner RNA genome encapsulated by a 2–3 nm thick porous outer protein capsid.⁸ Numerous studies have now established that the zeta potential of viruses, as evaluated from electrophoretic mobility data,^{9–11} is physically inappropriate to derive quantitative information on virus surface charge.¹² Instead, viruses are paradigms of soft multilayered particles (*i.e.* permeable to ions and water) whose electrokinetic properties depend on the distributions from the center of the virus to its outer periphery of both the volume charge density and the density of soft material.¹² In turn, the electrophoretic

^a Université de Lorraine, LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement), UMR 7564, Nancy, F-54001, France.
E-mail: christophe.gantzer@univ-lorraine.fr; Fax: +33 3 83 68 23 78;
Tel: +33 3 83 68 22 91

^b CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy, F-54001, France

^c Université de Lorraine, IIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR 7360, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54501, France.
E-mail: jerome.duval@univ-lorraine.fr; Fax: +33 3 83 59 62 55;
Tel: +33 3 83 59 62 63

^d CNRS, IIEC, UMR 7360, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54501, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3cp44128h

mobility of viruses generally depends on the charge and friction properties of the viral surface capsid and those of the genome located within the virus. As detailed by Langlet *et al.*¹³ in their modeling of electrohydrodynamics of soft multilayered particles, the electrophoretic mobility of viruses is a complex ionic-strength dependent signature of the respective physico-chemical properties (thickness, charge, permeability) of both the internal RNA and outer proteic components. The fundamentals of this theory were supported by electrokinetic data (including the isoelectric point) for MS2 phages and for their corresponding Virus Like Particles (VLPs).^{13,14} The latter particles are supposedly devoid of any internal viral RNA structure (and are thus non-pathogenic to humans and bacteria) but do exhibit internal charges likely stemming from the presence of host RNAs, proteins or other materials produced from the host bacteria where VLPs synthesis was performed.¹⁴ It is emphasized that experimental and theoretical work has now underlined the strong analogy that exists between the physical basis for electrokinetics of soft multilayered particles and that for streaming potential/streaming current of soft macroscopic polyelectrolyte multilayers.¹⁵

The peculiar composition of virus particles also significantly governs their stability against aggregation. Using a theory developed for deriving electrostatic interactions between multilayered particles, Duval and coworkers¹⁵ showed that the internal part of chemically stratified particles like viruses governs – to an extent that depends on solution ionic strength – the electrostatic interaction energy barrier in the stability diagram. At sufficiently low ionic strength where Debye length sufficiently exceeds the thickness of the outer layer of the interacting particles, the electrostatic contribution to the overall particle interaction energy is even solely mediated by the charge density of the inner particle structure while that of the outer layer becomes immaterial in defining the interparticular electrostatic potential distribution. In line with these conclusions, the impact of RNA genome on virus aggregation features was reported and extensively discussed by Dika *et al.* via a systematic analysis of MS2 and VLP size over a large range of solution ionic strength and pH values.¹⁴

In a recent study, Nguyen *et al.*¹⁶ reported electrophoretic mobility measurements of MS2 phages and VLPs as a function of pH and electrolyte concentration together with particle size collected as a function of time. Based on the similar electrokinetic and aggregation features obtained for both types of particles, the authors concluded that RNA has no apparent effect on the physico-chemical properties of the virus as a whole and thus it ‘weakly influences the interactions of the bacteriophage MS2 at key environmental interfaces’. Obviously, these results contradict the experimental and theoretical findings by Langlet *et al.*,¹³ Dika *et al.*¹⁴ and Duval *et al.*¹⁵

The main objective of this work is to solve the apparent controversy outlined above on the role of the RNA genome in electrokinetics and aggregation of MS2 phages. This issue is of utmost importance for the environmental virologist community because of the use of VLPs as surrogates of pathogens.^{5,17} For that purpose, we systematically explore here the influence of the MS2 and corresponding MS2-VLPs purification protocols by dialysis and by polyethylene glycol (PEG)-mediated precipitation, as adopted by

Dika *et al.*¹⁴ and Nguyen *et al.*,¹⁶ respectively. The former method consists of eliminating the impurities (*e.g.* proteins, salts) remaining in virus culture media *via* blocking their diffusion through a semi-permeable membrane, the molecular weight of which is adjusted to collect selectively the desired particles. The latter method takes advantage of the well-known differential precipitation capacity of the non-toxic and ‘inert’ PEG reagent for purifying proteins from a variety of sources.¹⁸ We further investigate the impact of the widely used ultracentrifugation protocol based on the selection of viruses and VLPs according to their density in a density gradient imposed by cesium chloride solution.

It is shown that the aforementioned three particle preparation methods lead to distinct electrokinetic and aggregation properties of MS2 and VLP particles, hence the controversy outlined above stems from the very type of protocol adopted for preparing MS2 and VLP suspensions. With use of previously reported theoretical models for the electrohydrodynamics and stability of multilayered particles,^{13,15} we further propose – on a qualitative basis – scenarios that describe the very impact of the purification protocol on the inner and/or outer chemical composition of virus particles in line with the corresponding ionic-strength and pH dependencies of their electrophoretic mobility and size. Overall, this work demonstrates for the first time that the purification method is a so-far overlooked key matter of concern when evaluating physico-chemical properties of virus surfaces for predicting their behavior in aquatic media.

2. Experiments

2.1. Production of MS2 phages

MS2 bacteriophages were obtained from a reference culture (ATCC 15597-B1). The phages were replicated according to the procedure ISO 10705-1 (ref. 19) using *Escherichia coli* Hfr K12 (ATCC 23631) as host cells. After replication, the suspension of phages was centrifuged (Beckman Avanti J-E, 27 000g, 60 min, 4 °C) and the supernatant filtered using a 0.22 µm filter (Millex®-GP Millipore). The viral concentration obtained following the above protocol was about 10¹¹ PFU ml⁻¹.

2.2. Synthesis of MS2-VLPs

The plasmid pETCT containing the MS2 capsid gene cloned under the control of a T7 promoter was kindly provided by Prof. Peabody (University of New Mexico), and introduced into the strain BL21 (DE3) of *Escherichia coli* using standard transformation procedures.²⁰ MS2-VLPs were produced from strain BL21(DE3) (pETCT). *E. coli* BL21(DE3) (pETCT) was cultivated in LB supplemented with 50 µg ml⁻¹ ampicillin (pETCT selection) at 37 °C. At OD₆₀₀ = 0.6, the culture was induced for the production of the capsid protein with 1 mM IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, SIGMA) for 3 hours at 37 °C. Cells were then collected by centrifugation (Beckman Avanti J-E, 6000g, 20 min, 4 °C), resuspended in a 1 mM solution of NaNO₃ at pH 8 (1/5th of the initial volume), and further treated with 0.05 mg ml⁻¹ of lysozyme for 30 min at room temperature, and finally sonicated for 3 min at 51 W. Cells debris were then eliminated by centrifugation (13 500g, 20 min, 4 °C), and the

supernatant containing VLPs was finally filtered through a 0.22 μm filter (Millex[®]-GP Millipore) before storage at 4 °C.

2.3. Purification of phages/VLPs suspension by dialysis

It is critical to eliminate as much as possible remaining proteins, salts and other compounds from the phages/VLPs suspension to minimize any interference of these impurities in the measurements of the particle surface properties. To meet this requirement, dialysis is commonly performed with use of a membrane defined by a molecular weight cutoff (MWCO) close to the molecular weight of virus.^{13,21,22} Compounds with molecular weight larger than the MWCO of the membrane do not cross the membrane pores and smaller molecules freely diffuse across the membrane toward an electrolyte solution of given concentration. This time-consuming method applies to sample volumes that do not exceed ten liters and is further relevant to relatively resistant viruses. The dialysis method was used as detailed in our previous work.¹⁴ Briefly, all suspensions of MS2 and MS2-VLP particles were purified by dialysis with a 100 kDa MWCO (Spectrum, 131420), first against de-ionized water for 14 h, and then against NaNO_3 1 mM, at $\text{pH } 7 \pm 0.3$ for 14 h. In a final stage, each suspension was filtered using a 0.22 μm filter and was stored at 4 °C prior to any measurement. The obtained MS2 concentration was about 10^{11} PFU ml^{-1} . Transmission electronic micrographs of MS2 and VLPs obtained following the above protocol may be found elsewhere.¹⁴ We observed that TEM pictures for particles obtained according to the protocols detailed below did not significantly vary from those published in ref. 14.

2.4. Purification of phages/VLPs suspension using the cesium chloride density gradient

There are various procedures for separating in a selective way viral particles *via* density gradient-based methods, *e.g.* *via* a gradient imposed by solution of cesium chloride,^{23,24} sucrose²⁵ or iodixanol.²⁶ We adopt the cesium chloride density gradient method that is most appropriate for separation of viruses.²⁷ MS2 and VLPs were pelleted separately upon centrifugation of large volumes (~ 1 liter) of stock particle suspensions (60 000g, 5 h, 4 °C, Thermo Scientific Sorvall WX, fixed rotor A-621). The obtained pellets were resuspended in cesium chloride solution of density $2 \times 1.4 \text{ g ml}^{-1}$ for MS2 phages and $2 \times 1.3 \text{ g ml}^{-1}$ for VLP particles. The density gradients were formed upon isopycnic centrifugation at 260 000g, 15 °C for 19 h (Thermo Sorvall WX, swing rotor TH-641) and particles moved within the gradient and reached the position corresponding to a density that matches their own (1.4 g ml^{-1} and 1.3 g ml^{-1} for MS2 and VLP, respectively). The band corresponding to the location of the desired particles was then gently removed from the tube with a syringe, and particles were then resuspended in a 1 mM NaNO_3 solution and finally dialyzed to get rid off the remaining cesium chloride. The viral concentration obtained following this protocol was $\sim 10^{10}$ PFU ml^{-1} .

2.5. Purification of phages/VLPs suspension *via* precipitation using polyethylene glycol

The protocol is that adopted by Nguyen *et al.*¹⁶ The suspensions containing the MS2 phages and VLPs were first filtered with a

0.1 μm membrane. PEG (6000 g mol^{-1}) at 10% final concentration and the NaCl salt (final concentration 500 mM) was added to the particle suspensions. The mixture was stored at 4 °C for 18 h. The suspensions were then centrifuged at 10 000g, 1 h, 4 °C (Beckman Avanti J-E). The so-obtained pellet containing viral particles was resuspended in 1 mM NaNO_3 . The suspensions were finally filtered using a 0.22 μm membrane and stored at 4 °C prior to measurement. The viral concentration obtained according to this protocol was about 10^{10} PFU ml^{-1} .

2.6. Size and electrokinetic measurements

Prior to size and electrophoretic mobility measurements, MS2 and MS2-VLP suspensions were filtered finally to eliminate any possible large aggregates (0.22 μm). Size and electrophoretic mobility were then measured as a function of pH (range 2.5–7) in the NaNO_3 electrolyte (concentration in the range of 1 mM to 100 mM) at 22 ± 0.1 °C using a Zetasizer Nano ZS instrument (He-Ne red laser, wavelength 633 nm, Malvern Instruments, Malvern, UK). The sensitivity of the apparatus requires working at high concentrations of particles (up to 10^9 PFU ml^{-1}). Experiments were driven by the Dispersion Technology Software (DTS) provided by Malvern Instruments. In detail, electrophoretic mobilities were measured by laser Doppler electrophoresis also known as phase analysis light scattering. The rate of change of the phase shift between the scattered light and a reference beam is correlated to the particle velocity and thus allows for evaluating the electrophoretic mobility. The size distribution of the viral suspensions under investigation was determined using Dynamic Light Scattering (DLS) incorporated into the Zetasizer instrument. As a first approximation, the diffusion coefficient was converted into particle size using Stokes–Einstein equation.

Measurement of pH- and ionic strength-effects on viral size and electrophoretic mobility was carried out using the Autotitrator MPT-2 (Malvern, UK) that enables automatic variation of pH and ionic strength upon addition of predefined volume increments of 0.1 M HCl and 0.1 M NaOH, and volume increments of 0.1 mM, 1 mM or 500 mM NaNO_3 solution (all solutions were filtered with a 0.22 μm membrane). Under given pH and salt concentration conditions, size and electrophoretic mobility were measured three to four times to address the repeatability of the results.

2.7. Statistical analysis

The normality of the electrophoretic mobility values collected for particles obtained according to a given preparation protocol was addressed on the basis of a non-parametric statistical analysis (Fischer's test). The statistical significance of the observed differences between electrophoretic mobility/size of particles as prepared following the various purification protocols of interest here was evaluated according to Student's *t* test using XLSTAT software (Addinsoft, France).

3. Results

3.1. Size measurements

The size of MS2 and VLP particles (Fig. 1 and 2, respectively) was measured as a function of pH in 1 mM and 100 mM NaNO_3 solutions for the three preparation procedures detailed above.

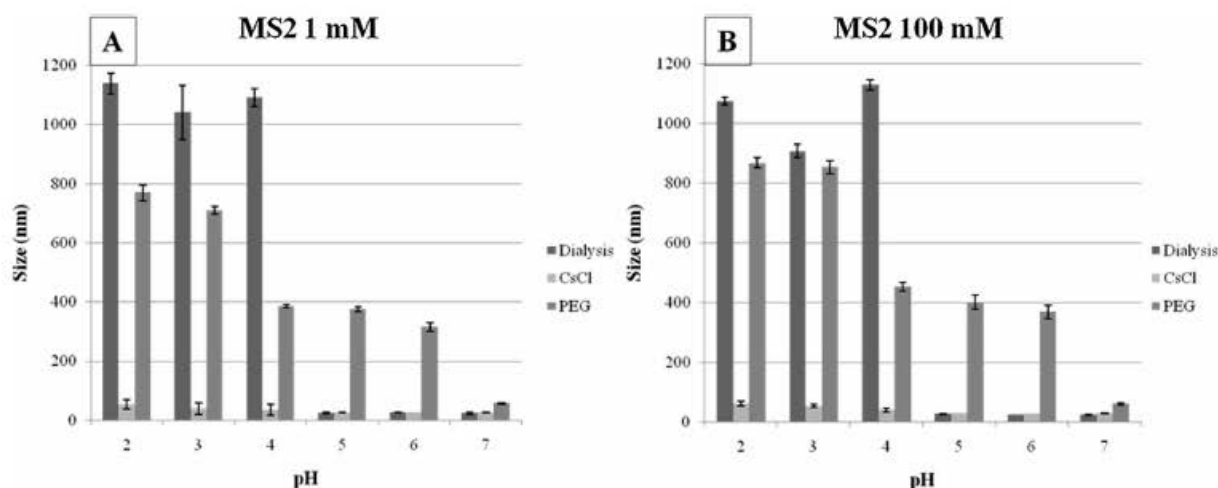


Fig. 1 Diameter of MS2 bacteriophages as a function of pH (indicated) at 1 mM (A) and 100 mM (B) NaNO_3 salt concentration measured using Zetasizer Nano ZS. Results are given for particles purified according to three purification protocols (indicated) as detailed in the text.

Results clearly show that the stability features of MS2 suspension remain unchanged when increasing electrolyte concentration regardless of the type of purification protocol considered (Fig. 1). The data obtained for MS2 phages purified by dialysis confirm those extensively discussed in a previous study.¹⁴ Briefly, MS2 phages are in a non-aggregated form for $\text{pH} > 4$, the diameter of the particles being 20–30 nm in line with the size reported for isolated MS2 particles. For lower pH values, the mean diameter of MS2 is in the range 0.9 μm to 1.1 μm over the entire range of salt concentrations examined, thereby meaning that dialyzed MS2 suspensions are systematically unstable under such pH conditions. Using the cesium chloride gradient protocol, we do not observe any aggregation of the MS2 particles under the pH and ionic strength conditions investigated here. It is however remarkable that for $\text{pH} \leq 4$, the mean size of MS2 phages is ~ 40 nm, both under 1 mM and 100 mM ionic strength conditions (Fig. 1A and B). Finally, MS2 phages prepared according to

precipitation by polyethylene glycol systematically aggregate for $\text{pH} \leq 6$ with corresponding aggregate sizes in the range 300 nm to 900 nm.

MS2-virus like particles exhibit a different behavior with respect to aggregation (Fig. 2) as compared to that of MS2 phages, except when prepared according to ultracentrifugation using the cesium chloride gradient. By adopting the latter protocol, VLP suspensions are indeed stable regardless of pH and ionic strength conditions (Fig. 2A and B). At low electrolyte concentration (1 mM NaNO_3), aggregation of VLPs prepared by dialysis is detected in the pH range 3 to 4 with a mean aggregate size of ~ 200 nm–400 nm while VLP suspensions obtained following the PEG precipitation method are unstable at pH 4 only, with a mean aggregate size of about 300 nm (Fig. 2A). Suspensions of VLPs are stable against aggregation under 100 mM ionic strength conditions over the entire range of tested pH values and for all preparation methods considered in this work (Fig. 2B).

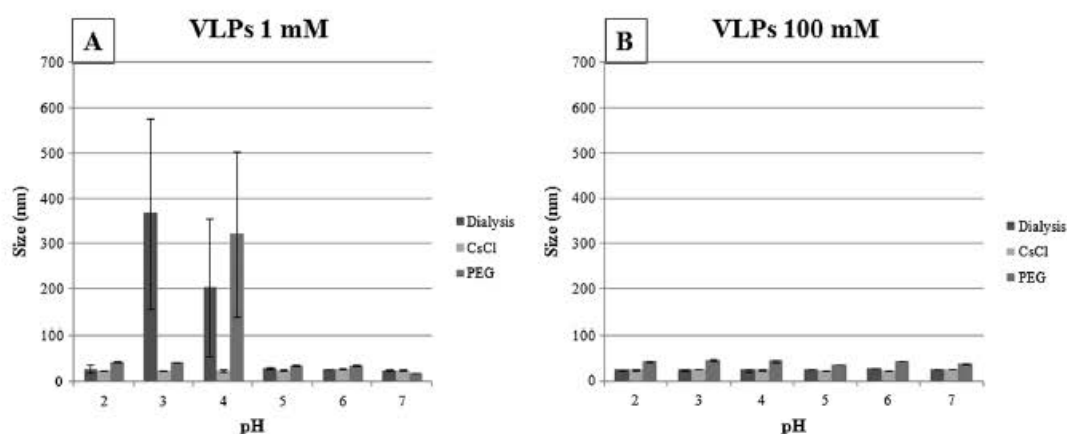


Fig. 2 Diameter of MS2-virus like particles as a function of pH (indicated) at 1 mM (A) and 100 mM (B) NaNO_3 salt concentration measured using Zetasizer Nano ZS. Results are given for particles purified according to three purification protocols (indicated) as detailed in the text.

3.2. Electrokinetics

The electrophoretic mobility (hereafter denoted μ) of MS2 and VLPs was measured as a function of electrolyte concentration in the range 1 mM to 100 mM NaNO_3 at pH 7 where MS2 and VLP suspensions are stable against aggregation (Fig. 1 and 2). Results are reported in Fig. 3 for the different purification protocols adopted in this work. As a general comment, μ is negative over the whole range of ionic strength, in agreement with the sign at pH 7 of the charges located within the viral RNA genome (isoelectric point ~ 2).¹³ In addition, μ decreases in magnitude with increasing ionic strength as a result of virus charge screening by ions present in the electrolyte medium. Finally, at sufficiently large ionic strength, μ reaches asymptotically a constant non-zero plateau value, which constitutes the signature of the soft nature (from an electrohydrodynamic point of view) of MS2 and VLP particles.¹²

Before commenting on the results, it is recalled that the slope – at sufficiently low ionic strength – of the plot μ versus the logarithm of ionic strength is physically meaningful for multilayered particles like viruses. Indeed, as extensively discussed by Langlet *et al.*,¹³ this slope reflects the ratio between the density of electric charges located within the particle (stemming from the RNA) and that of charges distributed at the outer virus periphery (proteic capsid). For given virus hydrodynamic permeability (or equivalently for given characteristic Brinkman length¹³), for a fixed virus outer space charge density and for fixed radius/thickness of the virus RNA/capsid compartments, the larger the magnitude of the charge density within the internal component of the virus, the larger the magnitude of the slope (see Fig. 3 in Langlet *et al.*¹³). Having this important element in mind, the largest difference between electrokinetic properties of MS2 and VLP is observed when particles are purified by isopycnic ultracentrifugation using the cesium chloride gradient (Fig. 3B). Mobility data for these MS2

phages decrease in magnitude by a factor of ~ 3.5 with increasing salt concentration from 1 mM to 100 mM while the mobility magnitude of VLP particles at 1 mM is only 1.6 times larger than that at 100 mM. Electrokinetic properties of MS2 and VLP particles purified by dialysis (Fig. 3A) are in agreement with those previously discussed by Dika *et al.* and extensively analyzed using electrokinetic formalism for soft multilayered particles.¹⁴ Briefly, at given electrolyte concentration, $|\mu|$ of VLPs is systematically larger than that of MS2 and the rate of decrease of $|\mu|$ with increasing salt concentration is significantly larger for MS2 as compared to that for VLPs.

The results shown in Fig. 3A and B are in line with an influence of the RNA genome on the electrohydrodynamic properties of the MS2 phage when particle preparation is done following dialysis or isopycnic ultracentrifugation. This suggests that the RNA genome impacts the electrophoretic mobility of the virus as a whole for both preparation methods. It is noted that the electrokinetic profile for VLP particles prepared by dialysis significantly differs from that of VLPs obtained by the density gradient separation method, whereas mobility versus ionic strength data for MS2 prepared according to these two methods are rather similar within experimental error (Fig. S1, ESI†).

When prepared according to the PEG precipitation method, MS2 and MS2-VLPs exhibit rather similar electrokinetic properties (Fig. 3C). Indeed, in line with the results reported by Nguyen *et al.*,¹⁶ μ of both particles varies between $\sim -2.10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at low ionic strength to $\sim -1.10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at high ionic strength (Fig. 3C). Interestingly, mobility data for VLPs do not differ much from those obtained when the CsCl density gradient method is adopted (see Fig. S1 in ESI†). Nevertheless, the here-reported similarity between electrokinetic features of both particles purified *via* the PEG precipitation method is less pronounced than that detailed by Nguyen *et al.*¹⁶ This difference may be due to the slight variations in the VLPs synthesis

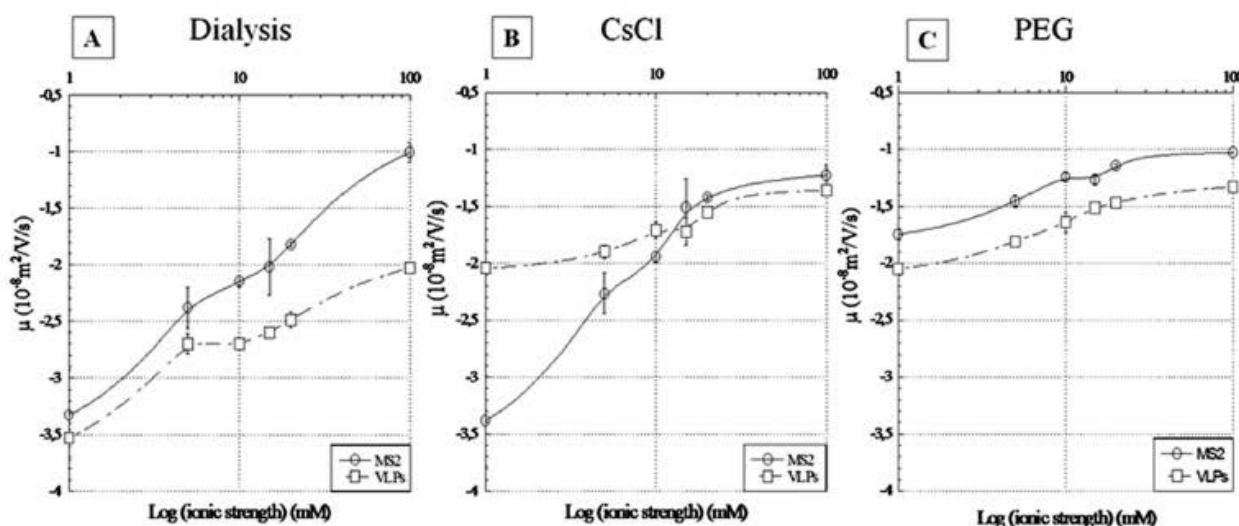


Fig. 3 Electrophoretic mobilities of MS2 bacteriophages and MS2-VLPs as a function of the logarithm of solution ionic strength at pH 7. Results are provided for particles purified according to dialysis (A), ultracentrifugation by cesium chloride gradient (B), and polyethylene glycol (PEG) precipitation (C). The solid and dotted lines are only guides to the eye.

performed in this work and by Nguyen *et al.*¹⁶ These authors indeed produced virus like particles *via* hydrolysis of the internal genome of complete MS2 phages whereas, in this study, the gene of the capsid protein of the phage is used to produce MS2-VLPs.

4. Discussion

In the literature, viruses are commonly purified *via* ultracentrifugation by density gradient^{5,24,26,28} or purification methods based on viruses precipitation mediated by (macro)molecules like PEG. Due to the implication of foreign molecules (*i.e.* PEG, CsCl), some authors rather prefer the use of dialysis method despite its inherent non-selectivity.^{13,14} Following the results presented here, the first main conclusion of this study is that all methods lead to quantitatively different electrokinetic and stability properties of MS2 phages, and that dialysis and CsCl-based purification procedures both point out a role played by the internal RNA genome in the stability and electrohydrodynamic properties of the phage as a whole. In this section, on the basis of previously published theoretical formalisms for electrokinetics and stability of soft multilayered particles,^{13,15} we propose and discuss scenarios that *qualitatively* explain the impacts of the various preparation methods on the physico-chemical properties of the inner RNA and outer capsid components of the particles of interest. As detailed below, these scenarios are in line with the size and electrokinetic properties measured for MS2 and MS2-VLPs with changing pH and/or ionic strength. We then conclude on the relevance of each virus purification method tested here for an adequate and unbiased investigation of virus interfacial properties.

4.1. Electrokinetics

As a starting point, we represent the MS2 virus as a soft bilayered-particle of total radius $\delta_1 + \delta_2$, with $\delta_1 = 11.3$ nm the radius of the internal RNA part and $\delta_2 \sim 2$ nm the thickness of the outer proteic component of the MS2 phage, respectively.¹³ Following the strategy by Dika *et al.*,¹⁴ the radial distribution function we adopt for the density of internal RNA and peripheral capsid proteins across the particle-solution interface was derived by van den Worm *et al.*²⁹ from cryo-electron microscopy studies. Evaluation of the electrophoretic mobility *versus* solution ionic strength for the above particle was performed upon numerical resolution of the full set of non-linear electrohydrodynamic equations describing the migration of a soft multilayered particle under the action of a direct-current electric field. The reader is referred to the theory by Langlet *et al.*¹³ for more information. As in Dika *et al.*,¹⁴ simulations were performed for given distributions of charge density and friction coefficient (inversely proportional to local structure permeability) across the particle/solution interphase, recalling that the electrophoretic mobility of a soft particle is governed by the balance between electrostatic and hydrodynamic forces exerted by the migrating particle on the electroosmotic flow.^{12,30} In addition, in view of the respective isoelectric points for the proteic capsid and inner RNA part (pH ~ 9 and 2, respectively¹³),

the charge density in the MS2 capsid is positive at pH 7 while that within the RNA genome is negative. Due to the complexity of the system and the lack of knowledge on *e.g.* the nature of the ionogenic groups located within the particle compartments and the way(s) chemical and structural particle heterogeneities are affected at a molecular scale by the physico-chemical composition (pH, ionic strength) of the medium and the preparation method (see discussion below), the purpose of the simulations is not to achieve a full quantitative recovery of the electrokinetic data depicted in Fig. 3, but rather propose scenarios that account for the respective trends of the plots mobility *versus* solution ionic strength experimentally determined for MS2 and VLPs prepared according to different purification methods.

Fig. 4 collects the electrokinetic profiles evaluated for MS2 and MS2-VLPs purified by dialysis (panel A), isopycnic ultracentrifugation (panel B) and PEG-mediated precipitation (panel C). The corresponding distributions for the charge density and friction coefficient (inversely proportional to permeability) are provided in Fig. 4D–F, respectively. In line with the results by Dika *et al.*,¹⁴ a concomitant decrease in the magnitude of the inner particle charge density and increase in the overall particle permeability – both in line with a smaller quantity of inner material for VLPs as compared to that for MS2 – qualitatively reproduces the respective positioning of the electrokinetic profiles measured for MS2-VLPs and complete MS2 phages purified by dialysis (Fig. 4D). It is stressed that, by construction, MS2-VLPs do not contain inner viral RNA genome. However, as extensively discussed by Dika *et al.*,¹⁴ the isoelectric point of MS2-VLPs (pH ~ 3 –4 (ref. 14)) together with their electrophoretic mobility features strongly suggest that these particles contain negatively-charged components, including RNA of bacterial origin, that could fill, at least partially, the ‘empty’ inner space of the VLPs, argument which is strongly supported by previous work.^{31,32} In particular, Peabody *et al.*³² confirmed that VLPs contain a certain amount of messenger RNA of approximately 500 nucleotides. As electrokinetic data for MS2 purified by dialysis and by the CsCl gradient method are similar (Fig. S1, ESI†), corresponding charge density and friction profiles in Fig. 4D and E are identical. To qualitatively reproduce the respective positions of mobility *versus* salt concentration curves for MS2-VLP and MS2 purified by the density gradient method (Fig. 4B), it is necessary to drastically decrease the inner material density of MS2-VLPs, thus leading to a decrease in the internal volume charge density (in absolute value) and to a decrease in the friction exerted by the particle on the flow. The reason for this striking difference may stem from the fact that VLP populations selected by dialysis and isopycnic centrifugation methods are different. The specific density gradient method could lead to a selection of VLP particles whose density closely approaches that of empty particles, while dialysis would lead to a different ‘group’ of retained VLPs selected only according to their size. Regardless of the chosen method, the conclusion is that VLPs express a lower charge density in magnitude and a higher permeability to external electroosmotic flow as compared to those for complete MS2 phages.

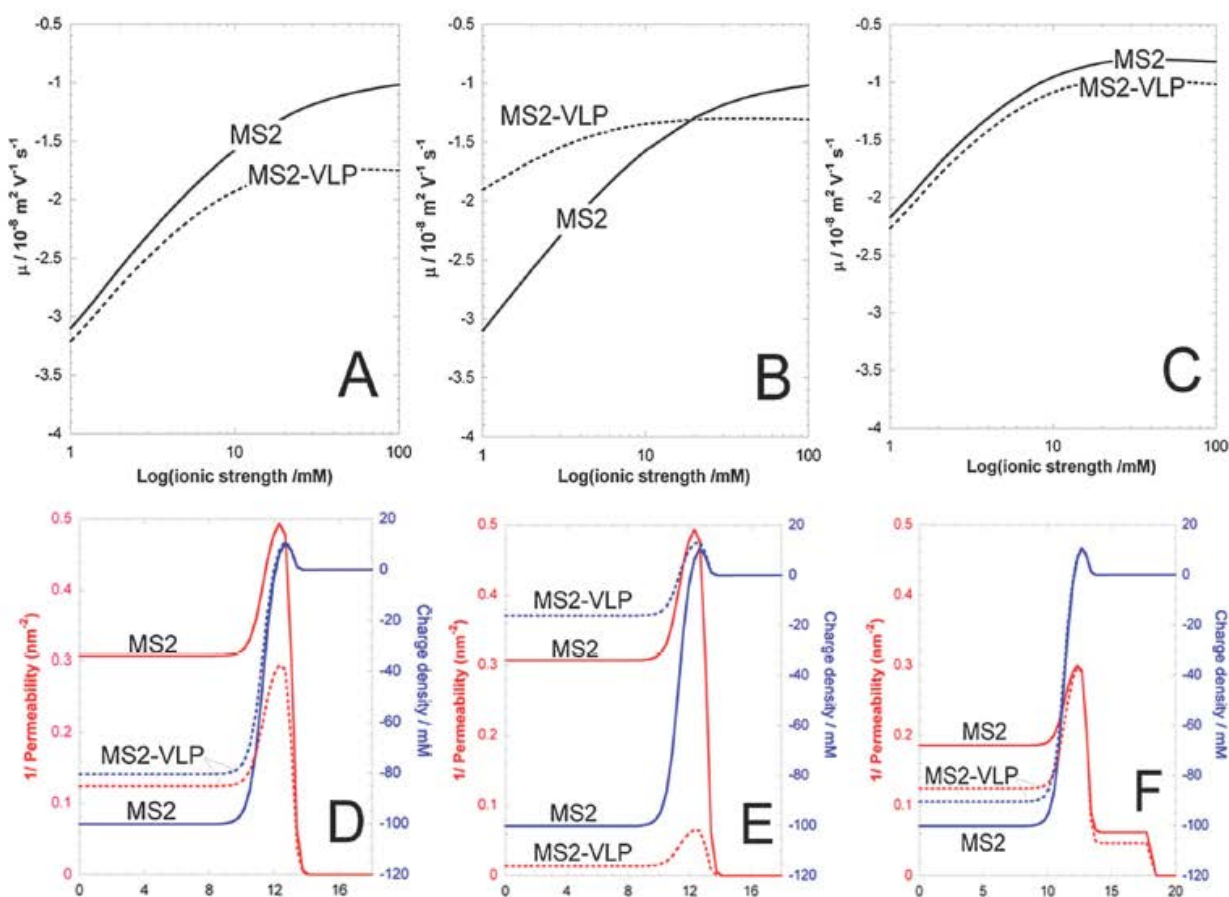


Fig. 4 Qualitative reconstruction of the respective positioning of the mobility versus ionic strength curves for MS2 and MS2-VLPs purified according to different preparation procedures: dialysis (A), ultracentrifugation by cesium chloride gradient (B) and polyethylene glycol (PEG) precipitation (C). The data were obtained using theory detailed by Langlet *et al.*¹³ for the electrohydrodynamics of soft multilayered particles. The spatial profiles for the friction ($\sim 1/\text{permeability}$) and charge density (expressed in concentration of equivalents ionized groups) across the particles obtained according to dialysis, CsCl gradient and PEG precipitation are those detailed in panels (D), (E) and (F), respectively.

As discussed in Section 3 (Fig. 3), the differences in electrokinetic profiles of MS2 and MS2-VLP particles are least pronounced when purified following PEG-mediated precipitation. In addition, the diameter of non-aggregated MS2 and MS2-VLP particles prepared by PEG precipitation (Fig. 1 and 2) is about 40 nm to 60 nm, which is 1.5 to 2.3 times larger than the reported size of isolated particles and the size measured for particles purified *via* dialysis and the CsCl gradient method. In agreement with these results, Nguyen *et al.*¹⁶ reported a 40 nm hydrodynamic diameter for MS2 and MS2-VLPs obtained by PEG precipitation. These elements strongly suggest that capsids of MS2 and MS2-VLPs are decorated by a PEG layer that effectively increases the particle size. In turn, the presence of this uncharged polymeric component at the outer periphery of the particles leads to an electrostatic and hydrodynamic screening of the inner RNA (for MS2) and of the negatively-charged inner part of MS2-VLPs, which reduces the influence of the internal particle constituents on the electrophoretic mobility of the particle as a whole. Stated differently, the presence of a PEG layer renders less applicable the conditions that must be fulfilled for the mobility

of a chemically-stratified particle to be impacted by its internal physico-chemical composition (these conditions are: the thickness of the outer particle surface layer is of the order of the Debye length and/or of the Brinkman length, see Langlet *et al.*¹³ for further details). The PEG layer then contributes to masking the internal particle component that becomes less effectively probed by the electroosmotic flow, thus reducing the difference between MS2 and MS2-VLPs electrophoretic mobilities as compared to the situation where the PEG layer is absent from the particle surface. Interestingly, the electrokinetic profile for VLPs obtained from the CsCl gradient method (Fig. 4B) and that for VLPs purified *via* PEG precipitation (Fig. 4C) are quasi-identical. This strongly supports the idea that for both situations the particle mobility is not significantly impacted by the internal component either because the latter is quasi-absent (CsCl gradient method) or masked (PEG precipitation method). In line with the above arguments, we recover qualitatively the trends of the electrokinetic profiles for MS2 and MS2-VLPs purified by PEG precipitation (Fig. 4F) upon addition of a 5 nm thick PEG layer at the outer surface of both particles,

while keeping nearly unchanged their charge density profiles that are consistent with the electrokinetic data collected when the dialysis method is adopted (Fig. 4D). More detailed computation would require refined information on the physico-chemical properties of the PEG layer adsorbed onto MS2 and MS2-VLPs surfaces, like thickness and type of distribution (homogeneous, diffuse or patch-like). As shown in previous work,^{13,30} the electrokinetic features of soft particles dramatically depend on these properties of their peripheral corona.

4.2. Aggregation

Stability properties of MS2 and MS2-VLPs are displayed in Fig. 1 and 2 over the range of pH values 2 to 7 at 1 mM and 100 mM. As a general comment, the aggregation features of MS2 and MS2-VLP particles differ according to the purification protocol adopted.

For bacteriophages, the results pertaining to the dialysis method are in line with those detailed by Langlet *et al.*¹³ and Dika *et al.*¹⁴ First, the propensity of these particles to aggregate is independent of the electrolyte concentration, which is in itself a deviation from DLVO theory predictions. According to the latter theory, with an increasing salt level in solution, the magnitude of the interparticular repulsive electrostatic interactions decreases as a result of particle charge screening by ions. Consequently, aggregation is expected to be facilitated upon increase of electrolyte concentration, a behavior that is not observed for MS2 (Fig. 1A and B). As extensively argued by Dika *et al.*,¹⁴ the presence of the RNA genome within MS2 likely contributes to significant interparticular attractive forces (van der Waals and hydrophobic) that overwhelm the repulsive electrostatic contribution and thus lead to undifferentiated aggregation behavior at low and high salt concentrations. Only for pH values larger than 4, which corresponds to the isoelectric point for the complete phage,¹⁴ MS2 particles are stable due to a significant increase of particle charge density *via* deprotonation of ionogenic groups located in the RNA and capsid parts. Recalling that the isoelectric point (pH $\sim$ 4) of MS2 viruses is significantly governed by the charge properties of both the RNA and the capsid components (see details in Dika *et al.*¹⁴ and Langlet *et al.*¹³), the pH value 4 marking the frontier between stable and unstable particles strengthens the idea according to which aggregation features of MS2 phages are significantly impacted by the physico-chemical properties of the inner RNA phage component.

For MS2-VLPs purified by dialysis, the density of charges located inside the particle is smaller in magnitude than that of charges located in the RNA part of MS2 particles (Fig. 4D). Accordingly, and in line with preceding arguments, the stability of MS2-VLP is significantly different as compared to that of the complete phage (see comparison between Fig. 1 and 2), a feature that was extensively discussed by Dika *et al.*¹⁴ Briefly, following the theory by Duval *et al.*³³ on the electrostatic interactions between multilayered soft particles, the capsid of VLPs most significantly determines VLP electrostatic interactions at 100 mM where the electric double layer mainly extends at the outer particle periphery only. As the isoelectric

point for the outer proteins is ~ 9 ,¹³ the net charge carried by the capsid in the pH range 2.5–7 never reaches a zero value, hence the electrostatic interactions between VLPs in the 100 mM electrolyte cannot be rigorously cancelled in this pH range. The finite magnitude of the repulsive electrostatic forces between VLPs in the pH range 2.5–7 at 100 mM is apparently always sufficient to counterbalance the short range attractive forces (and thus prevent aggregation, see Fig. 2B) of which the magnitude is less significant than that for MS2 because of the lower inner particle content within VLPs.¹⁴ With decreasing ionic strength (1 mM, Fig. 2A), the electric double layer sufficiently recedes within the heart of MS2-VLPs and the magnitude of the interparticular electrostatic interactions then becomes significantly governed by the inner part of MS2-VLPs and to a lower extent by their outer periphery.³³ The pH defining a zero value for the internal charge of VLPs is necessarily lower than that for the capsid (it is thereby recalled that the isoelectric point for RNA is 2, to be compared with 9 for the proteic capsid¹³). From the theory by Duval *et al.*,³³ for pH values below and above that critical pH where the inner material is positively and negatively charged, respectively, VLPs experience significant repulsive electrostatic interactions, thereby favoring their stability against aggregation, in line with the data collected at pH $>$ 4 and pH $<$ 4 in Fig. 2A for VLP particles purified by dialysis.

The aggregation observed at low pH for MS2 phages might be explained by remaining proteins in solution after dialysis. However, their impact is not observed for VLPs regardless of solution ionic strength, which suggests an important role of the RNA genome in aggregation, as qualitatively detailed in the preceding paragraph. When selectively obtained following cesium chloride gradient ultracentrifugation, both MS2 and MS2-VLPs particle suspensions are stable against aggregation over the whole range of pH values in 1 mM and 100 mM electrolyte solutions (Fig. 1 and 2). The fact that stability of CsCl-purified VLPs is promoted (as compared to dialysis-purified VLPs) conforms with the quasi-absence of inner particle material (Fig. 4E) that plays a significant role in determining interparticular attractive forces (role revealed upon examination of aggregation data for complete MS2 phages and VLPs purified by dialysis, see discussion above). However, in view of the absence of aggregation for the complete MS2 phages purified according to the CsCl gradient, it is apparent that CsCl itself favors the stability of the particles, no matter the nature and quantity of their internal constitution. The origin of the physico-chemical mechanism explaining this CsCl-mediated stability of MS2 and MS2-VLPs is difficult to capture on the sole basis of the size data reported here. Several studies addressed the impact of alkali-metal and halide ions on protein conformation. For the sake of example, Snary *et al.*³⁴ studied the conformational change of gastric mucoproteins after treatment by CsCl density gradient centrifugation. These authors showed that very low concentration of cesium chloride could induce dramatic changes in the mucoprotein conformation without any decrease of the protein molecular weight. In detail, it was proposed that the water structure lattice is disrupted in the presence of

Cs⁺ (a 'structure-breaking' effect on water), which *in fine* leads to a decrease in solvation of the sugar protein moieties. The authors further showed that the resulting contracted protein structure does not revert to the native conformation upon removal of CsCl (by *e.g.* dialysis). Recalling the intimate relationship existing between protein structure and nature/magnitude of protein-protein interactions, if any of these modifications take place for coat proteins of the particles of interest here, they should lead to an increase in the overall repulsive interparticle energy barrier (thus preventing aggregation) *via e.g.* an increase in steric forces between the rigid protein structures, or a decrease in interparticle hydrogen bond formation. In line with these elements, Wright *et al.*³⁵ found that aggregation of recombinant adeno-associated virus vector (26 nm in diameter, similar to the size of MS2 and MS2-VLPs) was prevented by the use of cesium chloride at concentrations corresponding to solution ionic strengths larger than 200 mM. Baynes *et al.*³⁶ argued that the mechanism accounting for the suppression of protein aggregation by certain ions, surfactants or polyols could be related to non-specific entropic effects due to the exclusion of these agents from the gap between two proteins as they come together.³⁴ Firm conclusions on the very role of CsCl would surely require more detailed investigation that goes beyond the scope of this paper. The important point that we make here is that addition of this salt strongly modifies the stability features of MS2 and MS2-VLPs as compared to other purification methods.

The last protocol we tested is the precipitation of particles using polyethylene glycol (PEG). Complete MS2 phages are aggregated at pH ≤ 6 in 1 mM and 100 mM electrolyte solution (Fig. 1) while MS2-VLPs are in aggregated form only at pH ~ 4 under 1 mM salt concentration conditions (Fig. 2A). Qualitatively, the aggregation features of PEG-treated MS2 particles are similar to those discussed above for dialysis-treated MS2 except that the pH value marking the frontier between stable and unstable regime is now shifted from 4 (which corresponds to the isoelectric point of dialysis-treated MS2) to 6. The same comparison may be drawn for MS2-VLPs purified according to dialysis and to PEG precipitation with aggregation occurring in the pH range 3 to 4 for the former and pH ~ 4 for the latter. The chemistry of covalent binding of nonionic PEG macromolecules to proteins has been extensively reviewed.^{37–39} In particular, Roberts *et al.*³⁹ showed that PEG conjugation increases the apparent size of polypeptides, which is in line with results of Fig. 4F and with the 40 nm–60 nm diameter measured for MS2 phages at pH 7. The presence of PEG at MS2 particle surfaces may modify the MS2 aggregation properties according to very distinct and complex scenarios depending on PEG layer thickness, molecular weight or distribution at the particle surface. In detail, either the repulsive contribution to the overall interparticle interaction energy may increase as a result of steric forces, or PEG may promote aggregation upon attachment of neighboring particles *via* the formation of hydrogen bonds or *via* the interactions between hydrophobic parts of PEG macromolecules. In view of the larger pH domain where PEG-treated MS2 particles aggregate as compared to that for their dialysis-purified counterparts, it seems that PEG

promotes the formation of MS2 aggregates rather than favoring MS2 suspension stability by contributing to steric interparticle repulsion. The situation is apparently more complex for PEG-treated MS2-VLPs since the explanation given above for the role of PEG in promoting MS2 unstability should lead to aggregation of VLPs at low pH values where electrostatic repulsions are least significant. Instead, the slight shift of the pH value where VLPs aggregation is observed could be due to a larger electrostatic contribution of the proteic part (of isoelectric point ~9) in determining the isoelectric point of VLPs as a result of a significant screening of the internal VLP component following the presence of the outer PEG layer. Such shift is qualitatively in line with the theory by Langlet *et al.*¹³ on the isoelectric point of complex soft chemically-stratified particles. More detailed molecular analysis would be required for firmly concluding on the origin of the aforementioned shift in the pH value. The difficulty in definitely asserting the role played by PEG also stems from slightly different conformation and composition of the proteins constituting the capsid of VLPs and MS2 phages. The shell of MS2 phages indeed consists of 180 copies of capsid proteins and a single copy of a maturation protein, whereas the capsid of VLPs lacks the maturation protein known to impact significantly the tridimensional structure of the viral capsid as a whole.⁴⁰ These variations in capsid structure/composition may lead to different affinities of PEG for MS2 and MS2-VLPs, which in turn would result in distinct impacts on their aggregation behavior.

5. Conclusions

The analysis demonstrates that the type of experimental procedure followed for purifying MS2 and MS2-VLP particles largely impacts the electrokinetic and stability properties of these particles as a function of medium ionic strength and pH. The presence of RNA genome affects the electrokinetic properties of particles prepared *via* dialysis or CsCl gradient methods, in line with the conclusions by Langlet *et al.*¹³ and Dika *et al.*¹⁴ In contrast, the electrokinetic profiles for MS2 and MS2-VLPs purified by PEG precipitation are not significantly different, as found by Nguyen *et al.*¹⁶ It is argued that the presence of a PEG layer at the surface of MS2 and VLPs contributes to masking the internal particle constituents *via* electrostatic and hydrodynamic screening, hence, in turn, the electrophoretic mobility of these particles predominantly reflects the electrohydrodynamic properties of the only outer particle region. Electrokinetic profiles obtained for MS2 and MS2-VLPs purified according to dialysis, CsCl gradient or PEG-precipitation could be qualitatively reconstructed using theory on electrokinetics of soft multilayered particles.¹³ Scenarios are further proposed for explaining the origins of the dependence of the particle suspension stability on the purification protocols, recognizing that refined interpretation would necessarily require molecular information on the structures of the particles treated according to the different protocols investigated here. For that purpose, systematic small angle X-ray scattering (SAXS) experiments on MS2 and MS2-VLPs purified by dialysis, CsCl gradient and PEG precipitation will be the subject of a forthcoming report.

Altogether, this study highlights for the first time that conclusions regarding physico-chemical properties of viruses and virus-like-particles may be strongly impacted by the very procedure followed for purifying the particles. As a result, special attention should be given to the choice of such a method for deriving adequately virus interfacial properties in order to understand the fate and behavior of viral particles in natural aquatic media. In the light of the results reported here, particle purification by the CsCl gradient method seems to be the most efficient because it favors particle stability and it allows for the most clear distinction between electrokinetic properties of MS2 and MS2-VLPs, in agreement with theoretical prediction on electrophoretic mobility of soft multilayered particles.

References

- 1 F. Loisy, R. L. Atmar, P. Guillon, P. Le Cann, M. Pommepuy and F. S. Le Guyader, *J. Virol. Methods*, 2004, 123, 1–7.
- 2 N. Boudaud, C. Machinal, F. David, A. Fréval-Le Bourdonnec, J. Jossent, F. Bakanga, C. Arnal, M. P. Jaffrezic, S. Oberti and C. Gantzer, *Water Res.*, 2012, 46, 2651–2664.
- 3 M. J. Mattle, B. Crouzy, M. Brennecke, K. R. Wigginton, P. Perona and T. Kohn, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45, 7710–7717.
- 4 C. Gaulin, M. Frigon, D. Poirier and C. Fournier, *Epidemiol. Infect.*, 1999, 123, 475–478.
- 5 J. A. Redman, S. B. Grant, T. M. Olson, M. E. Hardy and M. K. Estes, *Environ. Sci. Technol.*, 1997, 31, 3378–3383.
- 6 J. Langlet, L. Ogorzaly, J. C. Schrotter, C. Machinal, F. Gaboriaud, J. F. L. Duval and C. Gantzer, *J. Membr. Sci.*, 2009, 326, 111–116.
- 7 S. Skrabber, L. Ogorzaly, K. Helmi, A. Maul, L. Hoffmann, H. M. Cauchie and C. Gantzer, *Water Res.*, 2009, 43, 4780–4789.
- 8 K. Valegård, J. B. Murray, P. G. Stockley, N. J. Stonehouse and L. Liljas, *Nature*, 1994, 371, 623–626.
- 9 D. H. Taylor and H. B. Bosmann, *J. Virol. Methods*, 1981, 2, 251–260.
- 10 M. P. Hughes, H. Morgan and F. J. Rixon, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, 1571, 1–8.
- 11 C. M. Schaldach, W. L. Bourcier, H. F. Shaw, B. E. Viani and W. D. Wilson, *J. Colloid Interface Sci.*, 2005, 294, 1–10.
- 12 J. F. L. Duval and F. Gaboriaud, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2010, 15, 184–195.
- 13 J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer and J. F. L. Duval, *Biophys. J.*, 2008, 94, 3293–3312.
- 14 C. Dika, J. F. L. Duval, H. M. Ly-Chatain, C. Merlin and C. Gantzer, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 14, 4939–4948.
- 15 J. F. L. Duval, D. Küttner, C. Werner and R. Zimmermann, *Langmuir*, 2011, 27, 10739–10752.
- 16 T. H. Nguyen, N. Easter, L. Gutierrez, L. Huyett, E. Defnet, S. E. Mylon, J. K. Ferri and N. Ai Viet, *Soft Matter*, 2011, 7, 10449–10456.
- 17 N. Shirasaki, T. Matsushita, Y. Matsui, A. Oshiba and K. Ohno, *Water Res.*, 2010, 44, 1307–1316.
- 18 I. R. Juckes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 229, 535–546.
- 19 ISO10705-1. Water quality: detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland, 1995.
- 20 J. Sambrook and D. W. Russell, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 1989, vol. I, pp. 124–129.
- 21 A. S. Cavallaro, D. Mahony, M. Commings, T. J. Mahony and N. Mitter, *Microb. Cell Fact.*, 2011, 10, 57–65.
- 22 C. E. Vrentas, S. Onstot and E. M. Nicholson, *Protein Expression Purif.*, 2012, 82, 380–388.
- 23 S. Penrod, T. M. Olson and S. B. Grant, *J. Colloid Interface Sci.*, 1995, 173, 521–523.
- 24 A. E. Tollefson, M. Kuppuswamy, E. V. Shashkova, K. Doronin and W. S. Wold, *Methods Mol. Med.*, 2007, 130, 223–235.
- 25 A. Mbiguino and J. Menezes, *J. Virol. Methods*, 1991, 31, 161–170.
- 26 E. Gias, S. U. Nielsen, L. A. F. Morgan and G. L. Toms, *J. Virol. Methods*, 2008, 147, 328–332.
- 27 P. Payment and M. Trudel, *Manuel de techniques virologiques*, Presse de l'université du Québec, 1989.
- 28 S. L. Penrod, T. M. Olson and S. B. Grant, *Langmuir*, 1996, 12, 5576–5587.
- 29 S. H. E. van den Worm, R. I. Koning, H. J. Warmenhoven, H. K. Koerten and J. van Duin, *J. Mol. Biol.*, 2006, 363, 858–865.
- 30 J. F. L. Duval and H. Ohshima, *Langmuir*, 2006, 22, 3533–3546.
- 31 G. G. Pickett and D. S. Peabody, *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 4621–4626.
- 32 D. Peabody, B. Manifold-Wheeler, A. Medford, S. Jordan, J. do Carmo Caldeira and B. Chackerian, *J. Mol. Biol.*, 2008, 380, 252–263.
- 33 J. F. L. Duval, J. Merlin and P. A. L. Narayana, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, 1037–1053.
- 34 D. Snary, A. Allen and R. H. Pain, *Biochem. J.*, 1974, 141, 641–646.
- 35 J. F. Wright, T. Le, J. Prado, J. Bahr-Davidson, P. H. Smith, Z. Zhen, J. M. Sommer, G. F. Pierce and G. Qu, *Mol. Ther.*, 2005, 12, 171–178.
- 36 B. M. Baynes, D. I. Wang and B. L. Trout, *Biochemistry*, 2005, 44, 4919–4925.
- 37 S. C. Chamow, T. P. Kogan, M. Venuti, T. Gadek, R. J. Harris, D. H. Peers, J. Mordenti, S. Shak and A. Ashkenazi, *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 133–140.
- 38 F. M. Veronese, *Biomaterials*, 2001, 22, 405–417.
- 39 M. J. Roberts, M. D. Bentley and J. M. Harris, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2002, 54, 459–476.
- 40 D. A. Kuzmanovic, I. Elashvili, C. Wick, C. O'Connell and S. Krueger, *J. Mol. Biol.*, 2006, 355, 1095–1111.

3e partie

Impact des propriétés interfaciales sur les
capacités d'adhésion virale

Dans cette troisième partie, l'objectif est de mettre en évidence les corrélations existant entre la charge électrostatique et la balance hydrophile/hydrophobe des virus et leurs capacités d'adhésion sur différentes surfaces.

Dans un premier temps, nous avons utilisé pour modèles trois bactériophages ARN F-spécifiques, de structures similaires : les phages MS2, Q β et GA. Les charges électrostatiques de ces virus ont été caractérisées selon le concept de particules molles multicouches et l'hydrophobicité par des mesures d'adhésion sur des supports d'hydrophobicité contrôlée. Les résultats obtenus ont ensuite été corrélés à des capacités d'adhésion sur des supports industriels dont les propriétés de surface (hydrophobicité et rugosité) ont été caractérisées au préalable.

Dans un second temps, nous avons utilisé pour modèles trois bactériophages à structures complètement différentes afin de corréliser les différences structurales avec de possibles différences de propriétés interfaciales. Les phages utilisés sont: MS2, Phi X 174 et PRD1. Enfin, suite à l'étude des propriétés interfaciales de ces bactériophages, nous avons tenté de corréliser celles-ci à des capacités d'adhésion sur des supports chargés et sur des supports avec une balance hydrophile/hydrophobe variable.

I. Adhésion des bactériophages ARN F-spécifiques à des surfaces abiotiques: Importance de la rugosité, des interactions hydrophobes et électrostatiques.

L'adhésion des virus, une fois qu'ils sont à l'extérieur de leur cellule hôte va dépendre des caractéristiques physicochimiques de leur interface. Cette étude vise à élucider les effets concomitants des propriétés interfaciales des phages, la charge électrostatique et la balance hydrophile/hydrophobe et des propriétés de surface des supports, la rugosité et l'hydrophobicité sur la capacité d'adhésion virale. Pour ce faire, nous avons utilisé des bactériophages ARN F-spécifiques MS2, Q β et GA de même diamètre (~ 25 nm) et de points isoélectriques similaires (2,6 - 3,9 (Langlet et *al.*, 2008b)). Dans une première partie, les propriétés électrostatiques des phages seront examinées sur la base des résultats électrocinétiques obtenus en utilisant le concept de particules molles à multicouches (Langlet et *al.*, 2008a). Les résultats montrent que ces trois bactériophages expriment une charge électrostatique effective similaire traduit par une pente similaire lors de la mesure de la mobilité électrophorétique en fonction du logarithme de la force ionique. Le degré d'hydrophobicité des bactériophages sera ensuite évalué par adhésion sur un

support non rugueux strictement hydrophobe (1-dodécane-thiol), dans des conditions où les interactions électrostatiques virus-surface sont complètement masquées (haute force ionique, 100 mM NaNO₃, pH 7). On obtient la séquence d'hydrophobicité suivante MS2 < Qβ < GA; MS2 étant le moins hydrophobe des trois phages.

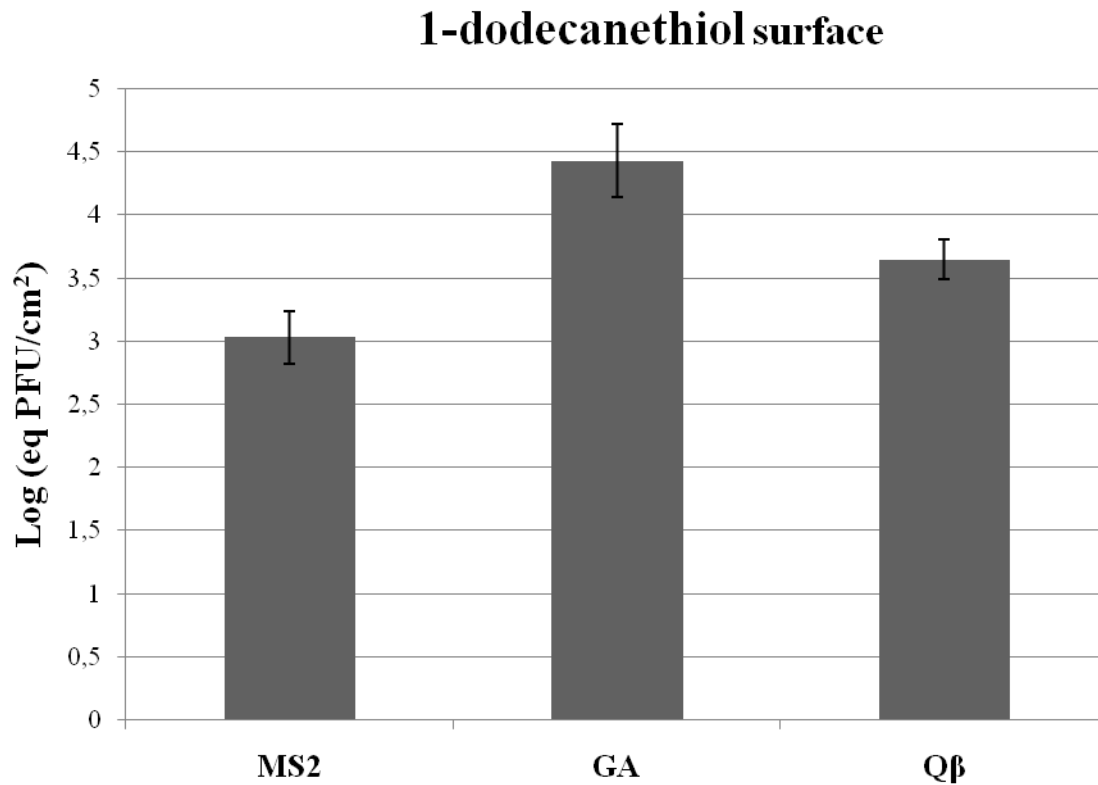


Figure 21. Adhésion de MS2, GA et Qβ sur une surface hautement hydrophobe (1-dodécane-thiol surface). Concentration initiale de phages: 10⁶ PFU.ml⁻¹; à 100 mM NaNO₃, pH 7. Le temps de contact entre la surface et les phages est de 3 h.

Dans une seconde partie, la rugosité respective et la balance hydrophile/hydrophobe des supports (1-dodécane-thiol, verre, polypropylène et inox) sont évaluées à l'échelle nanométrique par AFM. Les résultats donnent la séquence d'hydrophobicité suivante: Verre ~ Inox < Polypropylène < 1-dodecanethiol, le verre étant le moins hydrophobe et la séquence de rugosité suivante 1 dodecanethiol ~ verre < Polypropylène < Inox, l'inox étant le support le plus rugueux.

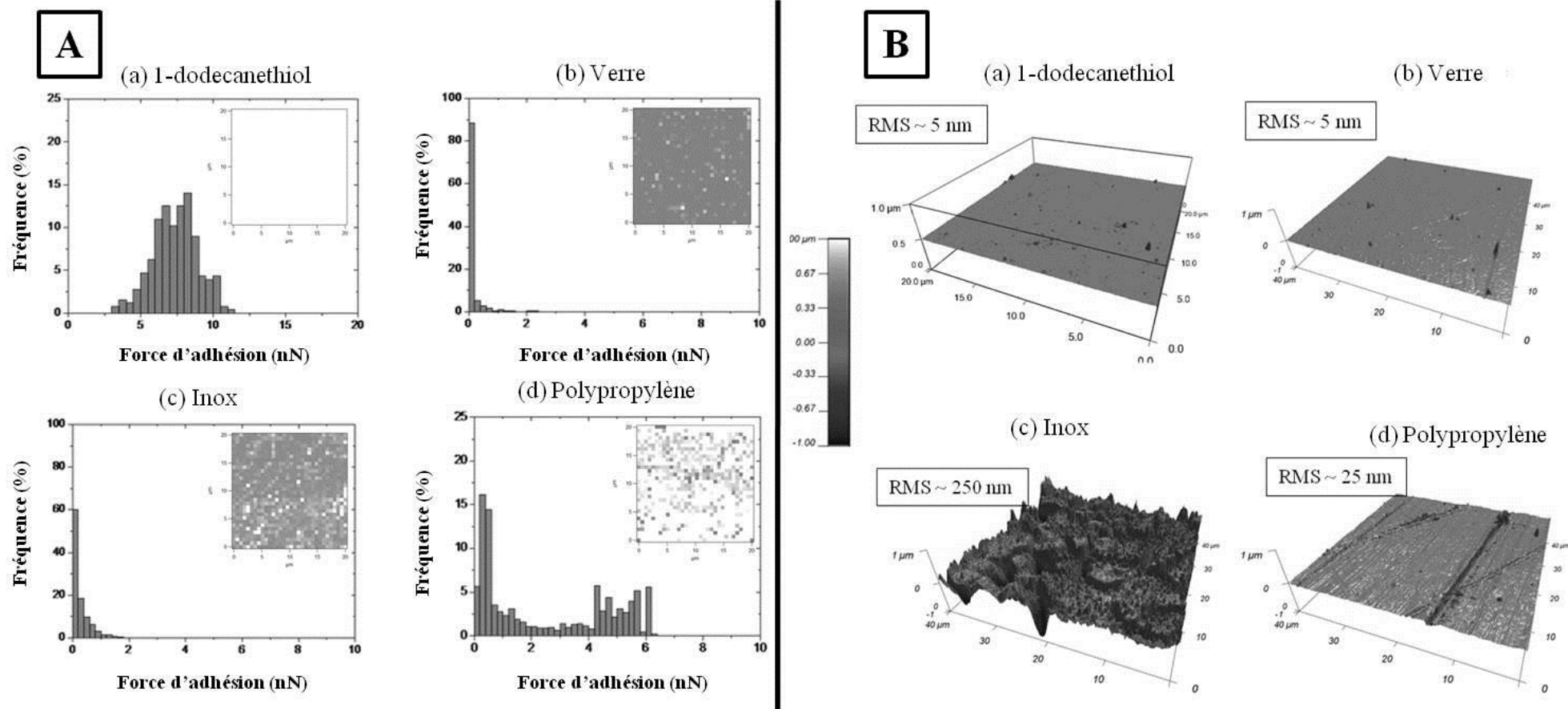


Figure 22. A: Distribution statistique des forces d'adhésion mesurées par microscopie à force chimique (CFM) entre une pointe AFM hydrophobe (-CH₃) et les différents supports (a) 1-dodécane-thiol, (b) lame de verre, (c) inox et (d) polypropylène. Les histogrammes (a), (b), (c) et (d) sont réalisés à partir de la cartographie spatiale de l'équilibre hydrophile/hydrophobe (ou force d'adhésion), plus les forces d'adhésion sont faibles, plus le support est hydrophile. En insert: les zones blanches décrivent les régions hydrophobes et les zones grises les régions hydrophiles. B: Topographie tridimensionnelle des supports obtenus par AFM en mode contact. (a) 1-dodécane-thiol solution, (b) verre (c) inox (d) polypropylène. La cartographie est réalisée en eau Milli-Q à la température ambiante. Les valeurs de RMS (Root-Mean square) révèlent la rugosité relative des différents supports.

Et enfin, dans une troisième partie, l'adhésion de MS2, GA et Q β sur les différentes surfaces mentionnées ci-dessus est étudiée à haute force ionique (100 mM de NaNO₃, pH 7) pour examiner spécifiquement l'influence de l'hydrophobicité de surface et de la rugosité. Il est observé que les capacités d'adhésion des phages augmentent avec l'augmentation du degré d'hydrophobicité et de rugosité des supports. L'adhésion des phages est également analysée à une faible concentration ionique (1 mM NaNO₃, pH 7) pour explorer l'impact des interactions électrostatiques entre les phages et le support, la capacité d'adhésion des phages est alors réduite excepté sur les supports à forte rugosité.

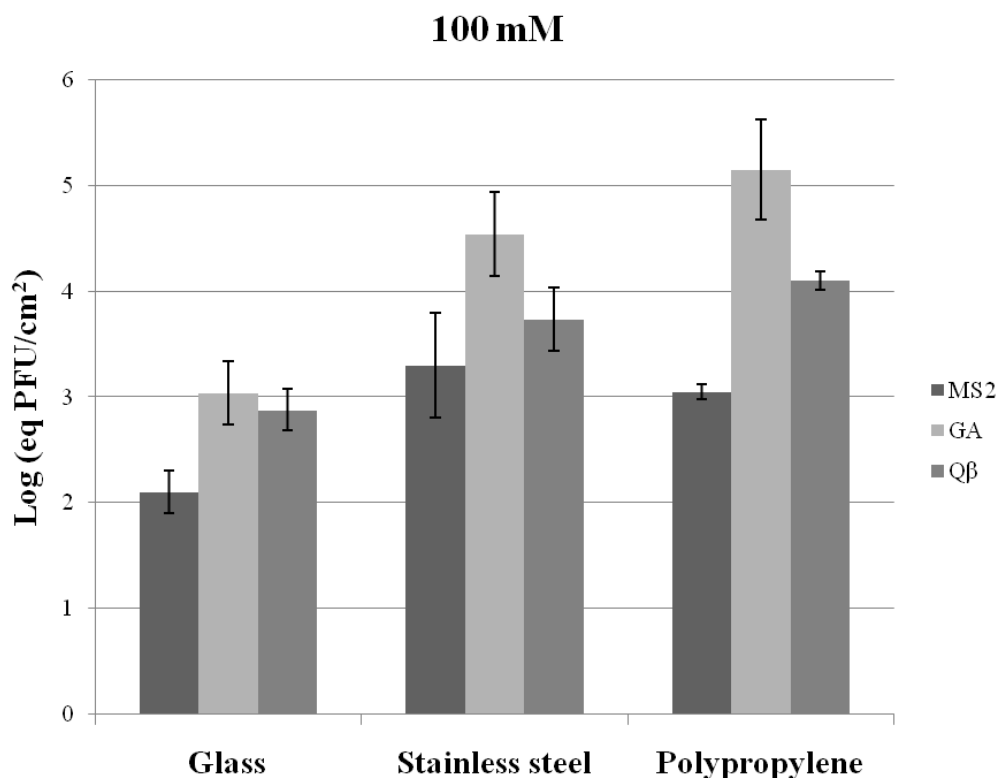


Figure 23. Adhésion de MS2, GA et Q β sur les différentes surfaces. Concentration initiale de phages: 10⁶ PFU.ml⁻¹; à 100 mM NaNO₃, pH 7. Le temps de contact entre la surface et les phages est de 3 h.

Ces résultats illustrent la nécessité de prendre en compte à la fois le degré d'hydrophobicité des bactériophages et des supports mais également la rugosité des surfaces. Sachant que l'adhésion est un phénomène multi-paramétrique, cette étude est la première à caractériser avec précision les propriétés de surface des supports dans des cas d'adhésion virale et à corréler celles-ci avec les capacités d'adhésion de phages dont les caractéristiques interfaciales ont été évaluées au préalable mettant ainsi en évidence l'importance des interactions électrostatiques et hydrophobes lors du processus d'adhésion.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

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



Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: Importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions

C. Dika^{a,b,1}, M.H. Ly-Chatain^{a,b,1}, G. Francius^{a,b}, J.F.L. Duval^{c,d,*}, C. Gantzer^{a,b,**}

^a Université de Lorraine, LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement), UMR 7564, Nancy, F-54000, France

^b CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy, F-54000, France

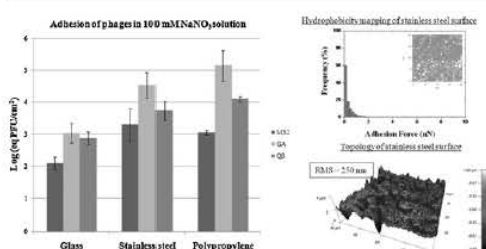
^c Université de Lorraine, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France

^d CNRS, LIEC, UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54500, France

HIGHLIGHTS

- Hydrophobicity degree and roughness of deposition substrate are quantified.
- Phages used here exhibit similar electrostatic charge but different hydrophobicity.
- Interfacial properties of phages lead to different adhesion capacities.
- Substrate hydrophobicity and roughness impacts phage adhesion at low salt content.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2013

Received in revised form 14 February 2013

Accepted 17 February 2013

Available online xxx

Keywords:

Bacteriophage
Adhesion
Surface properties
Hydrophobicity
Roughness

ABSTRACT

We report on the adhesion features of three F-specific RNA-phages (MS2, GA and QB) onto surfaces (1-dodecanethiol gold-coated surface, glass, polypropylene and stainless steel) that significantly differ with regard to their surface roughness and hydrophobic/hydrophilic balance. The number of adhered phages on the surfaces is quantified using RT-PCR. Adhesion experiments are performed under static conditions in the absence of bulk phages aggregation (1 mM and 100 mM NaNO₃ electrolyte, pH 7). The nanoscale surface features and the hydrophobicity of the deposition substrates are quantitatively addressed using Atomic Force Microscopy and Chemical Force Microscopy. The hydrophobicity of the phages is evaluated from their propensity to adhere onto flat and highly hydrophobic surface. Results show that, regardless of electrolyte concentration and surface roughness, the adhesion capacity of phages systematically follows the hydrophobicity sequence MS2 < QB < GA. The capacity of each phage to adhere onto the surface increases with increase in the degree of hydrophobicity and/or the roughness of the deposition substrate. Increasing the electrostatic interactions between phages and deposition surface by decreasing solution ionic strength leads to a reduction in surface concentration of adhered phages except for cases where the roughness of the deposition surface is significant. Altogether, the results obtained confirm the limited ability of the classical DLVO theory to predict the adhesion of complex viral (nano)particles to surfaces and emphasize the necessity to take into account the roughness of the deposition substrate and the hydrophobicity degree of both viruses and surfaces.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 59 62 63; fax: +33 3 83 59 62 55.

** Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 22 91; fax: +33 3 83 68 23 78.

E-mail addresses: jerome.duval@univ-lorraine.fr (J.F.L. Duval), christophe.gantzer@univ-lorraine.fr (C. Gantzer).

¹ Equally contributed to this work.

1. Introduction

Understanding the impact of surface properties of viruses on their capacity to adhere onto surfaces is of utmost concern in various fundamental and applied research fields. For the sake of illustration, the adhesion of pathogenic viruses to abiotic surfaces significantly controls their dissemination in natural aquatic media, their deposition onto food products or their elimination from water following sand filtration, membrane filtration or flocculation-based treatments.

The prediction of pathogen deposition (removal) onto (from) abiotic substrates necessarily requires in-depth analysis of the short range hydrophobic and long range electrostatic interactions taking place between viruses and target surfaces. In particular, it is critical that the effect of medium composition (pH, ionic strength) on key physico-chemical properties pertaining to viruses and deposition surfaces, *i.e.* size and charge of viruses, roughness and charge of target surface, and hydrophobic/hydrophilic balance of both viruses and surface be initially evaluated. To the best of our knowledge, studies dealing with viral adhesion have so far scarcely considered the impacts of both roughness and hydrophobicity degree of the deposition surface on the adhesion of viruses. The main reason for this lack of analysis appears to originate from the difficulty to address quantitatively these surface properties at a nanometric scale, the latter spatial resolution being necessary in view of the nanoparticulate nature of viruses, *e.g.* 20–30 nm in diameter for F-specific RNA bacteriophages [1–3] and for pathogenic enteric viruses found in natural media (Norovirus or hepatitis A virus) [4]. Explicit consideration of deposition surface roughness on virus adhesion capacity is considered mandatory in view of numerous theoretical reports that clearly highlight how the presence of asperities or depressions at a given surface may affect the electric double layer surface structure and thereby the interaction energy profile between that surface and an approaching (bio)colloidal particle [5]. Unlike the case of virus adhesion, there are numerous experimental data aimed at deciphering the effect of surface roughness on adhesion of bacteria. These analyses remain controversial, however, with regard to their conclusions [6–10]. Using TiO₂ surfaces decorated with blunt model particles, Katainen *et al.* [10] controlled deposition surface roughness with root-mean-square (RMS) values up to 10 nm. Based on atomic force microscopy (AFM) pull-off force measurements, the authors suggested that the adhesion of particles smaller than or similar in size to the characteristic length scale of the surface asperities mainly depends on size and shape of the asperities only, while for larger particles, particle size does impact adhesion. Because of their size, viruses are relevant nanoparticles to evaluate how their adhesion capacity is affected by the deposition surface topography with typical RMS in the range one to tens of nanometers.

The difficulty in predicting adhesion of viral particles also stems from the complexity of their interfacial physico-chemical properties. In particular, recent studies [11,12] highlighted that viruses can not be considered as conventional impermeable hard spheres but instead should be viewed as paradigms of soft multilayered nanoparticles with electrohydrodynamic and aggregation properties that limit the application of standard electrokinetic models and classical DLVO theory formalism. The magnitude (and sign) of the charges carried by viral particles also affects virus adhesion capacity since it governs, together with the electrostatic properties of the target surface, the magnitude of the electrostatic interactions between virus and surface. It is recognized that virus charge is negative for pH values exceeding the virus isoelectric point (IEP). In the specific context of water treatment, the (non-pathogenic) MS2 phage is classically proposed as a surrogate to evaluate the performance of negatively charged filtration membranes or sand porous matrix to remove enteric viruses [13–15]. This choice of the MS2

phage is basically motivated by its low IEP value (IEP~3.5–3.9), which ensures that a high negative charge is carried by the phage at neutral pH and thus corresponds to the 'worst-case scenario' in terms of virus removal efficiency by negatively charged substrates (sand, membranes) [16,17]. A recent review [18] collates IEP values of *ca.* 150 different viruses with a mean value of 5 ± 1.3 , meaning that most viruses are negatively charged under natural pH conditions. Based on their literature survey, the authors further argue that the sole consideration of the IEP parameter for estimating virus charge and apprehending the underlying impact on virus adhesion is insufficient because of the significant discrepancy in literature results, even for a given virus subjected to similar deposition conditions. The further failure of, for example the classical DLVO analytical formulations for evaluating interparticular electrostatic interactions is another element that motivated the development of more complex and less approximate electrostatic interaction theories for soft multilayered bio-nanoparticles like viruses [19]. The poor predictive value of virus IEPs for estimating virus surface charge or apprehending virus–virus electrostatic interactions is further in line with results by Langlet *et al.* [11] who demonstrated that the IEP of a given virus can not be simply defined as the pH value where virus electrophoretic mobility and virus 'surface' charge is zero. Their analysis, supported by advanced electrohydrodynamic modeling of soft multilayered (bio)particles, indicates that the electrokinetic properties of viruses, which include the IEP value, actually reflect the electrostatic and hydrodynamic features of both the outer proteic shell and the inner RNA compartment composing the viral particle [11,12]. Accordingly, the concept of zeta potential and surface charge, strictly valid for homogeneous and hard (impermeable) particles, are physically irrelevant for viruses [20]. Furthermore, it seems timely to analyze the adhesion of negatively charged viruses of different types onto a given charged surface not only *via* the consideration of electrostatics but also with evaluation, at least on a (semi-)quantitative basis, of the effect of hydrophobic interactions.

Indeed, the latter, hydrophobic interactions are generally invoked, without any solid experimental proof, to explain viral adhesion in situations where electrostatic effects are obviously insufficient to explain the data. Conditions of high ionic strength allow the impact of electrostatic interactions on virus deposition to be neglected [17,21–23]. These interpretations may be often criticized because the corresponding analyses are not supported by additional data (*i.e.* other than those stemming from the very adhesion results) that would allow for an independent estimation of the hydrophobic/hydrophilic balance of *both viruses and deposition surface*. The use of macroscopic methods that consist in 'measuring' the hydrophobic/hydrophilic balance of microorganisms *via* analysis of their affinity for a solvent of given polarity (MATS tests) [24,25] has been severely criticized. For instance, some authors demonstrated that the majority of solvents used in MATS tests, or in Hydrophobic Interactions Chromatography [26], exhibit a finite electrostatic charge [27,28] and, consequently, may electrostatically interact with viruses, which complicates the estimation of their hydrophobicity [20]. A recent method based on AFM interaction force measurements between a silicon nitride tip coated with viruses and a hydrophobic surface, seems to be an alternative and very promising approach [29]. Nevertheless, the authors did not exclude the possibility that the glutaraldehyde glue used to immobilize viruses on the AFM-tip could bias their hydrophobic/adhesion force measurements. In addition, to the best of our knowledge, the hydrophobic/hydrophilic balance of the deposition substrate itself has never been addressed within the context of viral adhesion studies with use of spatially resolved AFM measurements following the methodology originally proposed by Alsteens *et al.* [30] for quantifying the hydrophobic/hydrophilic balance of bacteria. This strategy is based on the prior evaluation of adhesion forces

between an AFM-tip with hydrophobic coatings and model surfaces consisting of self-assembled alkanethiol monolayers (SAMs).

In view of the above elements, the current study aims at elucidating the intertwined impacts of (i) virus interfacial charge properties, (ii) deposition substrate roughness and (iii) hydrophobic/hydrophilic balance of both virus and deposition surface on virus adhesion capacity. To do so we operate with F-specific RNA bacteriophages MS2, Q β and GA of diameter ~ 25 nm and of similar IEP (2.6–3.9 [3]). In the first part of this paper, the respective roughness and hydrophobic/hydrophilic balance of the various deposition surfaces considered here (1-dodecanethiol, glass, polypropylene and stainless steel) are evaluated at a nanoscale by AFM all over the surface area of the substrate. In the second part, the governing electrostatic properties of phage particles are qualitatively discussed on the basis of electrokinetic results examined using the concept of soft multilayered particles [11,12]. The hydrophobicity degree of the bacteriophages is further evaluated upon inspection of their adhesion onto a flat hydrophobic 1-dodecanethiol gold-coated surface under conditions where virus-surface electrostatic interactions are completely screened (100 mM NaNO₃, pH 7). In a third part, the adhesion of MS2, GA and Q β phages on the various deposition surfaces mentioned above is investigated under 100 mM NaNO₃ concentration conditions (pH 7) for specifically examining the influence of deposition surface hydrophobicity and roughness. Adhesion of the phages is also analyzed at low salt concentration (1 mM NaNO₃, pH 7) in order to explore the additional impact of virus-surface electrostatic interactions. The results illustrate the necessity to account for surface roughness, hydrophobic/hydrophilic balance of both phages and deposition surfaces to address the respective contributions of repulsive virus-surface electrostatic interactions and attractive hydrophobic interactions both at high and low medium salt concentrations.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of hydrophobic model surfaces

A glass substrate (1×2 cm², 0.1 cm thick) was coated with a 5 to 10 nm thick chromium layer through use of a sputter coater (EMITECH, K575 Turbo, United Kingdom) and was further covered with a top gold layer of ca. 40 nm in thickness. Gold-coated glass surfaces were then immersed for 14 h in a solution containing 1 mM CH₃-(CH₂)₁₁-SH and HO-(CH₂)₁₁-SH in various proportions following the protocol detailed by Alsteens et al. [30] and were then

rinsed with ethanol. The gold surfaces thus obtained, coated with an alkanethiol monolayer with controlled surface fractions of -CH₃ groups served as calibration surfaces for correlating the searched hydrophobic/hydrophilic balance of the chosen deposition substrates. To obtain a -CH₃ gold-coated AFM-tip, a gold-coated AFM-tip of the type NPG-10, Bruker AXS, (Palaiseau, France) was immersed 15 h in a solution containing 2 mM 1-dodecanethiol CH₃-(CH₂)₁₁-SH ($\geq 98\%$, 471364 SIGMA).

2.2. Chemical Force Microscopy (CFM) measurements and Atomic Force Microscopy (AFM) imaging

In a first stage, force adhesion measurements between the hydrophobic -CH₃ gold-coated AFM-tip and the alkanethiol surfaces were carried out in Milli-Q water at room temperature using a commercial atomic force microscope (MFP3D-BIO, Asylum Research Technology, Atomic Force F&E GmbH, Mannheim, Germany) in AFM force-volume mode. The data constitute a calibration curve for estimating the hydrophobic/hydrophilic balance of our deposition substrate from the measurement of the adhesion force between that substrate and a -CH₃ gold-coated AFM-tip (Fig. 1). The area of the investigated surface was divided according to a 32×32 grid and for each pixel (1024 in total) that corresponds to a given spatial spot of the surface, a force curve measurement was recorded upon retraction of the -CH₃ gold-coated tip from the deposition substrate. Following this methodology, a cartography of the hydrophobic/hydrophilic balance of the surface was constructed with a spatial resolution equal to the pixel size (~ 1 μ m). In this study, the overall sample surface area probed by the hydrophobic AFM-tip was 1600 μ m² (Fig. 2).

In addition to the above CFM analyses, the surface topography and the average RMS (root-mean square) roughness of the deposition substrates were addressed via AFM imaging in contact mode according to Polyakov et al. [31]. Prior to each experiment, the geometry of the tip was systematically controlled using a commercial grid for 3-D visualization (TGT1, NT-MTD Company, Moscow, Russia). Experiments were performed in 1 mM and 100 mM NaNO₃ solutions at pH ~ 7 and room temperature. Measurements were performed on approximately 1600 μ m² surface area.

2.3. Preparation of the F-specific RNA bacteriophages

MS2 bacteriophage was obtained from a reference culture (ATCC 15597-B1), Q β and GA bacteriophages were kindly provided by Prof. J. Jofre (Barcelona University, Spain). The phages

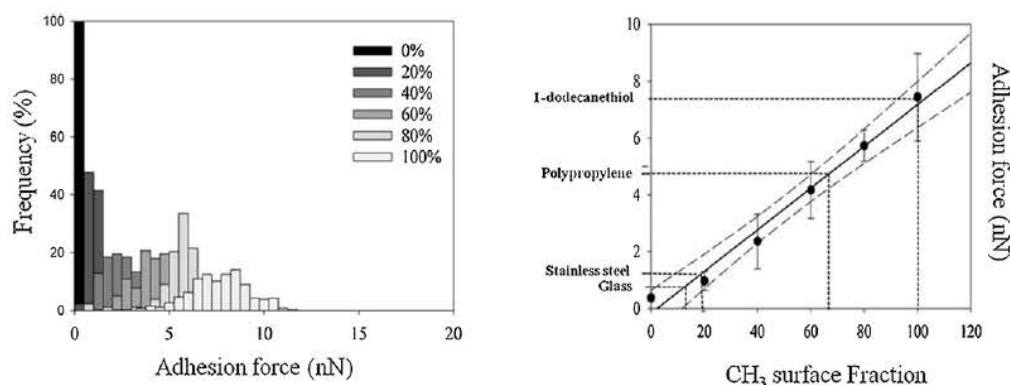


Fig. 1. (Left) Histogram of adhesion forces measured between a -CH₃ gold-coated AFM-tip and self-assembled alkanethiol monolayers with different -CH₃ equivalent surface fraction (indicated). Data result from the analysis of adhesion forces collected over SAMs surface area of ~ 1600 μ m² (force measurements carried in force-volume mode). (Right) Variation of the mean adhesion force as a function of -CH₃ surface fraction. The solid line was simulated using Cassie's law. The two dotted lines correspond to the 95% confidence interval for linear regression of data. Data collected for the various deposition substrates adopted in this study are also indicated. These data are derived from the hydrophobicity force-volume images reported in Figs. 2 and 3. See text for further details.

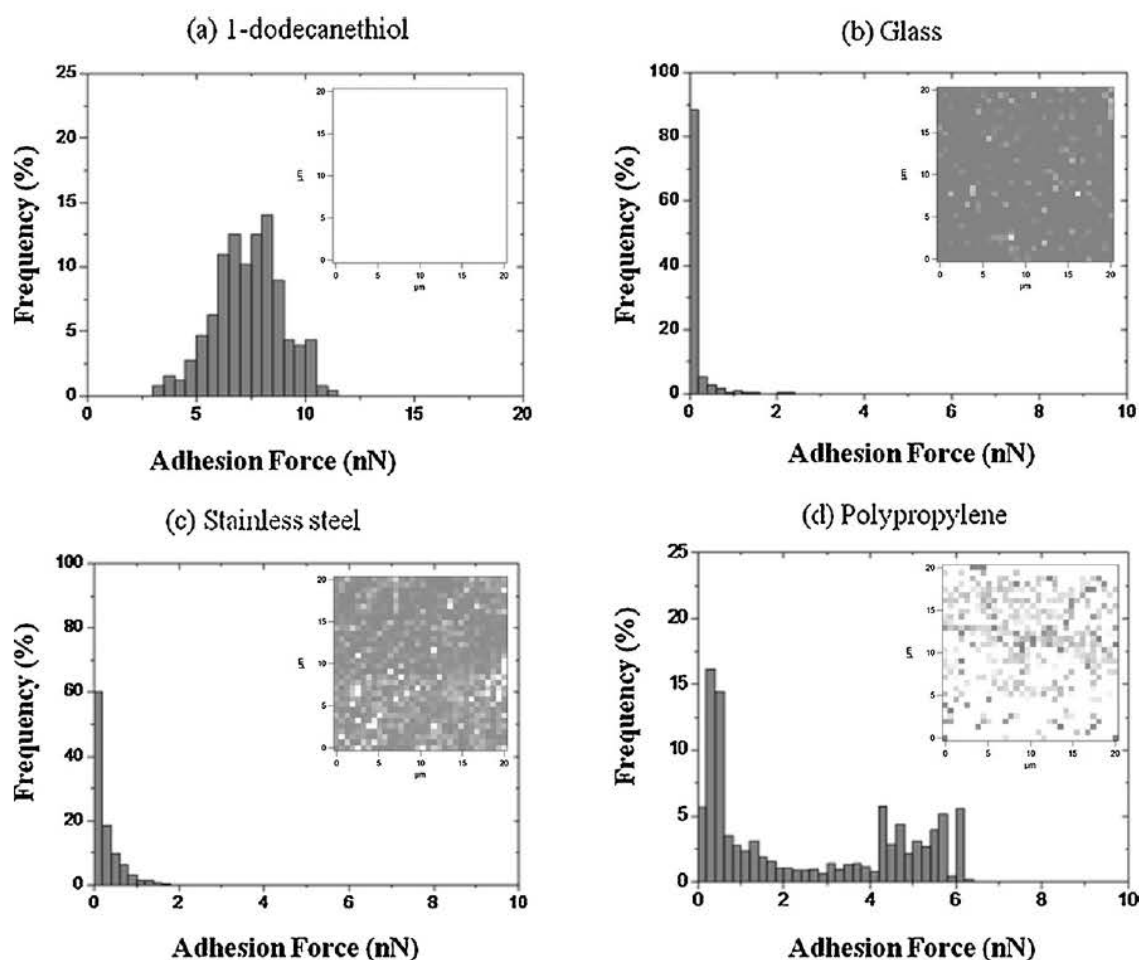


Fig. 2. Statistical distribution of adhesion forces measured by Chemical Force Microscopy (CFM) between a hydrophobic —CH_3 gold-coated AFM-tip and different locations of (a) a 1-dodecanethiol surface, (b) a glass slide surface, (c) a stainless steel surface and (d) a polypropylene surface. The histograms (a), (b), (c) and (d) are constructed from the spatial cartography of the hydrophobic/hydrophilic balance (or adhesion force) as pictured in (a), (b), (c) and (d), respectively. Inset: spatial distribution of adhesion forces measured by Chemical Force Microscopy (CFM) between a hydrophobic —CH_3 gold-coated AFM-tip and each substrate. The darker the pixel, the less hydrophobic is the corresponding spatial area (the scale of the associated adhesion force is indicated by the histogram).

were replicated according to the procedure ISO 10705-1 [32] using *Escherichia coli* Hfr K12 (ATCC 23631) as host cells without the chloroform lysis step. After replication, the suspensions of phages were centrifugated (Beckman (Fullerton, CA) model J2-22; 27,000 g; 60 min; 4 °C) and the supernatant filtered using a 0.22 μm membrane (Millex®-GP Millipore). The suspension was then purified by dialysis (100 kDa molecular weight cutoff, Spectrum (Gadena, CA Spectrum Labs), first against de-ionized water for 14 h, and then against 1 mM NaNO_3 at pH 6.7 for 14 h. In a final stage, the phage suspension was further filtered using 0.22 μm membrane and stored at 4 °C prior to any measurement. The viral concentrations obtained following the above protocol were in the range 10^{10} to 10^{11} PFU ml^{-1} .

2.4. Measurements of virus size and electrophoretic mobility

Prior to virus size and electrokinetic measurements, phage suspensions were filtered in order to eliminate the possible presence of large aggregates (of size larger than 0.22 μm). The sensitivity of the apparatus used for the measurements requires working with concentrations of viruses above 10^9 PFU ml^{-1} . Phage electrophoretic mobility was measured as a function of ionic strength (1 to 350 mM NaNO_3) at pH 7 by laser Doppler electrophoresis also known as phase analysis light scattering. Sizes were measured under the

same conditions. Experiments were carried out as detailed elsewhere [11,12]. For a given salt concentration, measurements were recorded three times.

2.5. Adhesion experiments

The experiments were performed under static conditions on 4 deposition surfaces that differ according to roughness and hydrophobic/hydrophilic balance namely: glass surface (Borosilicate, VWR), stainless steel (SMIO, Fougères, France; quality 316 L), polypropylene (SCIENTIX, Fougères, France) and 1-dodecanethiol surface. Prior to measurement, we evaluated the optimal conditions leading to maximum amount of adhered MS2 viruses on hydrophobic deposition substrate in the absence of bulk phage aggregation. For that purpose, the adhesion of viruses onto 1-dodecanethiol surface was monitored with different phage concentrations in the suspension and under different conditions in terms of contact time between virus suspension and deposition surface (Appendix A Figs. A and B). The conditions corresponding to bulk phage aggregation were defined *via* size measurements in the pH range 2–7 in 1 mM and 100 mM NaNO_3 solutions (Appendix A, Fig. C). Following these preliminary results, virus adhesion experiments discussed below were then carried out at pH 7 adopting a bulk phage concentration of 10^6 PFU ml^{-1} and a virus suspension/deposition surface contact

time of 3 hours. These conditions further ensure the absence of bulk phage aggregation that could impair discussion of the adhesion results.

Prior to the adhesion experiments, the deposition surfaces were immersed for 10 minutes in 1 mM or 100 mM NaNO₃ solution at pH 7 ± 0.2. Deposition substrates were then brought in contact with viral suspensions. After a contact time of 3 hours, the substrates were washed twice for 10 min in 1 mM or 100 mM NaNO₃ solution at pH 7 ± 0.2 in order to remove phages that were only weakly attached to the deposition surface.

We followed two different procedures for quantifying the amount of viruses adhered onto the deposition substrates. First, 1 ml of bacteriophage suspension was taken before and after the 3 h contact with the deposition substrate. The decrease in phage concentration, as measured *via* Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), allows an indirect evaluation of the number of phages adhered onto the surface. In a second procedure, the evaluation of the amount of adhered phages was performed *via* phage RNA extraction from 1 ml suspension (before and after the 3 h contact with the deposition substrate) and from the deposition substrate. For this purpose, suspension was mixed for 15 min with 3 ml lysis buffer (QIA amp[®] viral RNA Mini kit (250) Cat. No. 52906) and deposition substrate exposed for 15 min to 4 ml lysis buffer. The extraction procedure conformed to manufacturer's instructions and 100 µl of RNA eluted in TE buffer was collected and immediately stored at -80 °C. In the two above situations, F-specific RNA phages were amplified with genogroup-specific RT-PCR primers and probes as detailed elsewhere [33]. The detection limit is *ca.* 1 to 10 equivalent PFU per PCR reaction for the three phages used in this study. All amplifications were performed on Abi Prism Sequence Detector 7700 (Applied Biosystems). RNAs extracted from MS2, GA and Qβ phages were used as positive controls, while RNase-DNase-free water was used as a negative control during reverse transcription (RT) and PCRs. Following RT-PCR amplification of a sample containing the bacteriophages suspension used in adhesion experiments, the obtained Ct value can be related to a phage quantity by means of calibration curve. The phage adhesion to a given substrate was then expressed in number of phages normalized with respect to substrate surface area (*i.e.* in equivalent PFU cm⁻²). The mean values and standard deviation of virus adhesion data were evaluated for the three phages by applying one-way ANOVA statistical test with a 0.05 significance level in order to estimate whether or not differences in virus adhesion on the deposition substrates were significant.

3. Results and discussion

3.1. Surface roughness and hydrophobic/hydrophilic balance of the deposition substrates

The hydrophobic/hydrophilic balances over the surface area of the deposition substrates considered in this work are displayed in Fig. 2. This balance is expressed in terms of adhesion force which may be easily converted into an equivalent -CH₃ surface fraction *via* the use of the calibration data (Fig. 1). According to the scale depicted in Fig. 2, the larger the number of white spots, the larger the number of hydrophobic domains. Results of Fig. 2a highlight that 1-dodecanethiol surface may be qualified as purely hydrophobic, with an homogeneous mapping of adhesion forces of mean value $\sim 7.44 \pm 1.53$ nN, which corresponds to $\sim 100\%$ -CH₃ surface fraction (Fig. 1). Glass substrate exhibits quasi-exclusively hydrophilic domains (Fig. 2b) with a low mean adhesion force of *ca.* 0.1 ± 0.03 nN corresponding to $\sim 15\%$ -CH₃ surface fraction (Fig. 1). Quantitatively, the mean adhesion force obtained for the stainless steel surface is

0.7 ± 0.1 nN (Fig. 2c) ($\sim 20\%$ equivalent -CH₃ surface fraction, Fig. 1) approaching that for glass. A bimodal distribution for the adhesion force distribution over the polypropylene surface is observed with maxima at 0.39 ± 0.03 nN and 5.08 ± 1.17 nN ($\sim 70\%$ equivalent -CH₃ surface fraction), which reflects the concomitant presence of both hydrophilic and hydrophobic domains (Figs. 1 and 2d). The above elements lead to the following hydrophobicity sequence: glass surface $\leq$ stainless steel surface $\ll$ polypropylene surface $<$ 1-dodecanethiol gold-coated surfaces with the symbol ' $<$ ' meaning 'less hydrophobic than'.

The root mean square surface roughness of the different deposition substrates was addressed using atomic force microscopy measurements in contact mode (Fig. 3). Basically, glass substrate and 1-dodecanethiol gold-coated surface exhibit a flat profile with low RMS (~ 5 nm) while stainless is very rough with pronounced depressions and asperities (RMS ~ 250 nm) in line with existing data from the literature [6,34]. This high roughness of stainless steel increases the overall surface area available for virus adhesion by $\sim 13\%$ as determined using Asylum Research-Igor Pro analysis software. As far as the polypropylene substrate is concerned, strips on the surface may be observed and the average RMS is ~ 25 nm, which increases the total surface area by $\sim 0.70\%$. In conclusion, we have the following sequence in surface roughness: glass surface $\sim$ 1-dodecanethiol gold-coated surface $<$ polypropylene surface $\ll$ stainless steel surface with the symbol ' $<$ ' meaning 'less rough than'.

3.2. Evaluation of the hydrophobic/hydrophilic balance of phages

To classify the bacteriophages considered here according to their degree of hydrophobicity we performed adhesion experiments with the flat hydrophobic 1-dodecanethiol gold-coated surface for the 100 mM salt concentration condition (Fig. 4). The adhesion data show that the largest phage surface concentration on 1-dodecanethiol gold-coated surface is obtained for GA ($10^{4.5}$ equivalent PFU cm⁻²), followed by Qβ ($10^{3.6}$ equivalent PFU cm⁻²) and MS2 (10^3 equivalent PFU cm⁻²) with the difference between these values being significant ($p < 0.05$). This leads us to propose the following hydrophobicity sequence GA $>$ Qβ $>$ MS2 (with ' $>$ ' meaning 'more hydrophobic than'). These results conform with those of Langlet et al. [3]. Indeed, these authors observed that GA bacteriophages systematically form aggregates in the pH range 2–7 for NaNO₃ electrolyte concentrations varying between 1 mM and 100 mM, while Qβ suspensions were found to be unstable against aggregation only in 100 mM salt concentration for the same range of pH values. Moreover, previous measurement *versus* pH revealed that in 1 mM or 100 mM NaNO₃ electrolyte solutions at pH 7, all phages are in isolated state (Appendix A, Fig. C). To go further, the stability of MS2, Qβ and GA suspensions with respect to aggregation was addressed from size measurements performed in various electrolyte concentrations (Fig. 5). These results are fully consistent with the indirect evaluation of respective degree of hydrophobicity for MS2, GA and Qβ by Langlet et al. [3] through these investigators observed GA and Qβ aggregation under slightly different ionic strength conditions than those given in Fig. 5.

3.3. Phages adhesion onto the various deposition substrates

3.3.1. Impact of hydrophobic interactions on virus adhesion capacity

Results for the adhesion of MS2, GA and Qβ phages onto the substrates are reported in Fig. 6 (100 mM NaNO₃ solution) where the impact of electrostatics is least significant. For a given deposition substrate, the surface concentration of adhered phages follows systematically the previously determined hydrophobicity sequence GA $>$ Qβ $>$ MS2. These results confirm that differences in phage

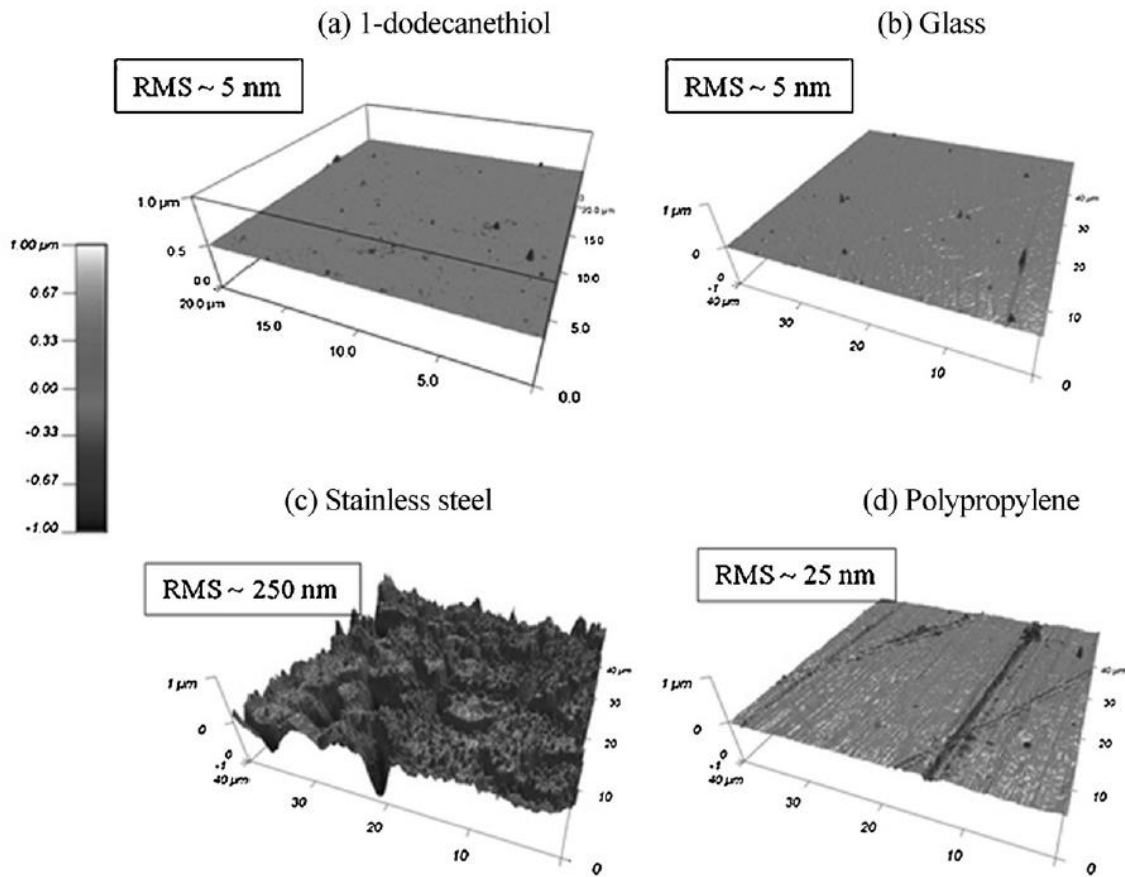


Fig. 3. Tridimensional deposition substrate topography obtained by AFM in contact mode. (a) Typical 3-D height images of (a) gold-coated surface functionalized with 1-dodecanethiol solution (hydrophobic substrate), (b) glass slide sample surface, (c) stainless steel sample surface and (d) polypropylene sample surface. Mapping performed in Milli-Q water at room temperature.

interfacial properties clearly lead to distinct adhesion capacities regardless of the nature of the substrate. Despite the significantly different surface roughness of the various deposition surfaces, the hydrophobic character of the phage seems to be the key determining factor that controls its adhesion capacity under high ionic strength conditions where virus/surface electrostatic interactions are least significant. A parallel may be drawn with the numerous literature data available on bacterial adhesion. In particular, Liu et al.

[35] showed that hydrophobicity of bacterial cell envelopes favors cell adhesion onto *both* hydrophobic and hydrophilic surfaces.

A closer inspection of Fig. 6 reveals that the hydrophobic/hydrophilic balance of the substrate itself is important in

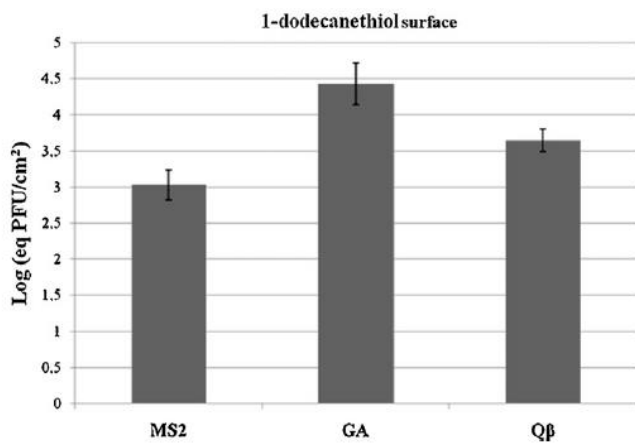


Fig. 4. Adhesion of MS2, GA and Q β bacteriophages on 1-dodecanethiol surface. Initial bulk phages concentration: 10^6 PFU ml⁻¹; 100 mM NaNO₃ solution; pH 7. Contact time between deposition surface and phages suspension: 3 h.

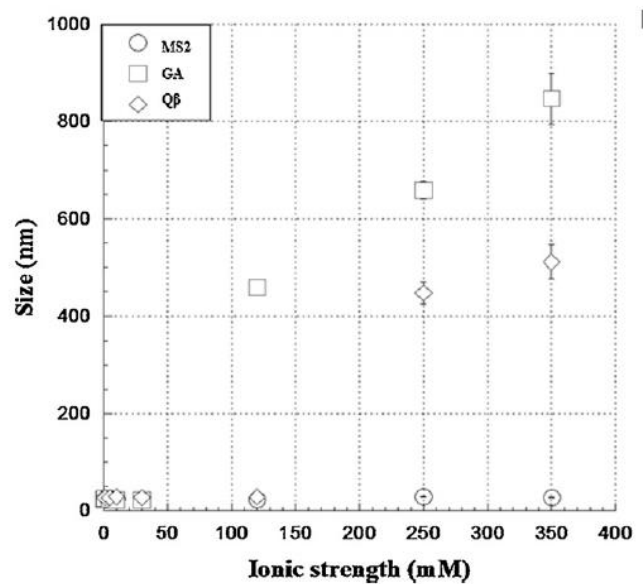


Fig. 5. Size (diameter) measurements for MS2, GA and Q β as a function of ionic strength at pH 7.

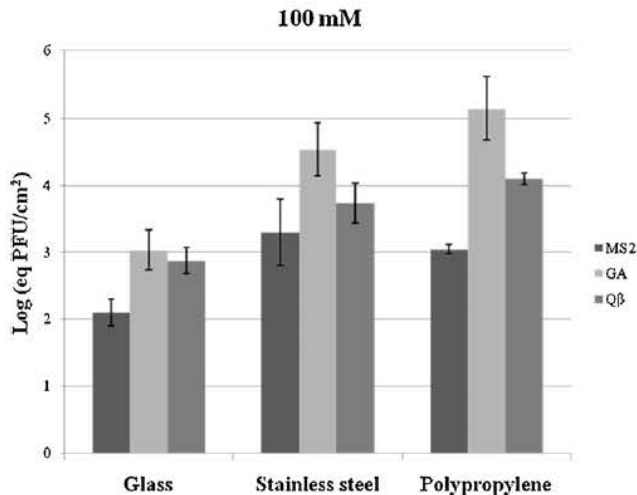


Fig. 6. Adhesion of MS2, GA and Q β bacteriophages on different deposition substrates (indicated). Initial bulk phages concentration: 10^6 PFU ml $^{-1}$; 100 mM NaNO $_3$ solution; pH 7. Contact time between deposition surface and phages suspension: 3 h.

controlling the surface concentration of adhered phages. Indeed, the adhesion of a given phage is most significant on hydrophobic polypropylene and is least pronounced for hydrophilic glass with differences that may reach up to 2 log units in surface concentration of adhered GA and 1.2, 0.9 log unit for that of Q β and MS2 phages, respectively.

3.3.2. Impact of deposition substrate roughness on phage adhesion

Within experimental error, the adhesion of a given phage is weakest on low RMS roughness surfaces (glass), and most significant on polypropylene and stainless steel substrates (Fig. 6). In addition, we observe that the extent of adhesion of a given phage on the large RMS stainless steel surface is similar in magnitude to that for flat and very hydrophobic 1-dodecanethiol gold-coated surface (Figs. 4 and 6). Indeed, the surface concentration of the most hydrophobic phages GA and Q β is ~ 0.5 log unit larger ($p < 0.05$) for polypropylene (RMS ~ 25 nm, $\sim 70\%$ CH $_3$ equivalent surface fraction) than for 1-dodecanethiol gold-coated surface (RMS ~ 5 nm, $\sim 100\%$ CH $_3$ equivalent surface fraction) while that for the hydrophilic phage MS2 remains similar for both types of surfaces ($p > 0.05$) (Figs. 4 and 6). The important role of surface roughness is further confirmed by phage adhesion data collected for surfaces of a similar but low hydrophobicity (glass and stainless steel, 15% and 20% equivalent $-\text{CH}_3$ surface fraction, respectively) but significantly different RMS (~ 5 nm and ~ 250 nm respectively) (Fig. 6). The surface concentration of adhered Q β , GA or MS2 is 0.9–1.5 log units larger on stainless steel than on glass surfaces ($p < 0.05$). These various results indicate that when electrostatic virus/substrate interactions are screened, phage adhesion onto abiotic surfaces of similar hydrophobic/hydrophilic balance is significantly enhanced with increasing deposition surface roughness. It should be emphasized that the only increase in deposition surface area that is available for viruses approaching the target substrate is likely not sufficient to explain variations in surface adhered phage concentrations between stainless steel and glass. Indeed, in this case, a constant ratio between the surface concentration of adhered viruses on glass and that on stainless steel would be expected. This is obviously not true as adhesion of MS2, Q β , GA on stainless steel is larger than that on glass by a factor 12, 8 and 32 respectively. It should be remembered that the RMS of these two substrates only lead to a 0.7% and 13% increase in total surface area for glass and stainless steel, respectively. Such non-linearity has been

investigated extensively by theoretical analysis in the case of electrostatic interactions between colloidal particles and rough deposition substrate exhibiting pronounced depression and/or asperities [5]. To the best of our knowledge, the impact of surface roughness on the adhesion of viruses has never been addressed on a quantitative level along the lines set forth in this study. However, numerous studies dealing with effects of deposition substrate roughness on adhesion of bacteria are available in the literature and much controversy remains with regard to key effects. Some authors argue that the roughness has an impact on adhesion [6,7,9] while others did not observe any significant effects [8]. According to Katainen et al. [10], the adhesion of particles smaller than or similar in size to the characteristic length scale of the deposition surface asperities mainly depends on size and shape of the asperities while for larger particles, the particle size impacts adhesion. In line with this study, our data collected on glass (RMS ~ 25 nm) and stainless steel surfaces (RMS ~ 250 nm) (of similar hydrophobic/hydrophilic balance) suggest that size asperities in the range 25 nm to 250 nm do affect the adhesion of phages (~ 25 nm in diameter).

3.3.3. Impact of solution ionic strength on phage adhesion

The analysis of the effects of electrostatic interactions between virus and deposition surface on virus adhesion capacity have been the subject of many case studies [17,23,36]. In this section, we show that the sole consideration of electrostatics for explaining adhesion results between virus and surface is not sufficient even at low electrolyte concentrations. To do so, we considered three bacteriophages with similar IEP, and then qualitatively assessed their respective electrostatic features from electrokinetic data making use of the concept of soft multilayered particles detailed in previous work [11]. The effect of NaNO $_3$ electrolyte concentration on the phages electrophoretic mobility is displayed in Fig. 7 (pH 7). The results show that the three phages display similar electrohydrodynamic properties, i.e., in terms of volume charge density (as reflected by the slope of the mobility *versus* logarithm of ionic strength in the low electrolyte concentration regime) and in terms

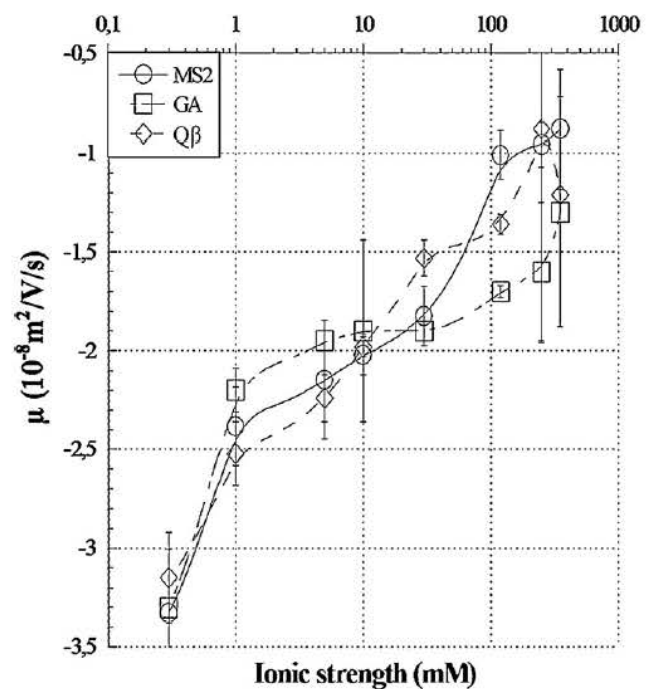


Fig. 7. Electrophoretic mobility of MS2, GA and Q β bacteriophages as a function of ionic strength at pH 7. The solid and dotted lines are only guides to the eye.

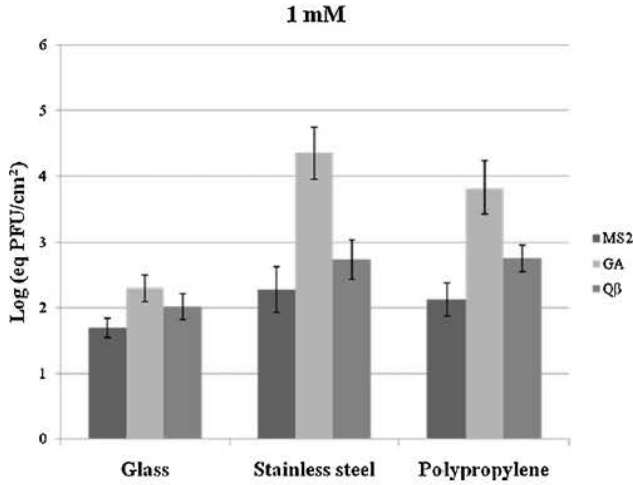


Fig. 8. Adhesion of MS2, GA and Q β bacteriophages on different deposition substrates (indicated). Initial bulk phages concentration: 10^6 PFU ml⁻¹; 1 mM NaNO₃ solution; pH 7. Contact time between deposition surface and phages suspension: 3 h.

of hydrodynamic softness (as reflected by the non-zero value of mobility at large ionic strength). Subsequently, we investigated the adhesion of the three viruses in 1 mM NaNO₃ solution at pH 7 on the different deposition surfaces (Fig. 8). Under the chosen adhesion experimental conditions, all F-specific RNA phages are negatively charged (Fig. 8) and so are the deposition substrates, as adjudged from available data in the literature [37–39]. As intuitively expected, for given phage and deposition substrate, adhesion decreases with decreasing electrolyte concentration as a result of an increase in the repulsive energy barrier that viruses must overcome to come into contact with the deposition substrate. A noticeable exception is the case of GA phage on the stainless steel surface where the number of adhered phages is similar under 1 mM and 100 mM electrolyte conditions. The most pronounced decrease in phage surface concentration, as compared to high ionic strength conditions, is obtained for the adhesion of GA and Q β on polypropylene, *i.e.* for systems where hydrophobic interactions play a significant role at large electrolyte concentrations. For these systems, the introduction of electrostatic repulsive interactions between virus and substrate with decreasing solution ionic strength leads to a significant increase in the magnitude of the overall virus/surface interaction energy. Nonetheless, working under low ionic strength conditions does not exclude in any way the significant role played by hydrophobic interactions in the virus adhesion process. Indeed, for a given substrate, the respective magnitude of surface concentration of adhered phages in 1 mM electrolyte concentration systematically follows the hydrophobic/hydrophilic balance sequence determined for the three phages. Along the same lines, it is found that the adhesion of a given phage is stronger on polypropylene than on glass. In a similar manner to phage adhesion for a 100 mM salt concentration, phage deposition onto hydrophilic and relatively flat glass surfaces is least important in 1 mM NaNO₃ as compared to that for polypropylene and stainless steel surfaces. We further observe that, unlike results depicted in Fig. 6 for 100 mM salt concentration, the surface concentration of GA phages under the 1 mM adhesion condition is lower on polypropylene as compared to that on stainless steel. We thus conclude that the surface deposition roughness is still a significant factor in phage adhesion in 1 mM electrolyte despite the increased repulsive virus/surface interaction energy. This result further underpins the conclusion that the dimensionless factor κd (with κ the reciprocal Debye length and d the characteristic surface roughness length scale) is important for appreciating the role

of surface topography on phage adhesion at various electrolyte concentrations. Stated otherwise, the magnitude of the impact of surface roughness on phage adhesion changes with solution ionic strength *via* the interplay between the characteristic distances $1/\kappa$ and d . In qualitative agreement with this observation, theory [5] suggests that the larger the Debye length compared to the roughness length scale (*i.e.* the lower κd), the least significant is the effect of surface roughness on electrostatic interaction energy. This is in line with the adhesion data for stainless steel surfaces: for 1 mM and 100 mM electrolyte concentration ($1/\kappa \sim 10$ nm and 1 nm, respectively), surface roughness remains much larger than the Debye length, which implies a significant role of surface topography on phage adhesion in both 1 mM and 100 mM salt concentration conditions.

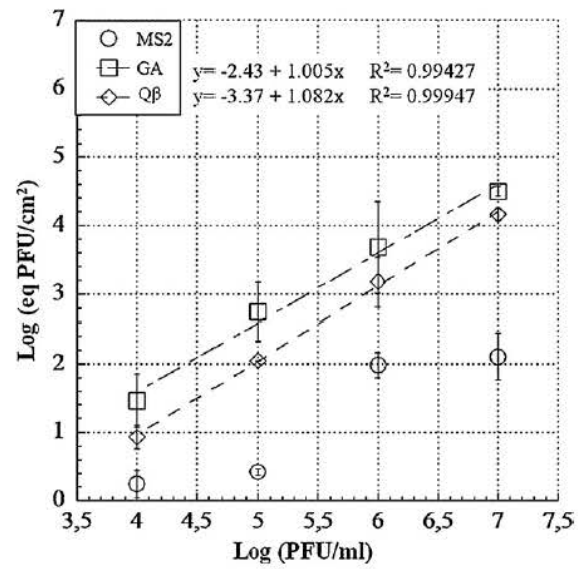


Fig. A. Adhesion of MS2, GA and Q β bacteriophages as a function of phage initial concentration expressed in PFU ml⁻¹. The contact time between deposition substrate and phage suspension is 18 h. Adhesion experiments are performed in 100 mM NaNO₃ solution at pH 7.

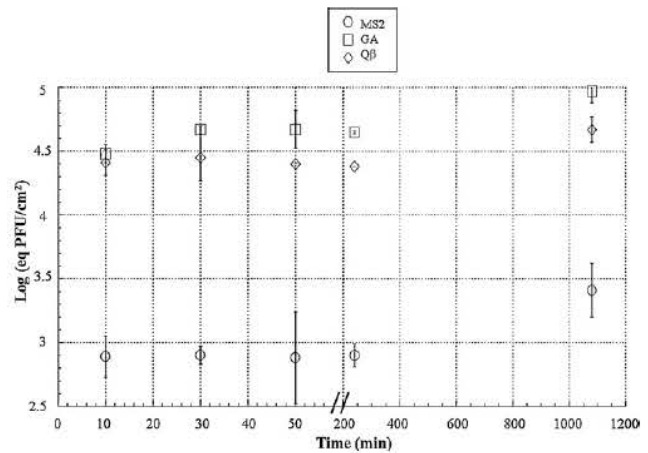


Fig. B. Adhesion of MS2, GA and Q β bacteriophages as a function of contact time between deposition substrate and phage solution. The initial bulk phage concentration is 10^6 PFU ml⁻¹. Adhesion experiments are performed in a 100 mM NaNO₃ solution at pH 7.

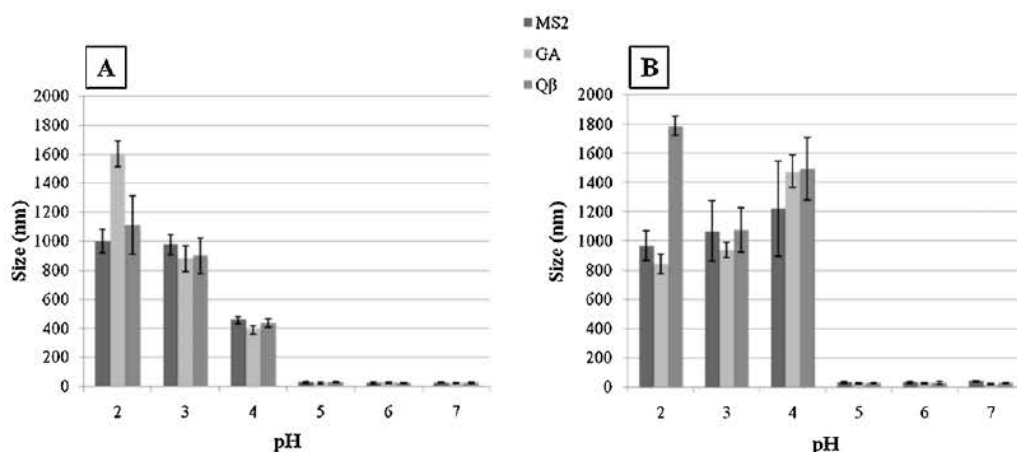


Fig. C. Size (diameter) measurements for MS2, GA and Q β phages as a function of pH (indicated) in (A) 1 mM and (B) 100 mM NaNO₃ solutions.

4. Conclusions

The results reported in this work demonstrate the complex interplay between deposition substrate roughness, hydrophobic and electrostatic virus/deposition surface interactions in governing virus adhesion capacity as a function of salt concentration in the medium. In that respect, the study underlines the conclusion that a full understanding of the adhesion properties of viruses onto a given surface necessarily requires analysis beyond the classical DLVO theory framework that is based on the combination of van der Waals and electrostatic interaction forces in a manner that is strictly applicable for hard (impermeable) particles and flat deposition substrates. Instead, the complexity of the systems necessitates taking into account (i) the hydrophobicity of the viruses, and (ii) a nanoscale analysis of the hydrophobic/hydrophilic balance and surface features of the deposition substrate considered. Full integration of these parameters is mandatory to explain the fate of bacteriophages in natural aquatic media and their propensity to adhere onto substrates or to be removed from water *via* sorption on filtration membranes. For the sake of illustration, MS2, GA and Q β phages with similar electrostatic charges but different hydrophilic/hydrophobic balance could possibly be at the origin of macroscopic differences observed in wastewater treatment efficiency with regard to phage elimination. Indeed, Boudaud et al. [40] showed that the removal of MS2, GA and Q β phages in treated drinking water *via* coagulation-flocculation and ultrafiltration processes followed the virus hydrophobicity sequence obtained here. GA phages were removed to a lesser extent than MS2 phages (<2.2 log unit decrease in virus concentration for the former and >4 log unit decrease for the latter). Obviously, further work is required to quantitatively account for macroscopic phage elimination data and the processes controlling the intricate interactions between viruses and surfaces at a nano- and molecular scale.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Program grant ANR-07-PNRA-008 (ADHERESIST) from the ANR 554 (Agence Nationale de la Recherche).

Appendix A.

Fig. A
Fig. B
Fig. C

References

- [1] K. Vålegård, L. Liljas, K. Fridborg, T. Unge, Structure determination of the bacteriophage MS2, *Acta. Crystallogr. Sect. B: Struct. Sci.* 47 (1991) 949–960.
- [2] K. Vålegård, K. Fridborg, L. Liljas, Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage Q β , *Acta. Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 50 (1994) 105–109.
- [3] J. Langlet, F. Gaboriaud, J.F.L. Duval, C. Gantzer, Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes, *Water Res.* 42 (2008) 2769–2777.
- [4] C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball, *Virus taxonomy*, in: *Classification and Nomenclature of Viruses*, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Academic Press, London, 2005.
- [5] J.F.L. Duval, F.A. Leermakers, H.P. van Leeuwen, Electrostatic interactions between double layers: influence of surface roughness, regulation, and chemical heterogeneities, *Langmuir* 20 (2004) 5052–5065.
- [6] S.H. Flint, J.D. Brooks, P.J. Bremer, Properties of the stainless steel term substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci, *J. Food Eng.* 43 (2000) 235–242.
- [7] G.M. Bruinsma, M. Rustema-Abbing, J. de Vries, H.J. Busscher, M.L. van der Linden, J.M. Hooymans, H.C. van der Mei, Multiple surface properties of worn RGP lenses and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biomaterials* 24 (2003) 1663–1670.
- [8] L.R. Hilbert, D. Bagge-Ravn, J. Kold, L. Gram, Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 52 (2003) 175–185.
- [9] K.M. Charman, P. Fernandez, Z. Loewy, A.M. Middleton, Attachment of *Streptococcus oralis* on acrylic substrates of varying roughness, *Lett. Appl. Microbiol.* 48 (2009) 472–477.
- [10] J. Katainen, M. Paajanen, E. Ahtola, V. Pore, J. Lahtinen, Adhesion as an interplay between particle size and surface roughness, *J. Colloid Interface Sci.* 304 (2006) 524–529.
- [11] J. Langlet, F. Gaboriaud, C. Gantzer, J.F.L. Duval, Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2, *Biophys. J.* 94 (2008) 3293–3312.
- [12] C. Dika, J.F.L. Duval, H.M. Ly-Chatain, C. Merlin, C. Gantzer, Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles, *Appl. Environ. Microbiol.* 14 (2011) 4939–4948.
- [13] R. Aronino, C. Dlugy, E. Arkhangelsky, S. Shandalov, G. Oron, A. Brenner, V. Gitis, Removal of viruses from surface water and secondary effluents by sand filtration, *Water Res.* 43 (2009) 87–96.
- [14] J.A. Redman, S. Grant, T.M. Olson, J.M. Adkins, J.L. Jackson, M.S. Castillo, W.A. Yanko, Physicochemical mechanisms responsible for the filtration and mobilization of a filamentous bacteriophage in quartz sand, *Water Res.* 33 (1999) 43–52.
- [15] J.F. Schijven, M. Hassanizadeh, Removal of viruses by soil passage: overview of modeling, processes, and parameters, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 30 (2000) 49–127.
- [16] J. Langlet, L. Ogorzaly, J.C. Schrotter, C. Machinal, F. Gaboriaud, J.F.L. Duval, C. Gantzer, Efficiency of MS2 phage and Q β phage removal by membrane filtration in water treatment: applicability of real-time RT-PCR method, *J. Membr. Sci.* 326 (2009) 111–116.
- [17] S.L. Penrod, T.M. Olson, S.B. Grant, Deposition kinetics of two viruses in packed beds of quartz granular media, *Langmuir* 12 (1996) 5576–5587.
- [18] B. Michen, T. Graule, Isoelectric points of viruses, *J. Appl. Microbiol.* 109 (2010) 388–397.

- [19] J.F.L. Duval, J. Merlin, P.A.L. Narayana, Electrostatic interactions between diffuse soft multi-layered (bio)particles: beyond Debye–Huckel approximation and Deryagin formulation, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 1037–1053.
- [20] J.F.L. Duval, F. Gaboriaud, Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 15 (2010) 184–195.
- [21] J. Lukasik, T.M. Scott, D. Andryshak, S.R. Farrah, Influence of salts on virus adsorption to microporous filters, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 2914–2920.
- [22] P.A. Shields, S.R. Farrah, Characterization of virus adsorption by using DEAE-Sephrose and Octyl-Sephrosedagger, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3965–3968.
- [23] J. Zhuang, Y. Jin, Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: effects of ionic strength and composition, *J. Contam. Hydrol.* 60 (2003) 193–209.
- [24] C.D. Lytle, L.B. Routson, Minimized virus binding for tests of barrier materials, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 643–649.
- [25] B. Kos, J. Susković, S. Vuković, M. Simpraga, J. Frece, S. Matosić, Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *J. Appl. Microbiol.* 94 (2003) 981–987.
- [26] M.W. Wolff, C. Siewert, S.P. Hansen, R. Faber, U. Reichl, Purification of cell culture-derived modified vaccinia ankara virus by pseudo-affinity membrane adsorbers and hydrophobic interaction chromatography, *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 312–320.
- [27] H.J. Busscher, B. van de Belt-Gritter, H.C. van der Mei, Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets, *Colloids Surf. B* 5 (1995) 111–116.
- [28] F. Ahimou, M. Paquot, P. Jacques, P. Thonart, P.G. Rouxhet, Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*, *J. Microbiol. Methods* 45 (2001) 119–126.
- [29] R. Attinti, J. Wei, K. Kniel, J.T. Sims, Y. Jin, Virus (MS2, phiX174, and Aichi) attachment on sand measured by atomic force microscopy and their transport through sand columns, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 426–432.
- [30] D. Alsteens, E. Dague, P.G. Rouxhet, A.R. Baulard, Y.F. Dufrène, Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM, *Langmuir* 23 (2007) 11977–11979.
- [31] P. Polyakov, C. Soussen, J. Duan, J.F.L. Duval, D. Brie, G. Francius, Automated force volume image processing for biological samples, *PLoS ONE* 6 (2011) e18887.
- [32] ISO10705-1, Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: enumeration of F-specific RNA bacteriophages, International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland, 1995.
- [33] L. Ogorzaly, C. Gantzer, Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater, *J. Virol. Methods* 138 (2006) 131–139.
- [34] C.K. Kang, Y.S. Lee, The surface modification of stainless steel and the correlation between the surface properties and protein adsorption, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 18 (2007) 1389–1398.
- [35] Y. Liu, S.F. Yang, Y. Li, H. Xu, L. Qin, J.H. Tay, The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment, *J. Biotechnol.* 110 (2004) 251–256.
- [36] J.A. Redman, S.B. Grant, T.M. Olson, M.E. Hardy, M.K. Estes, Filtration of recombinant norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 3378–3383.
- [37] S. Fukuzaki, H. Urano, K. Nagata, Adsorption of protein onto stainless-steel surfaces, *J. Ferment. Bioeng.* 80 (1995) 6–11.
- [38] Y.H. Miao, L.E. Helseth, Adsorption of bovine serum albumin on polyelectrolyte-coated glass substrates: applications to colloidal lithography, *Colloids Surf. B* 66 (2008) 299–303.
- [39] D. Stawski, C. Bellmann, Electrokinetic properties of polypropylene textile fabrics containing deposited layers of polyelectrolytes, *Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 345 (2009) 191–194.
- [40] N. Boudaud, C. Machinal, F. David, A. Fréval-Le Bourdonnec, J. Jossent, F. Bakanga, C. Arnal, M.P. Jaffrezic, S. Oberti, C. Gantzer, Removal of MS2, Q β and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale, *Water Res.* 46 (2012) 2651–2664.

II. Relation entre les propriétés interfaciales des bactériophages MS2, Phi X 174 et PRD1 et les capacités d'adhésion: Concept de particules molles à multicouches.

Pour la première fois nous avons étudié les propriétés interfaciales de bactériophages à structures très différentes selon le concept de particules molles à multicouches. On dispose du bactériophage MS2 d'un diamètre de 20-30 nm constitué de sa capsidie protéique, d'un génome à ARNsb d'environ 3500 nucléotides partiellement accolé à la capsidie qui elle possède des pores à sa surface. Le phage Phi X 174 constitué d'une capsidie protéique sans pore et d'un génome à ADNsb circulaire d'environ 5300 nucléotides et enfin le phage PRD1 constitué d'une capsidie protéique, d'une membrane interne enveloppant un génome à ADNdb d'environ 14900 paires de bases.

L'estimation de la charge électrostatique de ces phages désigne le phage MS2 comme étant celui possédant la charge électrostatique effective la plus négative suivi des deux autres phages PRD1 et Phi X 174 étant les moins chargés.

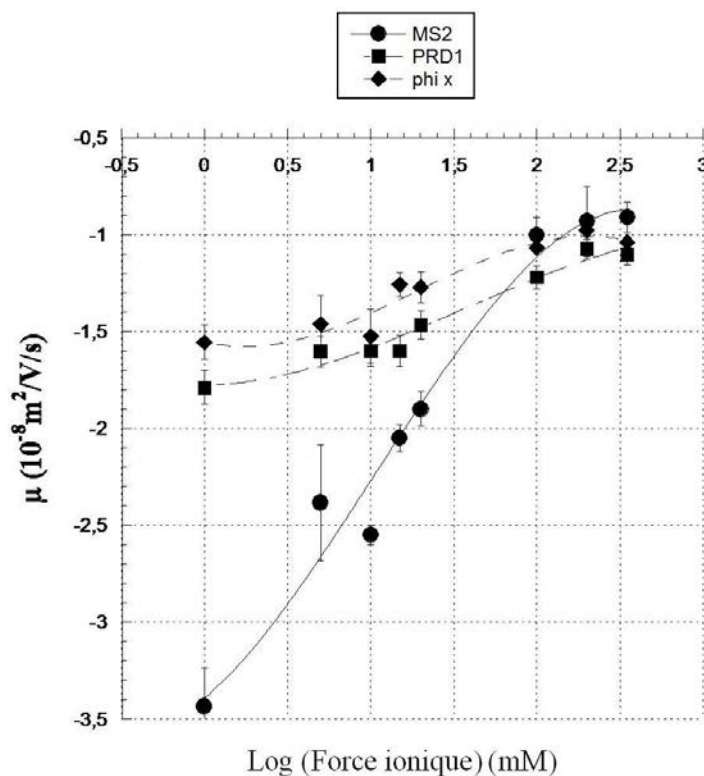


Figure 24. Mobilités électrophorétiques (μ) des bactériophages MS2, Phi X 174 et PRD1 en fonction du logarithme de la force ionique à pH 7. La pente de la courbe reflète le ratio densité de charge interne/densité de charge externe pour chaque phage.

Cette estimation de la charge électrostatique a ensuite été corrélée avec la capacité d'adhésion des phages sur des supports chargés positivement et négativement. Le bactériophage MS2 est bien celui qui adhère le plus sur les surfaces chargées positivement. Ces mesures d'adhésion ont été effectuées à faible force ionique (1 mM NaNO₃) pour favoriser les interactions électrostatiques. Le classement du plus chargé au moins chargé est MS2 > PRD1 > Phi X 174 (Figure 25) permettant d'avoir une information supplémentaire par rapport aux mesures de mobilités électrophorétiques.

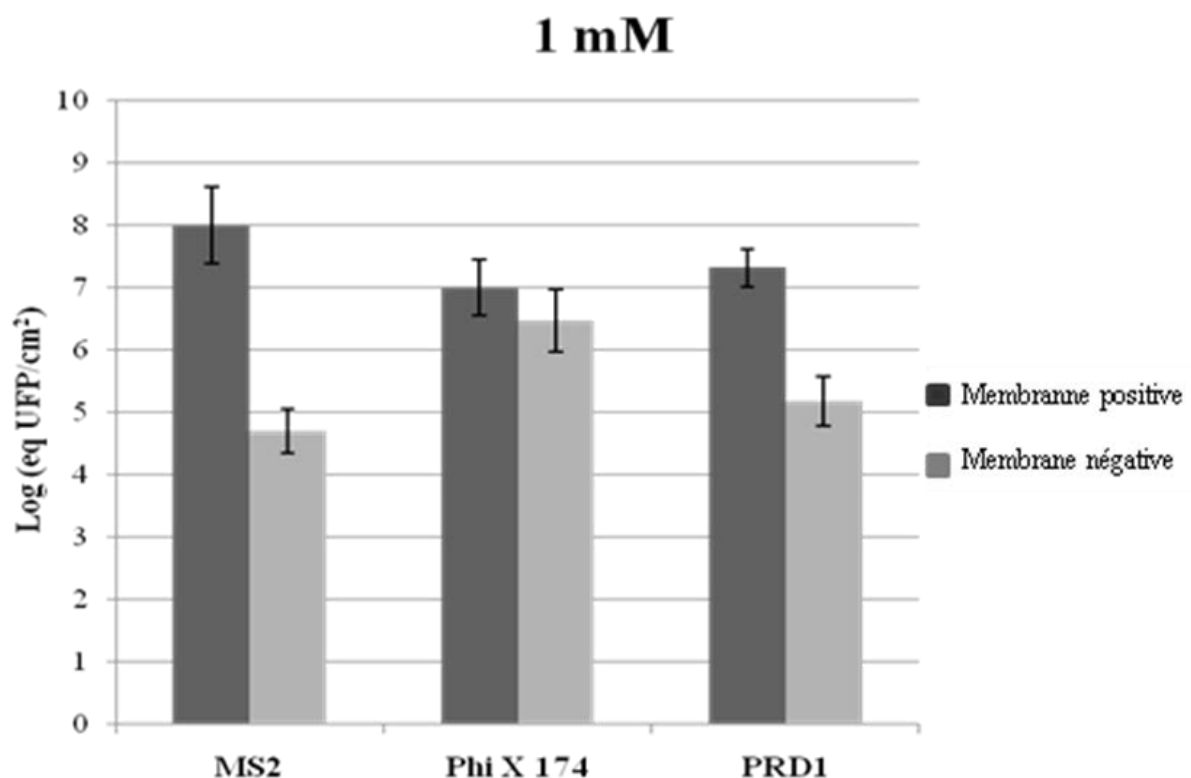


Figure 25. Adhésion des bactériophages MS2, Phi X 174 et PRD1 sur des membranes positives et négatives. Concentration initiale de phages: 10⁶ PFU.ml⁻¹; à 100 mM NaNO₃, pH 7. Le temps de contact entre la surface et les phages est de 3 h.

De la même manière la balance hydrophile/hydrophobe des bactériophages a été évaluée par adhésion sur des supports hydrophile et hydrophobe traduisant une hydrophobicité légèrement supérieure pour le bactériophage PRD1 suivi du phage MS2 et les phages Phi X 174 s'est avéré être le plus hydrophile des trois.

Les résultats obtenus dans cette étude dénoncent notamment une applicabilité limitée de l'évaluation de la charge électrostatique des phages à travers des comparaisons de points isoélectriques. En effet, dans la littérature, les points isoélectriques de ces phages ont des valeurs

variables mais oscillant la plupart du temps entre 3 et 4. Suite à la mesure de la taille des particules en fonction du pH, nous observons une agrégation des trois phages pour des valeurs de $\text{pH} \leq 4$ quelle que soit la force ionique. Ces résultats de profils d'agrégation suggèrent que pour ces trois phages agrégés pour des valeurs de $\text{pH} \leq 4$ ont un point isoélectrique se situant aux alentours de ces valeurs de pH (sans exclure la probabilité de la présence de protéines contaminantes dans le milieu). Rappelons que les valeurs de pI ne donnent qu'une estimation de la charge virale que pour des conditions précises ne permettant ainsi que d'avoir le signe de la charge que porte un virus à un pH donné. L'approche par la notion de particules molles à multicouches malgré le fait qu'elle soit uniquement qualitative suite au manque de plus d'informations structurales caractérisant les phages, permet une classification de ces trois bactériophages en fonction de la charge électrostatique effective qui s'avère être hautement corrélée à la charge négative perçue lors des processus d'adhésion.

On the relationship between interfacial properties and adhesion capacities of MS2, Phi X 174 and PRD1 phages

C. Dika^{1,2}, J.F.L. Duval^{3,4*}, G. Francius^{1,2}, A. Perrin^{1,2} and C. Gantzer^{1,2*}

¹Université de Lorraine, LCPME (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement), UMR 7564, Nancy, F-54000, France.

²CNRS, LCPME, UMR 7564, Nancy, F-54000, France.

³Université de Lorraine, LIEC (Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux), UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France.

⁴CNRS, LIEC, UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy, F-54500, France.

Corresponding authors:

* Christophe Gantzer. E-mail address: christophe.gantzer@univ-lorraine.fr (C. Gantzer)

Tel: +33 3 83 68 22 91. Fax: +33 3 83 68 23 78.

* Jérôme F.L. Duval. E-mail address: jerome.duval@univ-lorraine.fr (J.F.L. Duval)

Tel: +33 3 83 59 62 63. Fax: +33 3 83 59 62 55.

Keywords : Bacteriophage, adhesion, surface properties, hydrophobicity, electrostatics.

Abstract.

MS2, Phi X 174 and PRD1 bacteriophages are used as surrogates to analyze the fate of pathogenic viruses in natural aquatic media. Their interfacial properties are here discussed in connection with their capacity to adhere onto abiotic surfaces of different surface charge and hydrophobicity. These phages exhibit distinct multilayered surface structures: MS2 with a porous outer proteic layer encapsulating a ssRNA genome, Phi X 174 phages with an outer capsid devoid of pore and an internal ssDNA genome, and PRD1 phages with a peripheral capsid supported by an internal membrane and an innermost dsDNA. The electrostatic charge of these phages is evaluated from the dependence of their electrophoretic mobility on electrolyte concentration at neutral pH on the basis of a recent theory for electrokinetics of soft (bio)particles. The contribution of the internal genome to the overall charge of the virus differs

according to its interfacial structure : $\text{Phi X 174} < \text{PRD1} < \text{MS2}$, where ' $<$ ' stands for 'less charged than'. The hydrophobic/hydrophilic balance of the phages is further derived from their adhesion onto model hydrophobic self-assembled mono-layers. The results lead to the sequence $\text{Phi X 174} < \text{MS2} < \text{PRD1}$ where ' $<$ ' means 'less hydrophobic than'. The respective electrostatic and hydrophobic/hydrophilic balance of the phages are then shown to be consistent with their adhesion onto cationic and anionic membranes over a large range of salinity conditions. The methodology demonstrates that commonly adopted isoelectric points of phages are not adequate to understand the relationship between their interfacial properties and adhesion.

1. Introduction

In natural aquatic media, human pathogenic viruses are unable to replicate and may thus be considered as inert bioparticles from a biological point of view. Their surface properties together with the medium composition then become key factors that control their fate and physico-chemical reactivity. For the sake of illustration, the adhesion of phages to suspended colloidal matter or surfaces and their aggregation significantly affect their dissemination in the environment and thereby govern their ability to cross water treatments. This issue led environmental virologists to pay attention to the surface properties of phages, in particular their electrostatic charge and degree of hydrophobicity, in order to understand and possibly optimize their behavior in defined aquatic systems. The typical diameter of pathogenic enteric viruses such as noroviruses, hepatitis A and E viruses, is 20 to 30 nm. Fecal bacteriophages like F-specific RNA phages have a similar size and commonly serve as indicators of water quality. These viruses, which are of prime interest in terms of public health (1, 2), further exhibit a complex chemically-stratified structure with a 2 to 3 nm thick proteic outer layer that encapsulates an internal RNA genome (3).

Viruses interact with their close environment according to *e.g.* non-specific electrostatic and hydrophobic forces (4). The former are long-range forces with as characteristic spatial scale the Debye length that is fixed by the salinity of the medium (~ 10 nm and ~ 1 nm for 1 mM and 100 mM salt concentration, respectively). The sign and magnitude of these electrostatic forces are further controlled by the density of charges carried by the viruses and the target surfaces. Hydrophobic interactions take place at shorter separation distances, and become predominant under conditions where electrostatic forces are weakest, *i.e.* at sufficiently large electrolyte concentrations. The nature of these different colloidal interactions highlights the mandatory

requirement for acquiring knowledge on both the charge and the hydrophobic/hydrophilic balance pertaining to complex viral particles.

The surface charge of viruses is commonly evaluated *via* their zeta-potential determined from electrophoretic mobility measurements (5, 6 7, 8, 9). While such an approach is still widely adopted in the literature (10, 11), it should be realized that the very concept of zeta-potential is physically meaningful for particles that are *stricto sensu* impermeable to water and ions (so-called hard colloids). However, numerous theoretical and experimental studies have now demonstrated that the location *a priori* of a shear plane and the definition of a zeta-potential or a surface charge for complex biosystems like bacteria (12) and viruses (9) have no physical basis. Instead, these bioparticles are paradigms of soft colloids, *i.e.* colloids that are partly consisting of an interfacial (bio)polymeric structure permeable to water and ions and where charges are three-dimensionally distributed (13). Viruses further exhibit a complex chemically-stratified structure with the presence of an internal RNA or DNA compartment encapsulated by an outer proteic layer (multilayered structure). The electrokinetic properties of viruses were shown to be dramatically impacted by the three dimensional distribution of charges from the virus center to the peripheral capsid, and by their hydrodynamic permeability (13, 14, 15, 16). For the sake of example, the electrophoretic mobility of soft particles like viruses reaches a non-zero plateau value at large electrolyte concentrations (typically 100 mM and above) while that of hard colloids tend to zero under similar salinity conditions where particle electrostatic charge is significantly screened by ions in the medium (14).

In line with the inexact hard particle representation for viruses, their adhesion capacity onto charged abiotic surfaces is often apprehended by the sole consideration of their isoelectric point (IEP) (16, 17), defined as the pH value where the electrophoretic mobility is zero. The IEP values of more than 140 viruses have been recently reviewed by Michen and Graule (18) who showed a large discrepancy in IEPs with values ranging between 1.9 and 8.4. Like the zeta-potential, the IEP remains a parameter of limited use for apprehending on a quantitative basis the charge carried by viruses. The first reason is that the classification of adhesion capacity of viruses according to their IEP value is based on experimental data that differ from one study to the other depending on the adopted measurement tool. As an illustration, reported IEP values for Q β and Phi X 174 phages range from 1.9 to 5.3 and from 2.6 to 6.6, respectively (18). The second and perhaps most important reason is that, despite common acceptation, IEP of soft multilayered particles like viruses is not only depending on the protolytic properties of the charged groups located at their outer periphery, but also on the complex physico-chemical

characteristics of the underlying structure, which includes charge distribution within the capsid and the genome, the thickness of the capsid, the size of the genome, the respective permeability of the capsid and that of the genome viral compartment. These fundamentals of electrokinetics of soft multilayered particles like viruses were first introduced by Langlet *et al.* (16) and a strong analogy was recently drawn -*via* theory and experiments- with the electrokinetics of other complex soft multilayered interphases like polyelectrolyte multilayers or lipid bilayers supported by charged polymeric cushion (19, 20). As a consequence, there is no straightforward physical connection between the pH value where mobility of viruses is zero and the very 'surface' charge they carry. At this stage, it may be stated that neither the zeta-potential or the IEP parameter offers a solid basis for adequately correlating the charge of complex soft multilayered viruses with their adhesion capacity onto charged abiotic surfaces. Instead, analyzing the dependence of virus electrophoretic mobility on solution ionic strength with use of adequate formalism where the zeta-potential picture is abandoned (15, 16, 21), seems to offer a better alternative for defining the searched electrostatic characteristics of viral particles (21). So far, such a classification of viruses charge on the basis of adequate electrokinetic theory for soft bioparticles is missing.

At sufficiently high ionic strengths, virus electrostatic charges are screened (22) and hydrophobic interactions significantly favor viral adhesion onto surfaces (4, 23). An evaluation of the magnitude of these interactions requires the measurement of the hydrophobicity degree of the viral interfaces. Most of the methods used for that purpose consist in estimating the affinity of the viruses for a solvent of given polarity (MATS tests) or for a given surface (hydrophobic interactions chromatography, HIC, (24, 25)). Authors have criticized these approaches in the past. In particular, Busscher *et al.* (26) and Ahimou *et al.* (27) argued that the majority of solvents used in MATS tests as well as other reference surfaces employed in HIC, exhibit a finite charge and may thus electrostatically interact with viruses. Other authors (22, 23) resorted to the use of commercially available membranes to characterize the hydrophobicity of viruses *via* adhesion experiments. These materials are however often ill-defined, and quantitative information on their relative hydrophobicity is rarely provided. Finally, the interpretation of virus adhesion data at large solution ionic strengths may be impaired by possible virus aggregation (21, 28). Therefore, it is often impossible to unambiguously classify the adhesion capacity of viruses according to their hydrophilic/hydrophobic balance.

Following the above elements, the aim of this study is to propose a methodology for drawing a clear connection between the electrostatic and hydrophobicity properties of bacteriophages

characterized by different multilayered structures and their capacity to adhere onto positively or negatively charged membranes. Electrostatic features of the viruses are derived here from electrophoretic mobility measurements analyzed according to advanced theory for electrokinetics of soft particles (15). The hydrophilic/hydrophobic balance of the phages of interest here is further inferred from adhesion experiments performed on model hydrophobic 1-dodecanethiol and model hydrophilic 11-mercapto-1-undecanol self-assembled mono-layers whose hydrophobic/hydrophilic balance and rugosity was determined by spatially-resolved Chemical Force Microscopy (CFM) and Atomic Force Microscopy measurements as detailed elsewhere (4).

The selected phages in this study are classically used as viral surrogates in the environment: MS2, Phi X 174 and PRD1 (29, 30, 31, 32, 33). The F-specific RNA bacteriophage MS2 is a member of *Leviviridae* family. This phage consists of a 20-30 nm diameter proteic capsid and a 3566 nucleotides RNA genome partly bound to the capsid. The capsid exhibits pores on its surface and contains 180 copies of the capsid protein (14 kDa) arranged in the form of icosahedrons, and one copy of the maturation protein. The MS2 phage with reported IEP~2.2-3.9 is generally viewed as a model system to evaluate the performance of membrane or sand filtration in removing pathogenic viruses (31, 34, 35). This phage (supposedly) corresponds indeed to the worst possible situation in terms of (repulsive) virus-surface electrostatic interactions in aquatic media at neutral pH (6, 23). The Phi X 174 phage is a member of the *Microviridae* family. It has a relatively simple icosahedral structure (20 faces, 12 vertices) consisting of a ~25 nm diameter proteic capsid and a circular 5386 nucleotides ssDNA. Its capsid consists of four proteins J (5 kDa), F (48 kDa), G (19 kDa) and H (kDa) (36, 37). Because of their size and structure, data on Phi X 174 phages are often compared to those collected on RNA F-specific bacteriophages (38, 39). The Phi X 174 phage is assumed to express a lower electrostatic charge at neutral pH as compared to MS2 because its IEP is significantly larger ~6.6 (40). It should be noted however that a lower IEP value of 2.6 has also been reported for Phi X 174 (38). PRD1 is a three layers model phage with an icosahedral structure exhibiting a proteolipidic membrane underneath its capsid. PRD1 thus consists of a proteic capsid of ~65 nm in diameter, an internal membrane and an internal compartment containing a 14925 base pairs dsDNA. Twenty structural proteins are involved in the capsid formation. PRD1 phage is considered as a model system to study 'large-size' viruses and it is supposedly characterized by a high hydrophobicity degree due to the presence of the membrane underneath the proteic capsid

(41), even though solid proof has never been advanced so far. Finally, PRD1 is widely employed to investigate the fate of bacteriophages in soils (42, 43).

Predicting the respective adhesion capacity of the MS2, Phi X 174 and PRD1 phages on the sole basis of their IEPs (classical approach previously invoked) would be highly speculative in view of their similar IEP values : 2.2-3.5 for MS2, 3-4 for PRD1 and 2.6-6.6 for Phi X 174 (18).

Instead, the results reported in this study evidence that an appropriate analysis of the electrophoretic response of the viruses as a function of ionic strength provides a quantitative estimation of their effective volume charge density whose magnitude differs according to the multilayered phage structure. In particular, the phage with the most important charge in magnitude is MS2. The analysis further supports the idea that any approach based on zeta-potential concept for apprehending phage electrostatics is physically incorrect. This is inferred from the non-zero value obtained for the hydrodynamic penetration length scale of the various phages analyzed here. It is further found that the viral charge as evaluated here is elegantly correlated to the capacity of the phages to adhere onto positively- and negatively-charged membranes under low ionic strength condition (1 mM ionic strength) where electrostatic interactions are significant. At large electrolyte concentration (100 mM), the adhesion capacity of the phages onto the membranes adequately scales with the hydrophobicity sequence $\text{Phi X 174} < \text{MS2} < \text{PRD1}$ (where ' $<$ ' means 'less hydrophobic than') as determined from independent virus adhesion experiments onto model hydrophobic 1-dodecanethiol surface. It is emphasized that the proposed methodology goes well beyond the classical approach that is based on the incorrect use of isoelectric point or zeta-potential that strictly hold for hard colloids but not for multilayered soft particles like viruses.

2. Materials and Methods.

2.1 Production and purification of bacteriophages.

The production of the bacteriophages of interest in this work requires host bacteria : *E. coli* Hfr K12 (ATCC 23631) for MS2, *E. coli* C for Phi X 174 (ATCC 13706) and *S. typhimurium* DS88 (DSM No. 19207) for PRD1. MS2 and Phi X 174 phages were replicated according to the procedures ISO 10705-1 (44) and ISO 10705-2 (45), respectively, without the chloroform lysis step. The replication of the PRD1 phage was performed according to Bamford and Bamford (46) in LB medium supplemented with 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ kanamycin. After replication, phage suspensions were centrifugated (Beckman [Fullerton, CA]) model J2-22; 27,000 g; 60 min; 4°C) and the

supernatant filtered using a 0.22 μm membrane (Millex®-GP Millipore). The suspensions were then purified by dialysis (100 kDa molecular weight cutoff, Spectrum [Gadena, CA Spectrum Labs]), first against de-ionized water for 14 h, and then against 1 mM NaNO_3 at $\text{pH } 7 \pm 0.3$ for 14 h. In a final stage, the phage suspensions were filtered using a 0.22 μm membrane and stored at 4°C prior to any measurement. The viral concentrations obtained following the above protocol were in the range 10^9 to 10^{11} PFU.ml⁻¹.

2.2 Size and electrophoretic mobility measurements.

Prior to virus size and electrokinetic measurements, phage suspensions were filtered in order to eliminate the possible presence of aggregates (of size larger than 0.22 μm). The sensitivity of the apparatus used for the measurements requires working with concentrations of viruses above 10^9 PFU.ml⁻¹. Samples were poured in a polypropylene tube directly screwed into a PC monitored-titrator connected to the instrument (Zetasizer NanoZS). Sizes were measured as a function of pH (range 2-7) in 1 mM and 100 mM NaNO_3 electrolyte at $21 \pm 0.1^\circ\text{C}$ (He-Ne red laser, wavelength 633 nm, Malvern Instruments, Malvern, UK). The phages size distribution under investigation was determined by Dynamic Light Scattering (DLS) as detailed elsewhere (21). Phage electrophoretic mobility was measured as a function of ionic strength by laser Doppler electrophoresis also known as phase analysis light scattering (21). The impact of ionic strength on virus electrophoretic mobility was carried out with an Autotitrator MPT-2 (Malvern, UK) mounted on the Zetasizer NanoZS instrument. The ionic strength of the viral suspension was varied upon addition of predefined volume increments of 0.1 mM, 1 mM or 500 mM NaNO_3 (all solutions were filtered with a 0.22 μm membrane prior to use). For given pH and salt concentration, size and electrophoretic mobility measurements were recorded three times.

2.3 Preparation of the deposition substrates.

Phage adhesion experiments were carried out on (i) positively-charged membrane (SB-6407, membrane A) with quaternary ammonium groups, and (ii) a negatively-charged membrane (ICE 450, membrane B), whose ion capacity is provided by a patented post-treatment process. Both polyethersulfone-based membranes were purchased from Pall Corporation (Ann Arbor, Michigan) in the form of flat disks of 47 mm in diameter with a pore size of 0.45 μm . The adhesion of the phages onto model hydrophilic and hydrophobic self-assembled monolayers (SAMs) was further investigated. The preparation of the SAMs surfaces was performed according to the following protocol. A glass substrate ($1 \times 2 \text{ cm}^2$, 0.1 cm thick) was coated by a

5 to 10 nm thick chromium layer using a sputter coater (EMITECH, K575 Turbo, United Kingdom) and was further covered with a *ca.* 40 nm thick top gold layer. Gold-coated glass surfaces were then immersed for 14 h in a solution containing either 1 mM CH₃-(CH₂)₁₁-SH (1-dodecanethiol, preparation of hydrophobic surface) and HO-(CH₂)₁₁-SH (11-mercapto-1-undecanol, preparation of hydrophilic surface) following the procedure by Alsteens *et al.* (47). The resulting surfaces were then extensively rinsed twice with ethanol. The hydrophobic and hydrophilic properties of the obtained substrates as well as those of the industrial membranes were evaluated by spatially-resolved Chemical Force Microscopy upon measurement of the adhesion force between a -CH₃ coated-gold Atomic Force Microscopy tip and the substrate of interest (4). The adhesion forces obtained with such an hydrophobic probe were ~7 nN for the CH₃-(CH₂)₁₁-SH substrate and ~0.6 nN for the HO-(CH₂)₁₁-SH substrate, thereby demonstrating quantitatively the desired difference between the hydrophobicity degree of the two deposition surfaces. The typical magnitude of the adhesion forces obtained between the hydrophobic AFM probe and the membranes was ~6 nN for the positively charged membrane A and 1.15 nN for the negatively charged membrane B (Supplemental material, Fig. S1). These results then support that the positively charged membrane A is more hydrophobic as compared to the negatively charged membrane B. Finally, Atomic Force Microscopy roughness measurements were carried out and revealed that model hydrophobic and hydrophilic SAMs substrates used in our study may be considered as flat with a root mean square (RMS) surface roughness ≤ 5 nm. This latter property makes it easier to interpret viral adhesion in view of the sometimes dramatic impact of surface roughness on phage adhesion capacity (4, 48). In addition, we found that the RMS is about ~250 nm for the positively charged membrane A and ~430 nm for the negatively charged membrane B (Supplemental material, Fig. S1).

2.4 Adhesion experiments.

The phage adhesion experiments were performed under static condition on the following deposition surfaces: 1 dodecanethiol (uncharged), 11-mercapto-1-undecanol (negatively charged at pH 7), positively-charged membrane (Membrane A) and negatively-charged membrane (Membrane B) at pH 7. Virus adhesion experiments were carried out at pH 7 with a bulk phage concentration of 10⁶ PFU.ml⁻¹ and a 3 hours contact time between virus suspension and deposition surface (4). Prior to adhesion experiments, the deposition surfaces were immersed for 10 minutes in 1 mM or 100 mM NaNO₃ solution at pH 7 $\pm$ 0.2. Deposition substrates were then

brought into contact with the viral suspensions. After the contact time of 3 hours, the substrates were washed twice for 10 min in 1 mM or 100 mM NaNO₃ solution at pH 7 ± 0.2 in order to remove weakly attached phages.

The amount of adhered phages was determined by extracting phage RNA from 1 ml suspension (before and after the 3 hours contact with the deposition substrate) and by extracting phage RNA directly from the very deposition substrate. The volume was adjusted to 4 ml with lysis buffer and nucleic acids were extracted using the NucliSens® easyMAG™ platform (Biomérieux). Phage genomes were recovered in 50µl of elution buffer and stored (-80°C) until further use for PCR and RT-PCR analysis.

2.5 RT-PCR.

MS2 phages were amplified with genogroup-specific RT-PCR primers and probes as detailed elsewhere (9). The detection limit was 1 equivalent PFU per PCR reaction.

Two real-time PCR assays for the detection of coliphage Phi X 174 and enterobacteria phage PRD1 were developed, their primers and sets of probes were selected with Primer Express (Applied Biosystems) and Primer3 (v. 0.4.0), respectively (Table 1). All PCRs were conducted in an ABI Prism 7700 system (Applied Biosystems). 5 µL of DNA extract were added to 20µL of reaction mixture (1 X TaqMan Universal Master Mix [Applied Biosystems], 900 nM each primer, 225 mM probe). Cycling conditions assays consisted of denaturation at 95°C for 3 min, 45 cycles of PCR amplification (denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min) and were terminated with extension at 72°C for 5 min. For each real-time PCR reaction, a standard curve was obtained by analysis on tenfold serial dilutions of phage DNA extracted from the initial virus stock suspension and for which the infectious titers were further determined by infectivity assay. The accuracy for phage concentration quantification was also evaluated based on the linearity (R^2) and PCR efficiency (E) (Table 1). The limits of quantification (LOQ) were 1 eq. PFU per PCR reaction for both phages. In addition, reliable quantification was possible over a dynamic range of at least 6 log for both phages, thus providing a proof of the sensitivity and robustness of the established assay.

The obtained standard curves were used to estimate the quantities of phage detected in the samples, expressed as equivalent PFU per unit of substrate surface area (eq PFU.cm⁻²).

Table 1: Primer and probe sequence for TaqMan real-time RT-PCR to detect Phi X 174 and PRD1 (LOQ: Limits Of Quantification; E: Efficiency).

Oligonucleotide	Sequence ^a	Polarity	Location ^a	Parameters
Phi X 174				
Forward	GTAAAACCTCTTATGACGCTGAC	+	1674-1699	R ² = 0.999
Reverse	CATAGCCAGATGCCCAGAGATT	-	1724-1745	E = 90%
Probe	FAM-TCCTTTACTTGTCATGCGCT-NFQMGB	+	1702-1721	LOQ = 1 eqPFU per PCRreaction
PRD1				
Forward	AAACTTGACCCGAAAACGTG	+	9546-9565	R ² = 0.998
Reverse	CGGTACGGCTGGTGAAGTAT	-	9728-9747	E = 96%
Probe	FAM-ATGGTAACGTGGGCTTTGTC-TAMRA	+	9658-9677	LOQ = 1 eqPFU per PCRreaction

^a Oligonucleotides sequences and locations were based on Genbank accession number AY848689: Enterobacteria phage PRD1 and J02482: Coliphage phiX174. The slopes (denoted as s) of the standard curve were used to calculate the amplification efficiencies (E) of real-time PCR according to $E = 10^{(-1/s)} - 1$.

The mean values and standard deviation of virus adhesion data were evaluated for the three phages by applying one way ANOVA statistical test with a 0.05 significance level, in order to estimate whether or not differences in phage surface concentration at the deposition substrates were significant.

3. Results and Discussion.

3.1 Aggregation of bacteriophages.

The stability of MS2, Phi X 174 and PRD1 phage suspensions against aggregation was first analyzed in the pH range 2 to 7 at three NaNO₃ electrolyte concentrations 1 mM, 10 mM and 100 mM (Figure 1). Results show that regardless solution ionic strength, all phages are isolated at pH > 4 with a mean diameter of 27.2 ± 1.5 nm for MS2, 28.3 ± 5 nm for Phi X 174 and 63.2 ± 3.9 nm for PRD1. At pH ≤ 4 and under all ionic strength conditions examined here, it is found that

MS2, Phi X 174 and PRD1 particles are not stable against aggregation (micrometric aggregates observed). With decreasing pH from 7 to 4, particles come close to each other following a reduction of their electrostatic charge, which in turns allows a significant expression of attractive forces as compared to repulsive electrostatic interparticular forces. As far as the MS2 phage is concerned, previous studies already highlighted the aforementioned aggregation phenomenon upon acidification of the electrolyte solution (4, 28, 50). This is however the first time that this state of aggregation is observed for the two other bacteriophages Phi X 174 and PRD1. Proteins possibly remain after dialysis purification and their role in promoting the above aggregation can not be excluded. The results displayed in Figure 1 suggest that the isoelectric point value (IEP) of the three bacteriophages is around 4 under our experimental conditions. This indirect measurement of IEP confirms values previously reported from electrokinetic measurements on MS2 (around 3, (16, 51)), and PRD1 (around 4, (52, 53)). The IEP of Phi X 174 obtained in this study lies in the range 2.6-6.6 that is reported in literature (38, 40). These results also highlight that the similar IEP value for the three phages can not be used here to properly classify and interpret their differentiated adhesion capacity as discussed in the following sections. They also underline that studies performed with high phages concentration at pH lower than 4 will systematically lead to the formation of phage aggregates that may largely impair adhesion data interpretation and further significantly affect virus inactivation process (50). The pH 7 condition adopted here for the adhesion experiments systemally refers to stable phage suspensions. In the following, the hydrophobic and electrostatic features of the phages of interest here are derived from their adhesion on model hydrophilic/hydrophobic surfaces and from electrophoretic mobility data collated with recent soft particles electrokinetic theory, respectively.

3.2 Electrostatic properties of the phages.

The dependence of the electrophoretic mobility μ of MS2, Phi X 174 and PRD1 phages at pH 7 on NaNO_3 electrolyte concentration is displayed in Figure 2. Unsurprisingly, the mobility is systematically negative, thus denoting a negative effective charge for the viruses as a whole under the pH condition examined. In addition, the magnitude of μ decreases with increasing salt concentration as a result of the screening of the virus charge by the ions present in the electrolytic medium. The mobility of all phages tend to a non-zero plateau value for solution ionic strengths above 100 mM (inset Figure 2), which is characteristic of the soft (ion and water permeable) nature of the viruses (13). This latter feature underlines the inadequacy of the

concept of zeta-potential for addressing the electrostatic properties of phages, as discussed in the Introduction section and in previous reports on electrohydrodynamics of bacteria and viruses (13, 14, 16, 21). It is further emphasized that the electrokinetic profiles depicted in Figure 2 are significantly different for the three phages, which implies that their respective electrostatic properties can not be considered as identical despite their similar IEP values.

Quantitatively, mobility values vary between $-3.5 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ and $\sim -1 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ for MS2, $-1.8 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ and $-1 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ for PRD1, and between $-1.6 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ and $\sim -1 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V/s}$ for Phi X 174 over the 1 mM-100 mM electrolyte concentration range. A recovery of the data using soft particle electrokinetic theory may be performed upon adjustment of two key electrohydrodynamic parameters (15): (i) the effective volumic density of charges carried by the particles, denoted as ρ_o , and classically expressed in equivalent concentration of charged groups and (ii) the water-permeability degree of the particles expressed in terms of the hydrodynamic penetration length $1/\lambda_o$. The latter refers to the extent of electroosmotic flow penetration within the viral particle during its electrophoretic migration under action of the applied electric field. Unlike the original formalism by Ohshima (14), the theory by Duval-Ohshima (15) applies to soft particles with no approximation on charge density magnitude and it accounts for electric double layer polarization processes. Taking into account the size of the viruses as evaluated in §3.1, the modeling shown in Figure 2 leads to: $\rho_o = -63 \text{ mM}$, -13 mM , -11.6 mM and $1/\lambda_o = 1.2 \text{ nm}$, 2.8 nm , 2.8 nm for MS2, PRD1 and Phi X 174, respectively. At the light of these data, the following charge density sequence may be established : $\text{Phi X 174} \leq \text{PRD1} \ll \text{MS2}$ where ‘<’ means ‘less negatively-charged than’. The non-zero value obtained for the parameter $1/\lambda_o$ confirms that viruses can not be represented by hard colloids with well-defined zeta-potentials. In addition, the deviation between experimental data and theory at low ionic strengths (Figure 2) has been extensively documented in literature on electrokinetics of soft interfaces (13) *e.g.* charged polymers (20) and (bio)polymers at bacterial surfaces (54). This discrepancy stems from the possible change of interfacial structure *via* swelling processes at sufficiently low solution ionic strength. This feature particularly takes place for loose interfacial materials corresponding to large water uptake or equivalently large $1/\lambda_o$ values, which is qualitatively in line with the obtained $1/\lambda_o$ parameters (Figure 2).

Refined calculations taking into account the complex multilayered viral interphase structure would be necessary to unravel the respective charge contribution from the inner RNA or DNA and that from the outer capsid layer to the measured electrophoretic mobility. Such simulations

would however require numerous protolytic parameters (16) pertaining to the various ionogenic groups located in the different virus compartments (DNA or RNA and capsid) and these parameters are unfortunately not available in the literature yet. Despite this difficulty, the current modeling is sufficient to capture the effective electrokinetic charge carried by the phages of interest, and to grasp the impact of electrostatic interactions on their capacity to adhere onto abiotic surfaces, as detailed in the next section.

3.3 Adhesion of phages onto model hydrophilic and hydrophobic surfaces.

To classify the phages according to their hydrophobic/hydrophilic balance, their adhesion onto model flat hydrophobic (1-dodecanethiol) and flat hydrophilic (11-mercapto-1-undecanol) gold-coated surfaces was investigated (Figure 3). Experiments were carried out in 100 mM electrolyte concentration and at pH 7, conditions that guarantee stability of phage suspension against aggregation (Figure 1).

The differentiated adhesion of a given phage onto hydrophobic and hydrophilic substrates under conditions where electrostatic interactions are screened (100 mM NaNO₃) allows for a better evaluation of the phage hydrophobic/hydrophilic balance as compared to the measurement of phage adhesion onto hydrophobic surface only. Figure 3 shows that the phage with the most significant difference in adhesion capacities on hydrophobic and hydrophilic surfaces is PRD1 with 1.2 Log ($p < 0.05$) unit difference in surface concentration of adhered phages, followed by MS2 with 0.9 Log ($p < 0.05$), and Phi X 174 with no statistically meaningful difference in adhesion on both types of substrates. These results leads to the following hydrophobicity sequence $\text{Phi X 174} < \text{MS2} < \text{PRD1}$, where ‘<’ means ‘less hydrophobic than’.

This sequence is consistent with data reported on MS2, Phi X 174 and PRD1 phage adhesion onto industrial surfaces. In particular, Aronino *et al.* (38) investigated MS2 and Phi X 174 adhesion by circulating virus suspension through a column consisting of octyl-sepharose, a hydrophobic compound. The authors observed a much better retention in this column for the MS2 bacteriophage as compared to Phi X 174 phage. In addition, Zhuang and Jin (55) studied the composition of proteic capsids and argued that the capsid of Phi X 174 is more hydrophilic than that of MS2. The ability of PRD1 phage to attach to abiotic surfaces has been attributed to important hydrophobic phage/surface interactions favored by the high lipidic content of the PRD1 membrane. Kinoshita *et al.* (41) invoked hydrophobic interactions to explain an increased

attachment of PRD1 to organic matter in two different hydrophobic geologic media. These authors further argued that MS2 phage was retained in sand filtration to a lesser extent as compared to hydrophobic PRD1 phage.

Despite the above studies that are in line with the results of Figure 3, the hydrophobic character of PRD1 remains controversial. On the basis of adhesion experiments performed with MS2 and PRD1 phages to silica beads and silica beads *partially* covered by octadecyltrichlorosilane, Bales *et al.* (52) concluded that MS2 exhibits a stronger affinity to hydrophobic surfaces than PRD1. This conclusion, however, does not tell much about the respective hydrophobicity degree of PRD1 and MS2 since the use of silica beads with 6.5% of the surface coated with an hydrophobic molecule, does not exclude at all the significant role of electrostatic interactions. In another study, Loveland *et al.* (56) suggested that the strong attachment of PRD1 phage on the C18 compounds of silica beads surface could not be explained by invoking favorable hydrophobic interactions. According to these authors, PRD1 membrane can not promote hydrophobic interactions because it is located underneath the capsid that predominantly consists of hydrophilic amino acids (57). Unfortunately, this study does not provide comparative data on MS2 adhesion and further ignores that short range attractive interactions -in particular van der Waals dispersion forces- and long range electrostatic forces between a given surface and a multilayered soft particle may be significantly affected by elements not necessarily located at the very peripheral region of the particle but also by components located underneath (58, 59).

All the above data in line with either a high or a restricted hydrophobic character of PRD1 phage partially or entirely overlooked that phage adhesion is a complex process driven by several types of interactions whose respective magnitudes are intimately dependent on the physico-chemical composition of the medium. In line with this, the lack of information or the absence of control of the solution pH, solution ionic strength or/and of the surface properties of the deposition substrates, may severely impair data interpretation, especially the analysis of the contribution of hydrophobic virus-substrate interactions. In this study, we evaluated for the first time the hydrophobic character of MS2, Phi X 174 and PRD1 phages on well-controlled and strictly hydrophobic or hydrophilic flat substrates under high ionic strength condition in order to exclude any significant role played by the virus-substrate electrostatic interactions in the overall adhesion process.

3.4 Adhesion of phages on membranes.

The interfacial properties (namely the volume charge density and the hydrophobic/hydrophilic balance) of MS2, Phi X 174 and PRD1 were evaluated in the previous sections. The purpose of this section is to correlate these interfacial properties with the capacity of these phages to adhere onto positively charged membrane (Membrane A) and negatively charged membrane (Membrane B) (Figure 4). It is recalled that all measurements were performed at pH 7, *i.e.* under conditions that prevent the formation of phage aggregates (Figure 1). Experiments were carried out in 1 mM and 100 mM electrolyte concentrations (Figure 4A and 4B, respectively) in order to unravel the respective contributions of electrostatic and hydrophobic interactions.

At low ionic strength (1 mM, Figure 4A), the extent of MS2 adhesion onto positively charged membrane A is significantly larger than that measured for Phi X 174 and PRD1 with surface concentration of adhered phages of $\sim 10^8$ eqUFP.cm⁻² for MS2, $10^{7.3}$ eqUFP.cm⁻² for PRD1 and 10^7 eqUFP.cm⁻² for Phi X 174. This result is fully in line with the larger magnitude of the volume charge density ρ_0 evaluated for MS2 as compared to that for Phi X 174 and PRD1. Figure 4A pertains to the situation where adhesion is significantly promoted by attractive electrostatic interaction forces between virus and membrane A, the magnitude of which necessarily increases with increasing the overall negative charge carried by the phage. A better evaluation of the virus charge that is effectively perceived during the adhesion process is obtained upon comparing the surface concentration of adhered phages onto membrane A and membrane B at low ionic strength (Figure 4A). The results clearly show that in 1 mM NaNO₃ electrolyte concentration, the most significant difference is obtained for the MS2 phage with 3.2 Log ($p < 0.05$) unit difference in surface concentration of adhered phages, followed by PRD1 with 2 Log ($p < 0.05$) and Phi X 174 that exhibits a similar capacity to adhere onto membrane A and membrane B. This strongly supports the idea that the perceived electrostatic charge is more negative for MS2, in line with the determination of the phage volume charge density (ρ_0) from soft particle electrokinetic theory and with the ρ_0 sequence (in magnitude) : Phi X 174 < PRD1 < MS2 where '<' means 'less than'. Last but not least, the respective adhesions of Phi X 174, PRD1 and MS2 phages onto the negatively charged membrane B follow the reverse of the aforementioned ρ_0 sequence with a surface concentration of adhered phage of $10^{6.5}$ eqUFP.cm⁻² for Phi X 174, $10^{5.1}$ eqUFP.cm⁻² for PRD1 and $10^{4.8}$ eqUFP.cm⁻² for MS2. This latter result again supports our evaluation of the phage electrostatic properties : in case of membrane B under low

ionic strength conditions, the larger the magnitude ρ_0 of the phage volume charge density, the stronger the repulsive virus-substrate electrostatic interactions and the weakest is the corresponding phage adhesion.

With varying the solution salt content from 1 mM to 100 mM (Figure 4B), the adhesion capacity of the MS2 phage onto membrane A (membrane B, respectively) slightly decreases (significantly increases, respectively) as a result of the screening of the attractive (repulsive, respectively) electrostatic interactions. Unlike MS2, the adhesion capacities of the Phi X 174 phage with respect to membrane A and membrane B remains statistically similar with increasing the electrolyte concentration from 1 mM to 100 mM. Apparently, a screening of the electrostatic virus-substrate interactions and an increase of the contribution of the hydrophobic interactions (as a result of a significant screening of the phage and membrane charges) does not significantly impact the adhesion behavior of Phi X 174 as compared to that for MS2 and PRD1 (see discussion below for the latter phage). This trend agrees with the fact that Phi X 174 is among the three phages investigated here the one with the lowest volume charge density in magnitude and the largest hydrophilicity.

Unlike MS2, the surface concentrations of adhered PRD1 phages onto membrane A and membrane B both significantly increase upon increase of NaNO₃ salt concentration. To understand these results, additional experiments allowed for the evaluation of the hydrophilic/hydrophobic balance and the roughness of membranes A and B (Supplemental material, Fig. S1). The membrane A appears to be significantly more hydrophobic as compared to membrane B. Under 100 mM salt concentration condition, electrostatic interactions are significantly screened by the ions in the electrolyte solution. Under such condition, the virus adhesion process may be governed -for a large part- by hydrophobic interactions. This is the case for the most hydrophobic PRD1 phage that is further defined by a lower density of charges as compared to that of MS2. As a result, the adhesion of PRD1 on membrane A substantially increases with increasing electrolyte concentration from 1 mM to 100 mM as a result of joint increased hydrophobic interactions *and* screened repulsive electrostatic interactions. This increase of PRD1 adhesion capacity is more limited when considering PRD1 adhesion on the most hydrophilic membrane B. Noteworthy, the same qualitative evolution of the PRD1 phage surface concentration at model hydrophilic and hydrophobic substrates is observed with increasing electrolyte concentration, as shown in Supplemental Material, Fig. S2.

The difference between surface concentrations of adhered phages on membrane A and membrane B at 100 mM NaNO₃ concentration adequately follows the previously established hydrophobic sequence PRD1 (1.1 Log difference) > MS2 (0.7 Log) > Phi X 174 (0.2 Log) (section 3.3). These results further suggest that the differences in RMS roughness as evaluated for membrane A and membrane B (section 2.2) do not significantly impact phage adhesion. This latter feature conforms to theory (48) which predicts that as long as the magnitude of RMS significantly exceeds the size of the particles and the Debye length, the surface irregularities of the deposition substrate do not affect the particle-substrate interaction and thus only contribute to increase the overall deposition surface area (this increase is here accounted for when evaluating the adhered phage surface concentration (4)).

4. Conclusions

This study demonstrates that a careful investigation of the interfacial properties of phages allow for a prediction of their respective adhesion capacity onto substrates that differ in terms of hydrophobic/hydrophilic balance and electrostatic charge. It is shown that MS2, Phi X 174 and PRD1 phages, all characterized by different multilayered structures, exhibit distinct electrokinetic properties and capacity to adhere onto model uncharged hydrophobic substrate. The quantitative interpretation of the corresponding electrophoretic mobility and force adhesion data lead to the following sequence in phage charge density magnitude $\text{Phi X 174} \leq \text{PRD1} \ll \text{MS2}$ ('<' meaning 'less charged than') and to the following hydrophobicity sequence $\text{Phi X 174} < \text{MS2} < \text{PRD1}$ ('<' meaning less hydrophobic than'). The classification of the phages according to these sequences very well agrees with their respective capacity to adhere onto hydrophilic and positively charged membranes and onto hydrophobic and negatively charged membranes under salt concentration conditions where electrostatic virus-membrane interactions are significant or substantially suppressed.

The study proposes a sound physico-chemical methodology for environmental virologists to properly derive the searched electrostatic and hydrophobicity degree of viral particles without the need to resort to macroscopic MATS tests and to IEP and zeta-potential values that are meaningless for soft multilayered particles like viruses. Based on the results reported in this work, the aforementioned methodology offers a promising alternative for explaining the fate and behavior of viral particles in complex natural media.

References

1. **Macinga D, Sattar S, Jaykus L, Arbogast J.** 2008. Improved inactivation of nonenveloped enteric viruses and their surrogates by a novel alcohol-based hand sanitizer. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5047–5052.
2. **Lodder WJ, van den Berg HHJL, Rutjes SA, de Roda Husman AM.** 2010. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5965–5971.
3. **Valegård K, Fridborg K, Liljas L.** 1994. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage Qbeta. *Acta Crystallogr Sect D-Biol Crystallogr* **50**: 105-109.
4. **Dika C., Ly-Chatain M.H., Francius G., Duval J.F.L., Gantzer C.** 2013. Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: Importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, DOI : 10.1016/j.colsurfa.2013.02.045.
5. **Taylor DH, Bosmann HB.** 1981. Measurement of the electrokinetic properties of vaccinia and reovirus by laser-illuminated whole-particle microelectrophoresis. *J Virol Methods* **2**: 251-260.
6. **Zerda KS, Gerba CP, Hou KC, Goyal SM.** 1985. Adsorption of viruses to charge-modified silica. *Appl Environ Microbiol* **49**: 91-95.
7. **Lytle CD, Routson LB, Jain NB, Myers MR, Green BL.** 1999. Virus passage through track-etch membranes modified by salinity and a nonionic surfactant. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2773-2775.
8. **Hughes MP, Morgan H, Rixon FJ.** 2002. Measuring the dielectric properties of herpes simplex virus type 1 virions with dielectrophoresis. *Biochim Biophys Acta* **1571**: 1-8.
9. **Schaldach CM, Bourcier WL, Shaw HF, Viani BE, Wilson WD.** 2005. The influence of ionic strength on the interaction of viruses with charged surfaces under environmental conditions. *J Colloid Interface Sci* **294**: 1-10.

10. **Arkhangelsky E, Gitis V.** 2008. Effect of transmembrane pressure on rejection of viruses by ultrafiltration membranes. *Sep Purif Technol* **62**: 619–628.
11. **Tanneru CT, Chellam S.** 2012. Mechanisms of virus control during iron electrocoagulation – Microfiltration of surface water Original. *Water Res.* **46**: 2111-2120.
12. **Dague E, Duval JFL, Jorand F, Thomas F, Gaboriaud F.** 2006. Probing surface structures of *Shewanella* spp. by microelectrophoresis. *Biophys J* **90**: 2612-2621.
13. **Duval JFL, Gaboriaud F.** 2010. Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **15**: 184-195.
14. **Ohshima H.** 1995. Electrophoresis of soft particles. *Adv Colloid Interface Sci* **62**: 189-235.
15. **Duval JFL and Ohshima, H.** 2006. Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* **22**: 3533-3546.
16. **Langlet J, Gaboriaud F, Gantzer C, Duval JFL.** 2008a. Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophys J* **94**: 3293-3312.
17. **Zerda KS, Gerba CP.** 1984. Agarose isoelectrofocusing of intact virions. *J Virol Methods* **9**: 1-6.
18. **Michen B, Graule T.** 2010. Isoelectric points of viruses. *J Appl Microbiol* **109**: 388-397.
19. **Duval JFL, Küttner D, Werner C, Zimmermann R.** 2011. Electrohydrodynamics of soft polyelectrolyte multilayers: point of zero-streaming current. *Langmuir* **27**: 10739-10752.
20. **Zimmermann R, Dukhin S, Werner C, Duval JFL.** 2013. On the use of electrokinetics for unravelling charging and structure of soft planar polymer films. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* **18**: 83-92.
21. **Dika C, Duval JFL, Ly-Chatain HM, Merlin C, Gantzer C.** 2011. Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Appl Environ Microbiol* **14**: 4939-4948.
22. **Lukasik J, Scott TM, Andryshak D, Farrah SR.** 2000. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2914-2920.

23. **van Voorthuizen EM, Ashbolt NJ, Schafer AI.** 2001. Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *J Membr Sci* **194**: 69-79.
24. **Small DA, Moore NF, Entwistle PF.** 1986. Hydrophobic interactions involved in attachment of a Baculovirus to hydrophobic surfaces. *Appl Environ Microbiol* **52**: 220-223.
25. **Wolff MW, Siewert C, Hansen SP, Faber R, Reichl U.** 2010. Purification of cell culture-derived modified vaccinia ankara virus by pseudo-affinity membrane adsorbers and hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnol. Bioeng.* **107**: 312-320.
26. **Busscher HJ, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC.** 1995. Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **5**: 111-116.
27. **Ahimou F, Paquot M, Jacques P, Thonart P, Rouxhet PG.** 2001. Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Methods* **45**: 119-126.
28. **Langlet J, Gaboriaud F, Duval JFL, Gantzer C.** 2008b. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes. *Water Res* **42**: 2769-2777.
29. **Lytle CD, Truscott W, Budacz AP, Venegas L, Routson LB, Cyr WH.** 1991. Important factors for testing barrier materials with surrogate viruses. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2549-2554.
30. **Collins KE, Cronin AA, Rueedi J, Pedley S, Joyce E, Humble PJ, Tellam H.** 2006. Fate and transport of bacteriophage in UK aquifers as surrogates for pathogenic viruses. *Eng Geol* **85**: 33-38.
31. **Bae J, Schwab K.** 2008. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human Norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol* **74**: 477-484.
32. **Shirasaki N, Matsushita T, Matsui Y, Oshiba A, Ohno K.** 2009. Estimation of norovirus removal performance in a coagulation-rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs. *Water Res* **44**: 1307-1316.

33. **Black EP, Cascarino J, Guana D, Kniel KE, Hicks DT, Pivarnik LF, Hoover DG.** 2010. Coliphage as pressure surrogates for enteric viruses in foods. *Innov Food Sci Emerg Technol* **11**: 239–244.
34. **Furiga A, Pierre G, Glories M, Aimar P, Roques C, Causserand C, Berge M.** 2010. Effects of ionic strength on bacteriophage MS2 behavior and their implications for the assessment of virus retention by ultrafiltration membranes. *Appl Environ Microbiol* **77**: 229–236.
35. **Boudaud N, Machinal C, David F, Fréval-Le Bourdonnec A, Jossent J, Bakanga F, Arnal C, Jaffrezic MP, Oberti S, Gantzer C.** 2012. Removal of MS2, Q β , and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Res.* **46**: 2651-2664.
36. **Aoyama A, Hamatake RK, Hayashi M.** 1981. Morphogenesis of phi X174: in vitro synthesis of infectious phage from purified viral components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 7285-7289.
37. **Hayashi MN, Yaghmai R, McConnell M, Hayashi M.** 1989. mRNA stabilizing signals encoded in the genome of the bacteriophage phi x174. *Mol Gen Genet* **216**: 364-371.
38. **Aronino R, Dlugy C, Arkhangelsky E, Shandalov S, Oron G, Brenner A, Gitis V.** 2009. Removal of viruses from surface water and secondary effluents by sand filtration. *Water Res* **43**: 87-96.
39. **Attinti R, Wei J, Kniel K, Sims JT, Jin Y.** 2010. Virus' (MS2, phiX174, and Aichi) attachment on sand measured by atomic force microscopy and their transport through sand columns. *Environ Sci Technol* **44**: 426-432.
40. **Horká M, Kubíček O, Ruzicka F, Holá V, Malinová I, Slais K.** 2007. Capillary isoelectric focusing of native and inactivated microorganisms. *J Chromatogr A* **1155**: 164-171.
41. **Kinoshita T, Bales RC, Maguire KM, Gerba CP.** 1993. Effect of pH on bacteriophage transport through sandy soils. *J Contam Hydrol* **14**: 55-70.
42. **Schijven JF, Hassanizadeh M.** 2000. Removal of Viruses by Soil Passage: Overview of Modeling, Processes, and Parameters. *Crit Rev Environ Sci Technol* **30**: 49-127.

43. **Schijven JF, Hassanizadeh SM, de Bruin HA.** 2002. Column experiments to study nonlinear removal of bacteriophages by passage through saturated dune sand. *J Contam Hydrol* **58**: 243-259.
44. **ISO10705-1.** 1995. Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
45. **ISO10705-2.** 1995 Water quality: Detection and enumeration of bacteriophages. Part 2: Enumeration of somatic coliphages. International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.
46. **Bamford, JKH, Bamford DH.** 1990. Capsomer proteins of bacteriophage PRD1, a bacterial virus with membrane. *Virology* **177**: 445-451.
47. **Alsteens D, Dague E, Rouxhet PG, Baulard AR, Dufrêne YF.** 2007. Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. *Langmuir* **23**: 11977-11979.
48. **Duval JFL, Leermakers FA, van Leeuwen HP.** 2004. Electrostatic interactions between double layers: influence of surface roughness, regulation, and chemical heterogeneities, *Langmuir* **20**: 5052-5065.
49. **Ogorzaly L, Gantzer C.** 2006. Development of real-time RT-PCR methods for specific detection of F-specific RNA bacteriophage genogroups: application to urban raw wastewater. *J Virol Methods* **138**: 131-139.
50. **Mattle MJ, Crouzy B, Brennecke M, Wigginton KR, Perona P, Kohn T.** 2011. Impact of Virus Aggregation on Inactivation by Peracetic Acid and Implications for Other Disinfectants. *Environ Sci Technol* **45**: 7710–7717.
51. **Penrod SL, Olson TM, Grant SB.** 1996. Deposition Kinetics of Two Viruses in Packed Beds of Quartz Granular Media. *Langmuir* **12**: 5576-5587.
52. **Bales RC, Hinkle SR, Kroeger TW, Stocking K, Gerba CP.** 1991. Bacteriophage adsorption during transport through porous media: chemical perturbations and reversibility. *Environ Sci Technol* **25**: 2088-2095.

53. **Ryan JN, Elimelech M, Ard RA, Harvey RW, Johnson PR.** 1999. Bacteriophage PRD1 and Silica Colloid Transport and Recovery in an Iron Oxide-Coated Sand Aquifer. *Environ Sci Technol* **33**: 63-73.
54. **Francius G, Polyakov P, Merlin J, Abe Y, Ghigo JM, Merlin C, Beloin C, Duval JFL.** 2011. Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of *Escherichia coli* cells subjected to osmotic stress. *PLoS One* **6**: e20066.
55. **Zhuang J, Jin Y.** 2008. Interactions between viruses and goethite during saturated flow: effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *J Contam Hydrol* **98**: 15-21.
56. **Loveland JP, Ryan JN, Amy GL, Harvey RW.** 1996. The reversibility of virus attachment to mineral surfaces. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp* **107**: 205-221.
57. **Kyte J, Doolittle RF.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105-132.
58. **Vincent, B.** 1973. The Effect of Adsorbed Layers on the Attraction between Colloidal Particles. II. Calculation of Attraction Energy Curves. *J Colloid Interface Sci* **42**: 262-269.
59. **Duval JFL, Merlin J., Anantha P.** 2011. Electrostatic interactions between soft diffuse multi-layered (bio)particles: beyond Debye-Hückel approximation and Deryagin formulation. *Phys Chem Chem Phys* **13**: 1037-1053.

Figures captions

Figure 1. Size (diameter) measurements for MS2 phages (A), Phi X 174 (B) and PRD1 (C) as a function of pH (indicated) and NaNO₃ electrolyte concentration (1 mM, 10 mM and 100 mM).

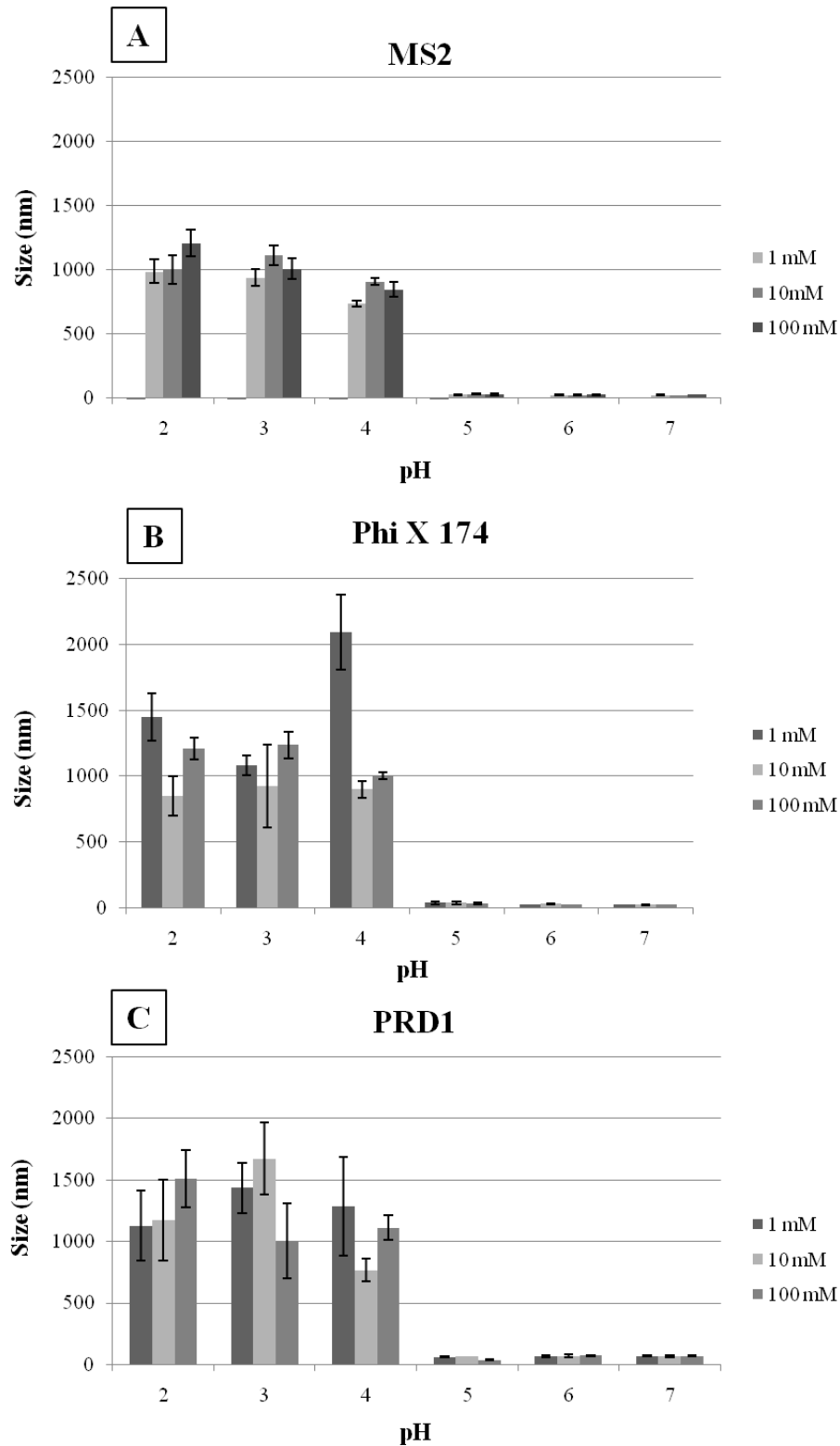


Figure 2. Electrophoretic mobility of MS2, Phi X 174 and PRD1 bacteriophages as a function of ionic strength at pH 7. Points : experimental data, Dashed lines : theoretical recovery using the formalism by Duval and Ohshima, 2006. Inset: Electrophoretic mobilities of MS2, PRD1 and Phi X 174 bacteriophages as a function of ionic strength (linear scale) at pH 7. The points and lines have the same meaning as in the main figure.

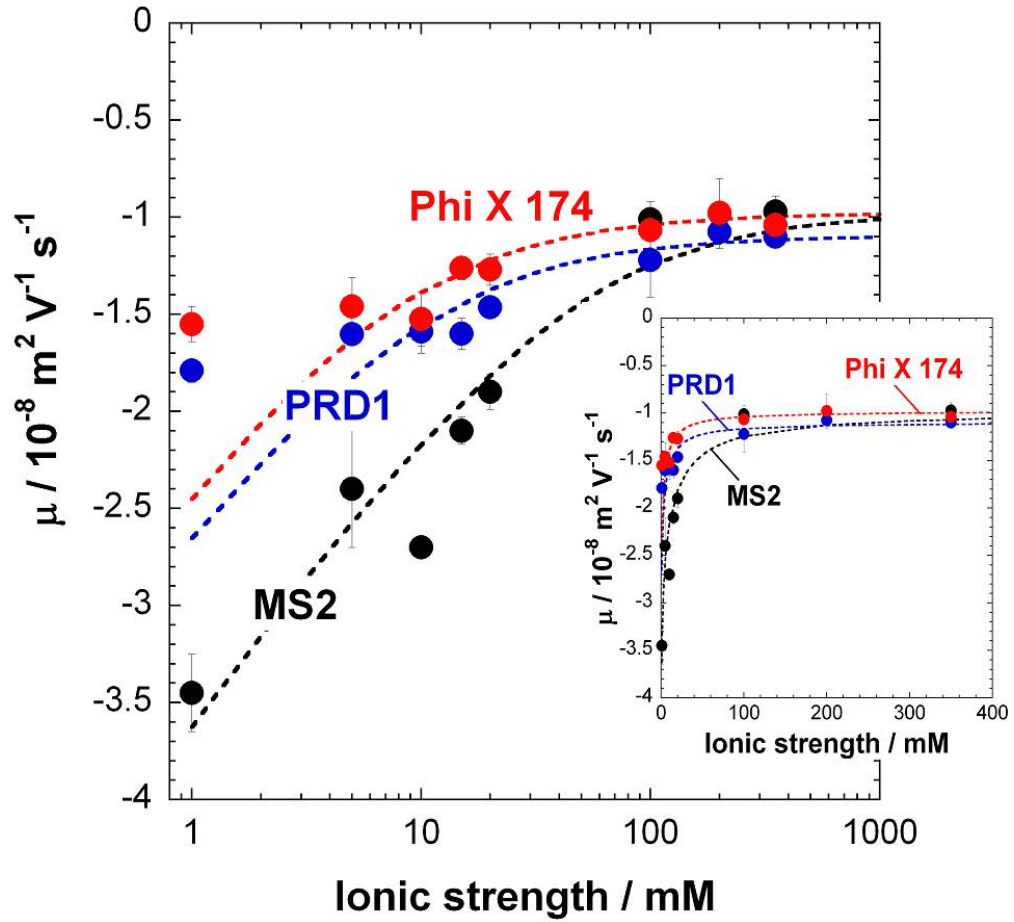


Figure 3. Adhesion of MS2, Phi X 174 and PRD1 bacteriophages on model hydrophobic and hydrophilic substrates. Initial bulk phages concentration: 10^6 PFU.mL⁻¹; 100 mM NaNO₃ electrolyte concentration; pH 7. Contact time between deposition surface and phages suspension: 3h.

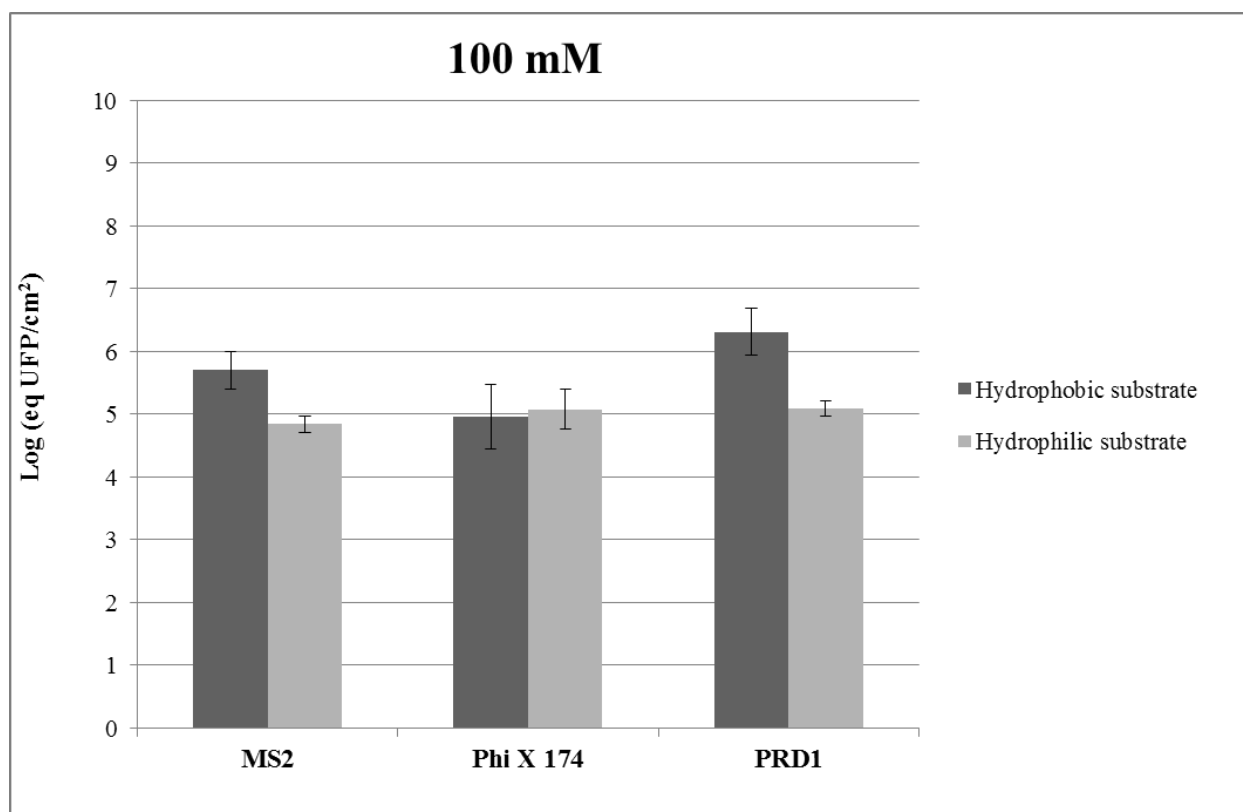


Figure 4. Adhesion of MS2, Phi X 174 and PRD1 bacteriophages on positively and negatively charged membrane A and B, respectively. Membranes A and B further differ in terms of hydrophobic/hydrophilic balance, as shown in Figure S1 (Supplemental Information). Initial bulk phages concentration: 10^6 PFU. ml^{-1} ; 1 mM and 100 mM NaNO_3 electrolyte concentration solution; pH 7. Contact time between deposition surface and phages suspension: 3 h.

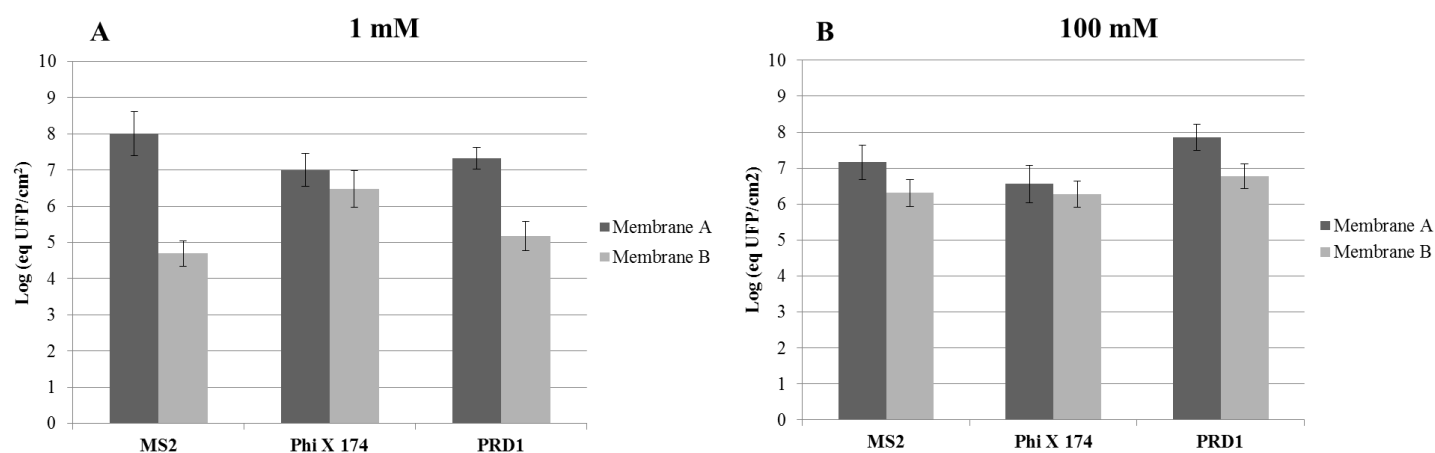


Fig S1. Statistic distribution of adhesion forces measured by Chemical Force Microscopy (CFM) between a hydrophobic -CH₃ gold-coated AFM-tip and different locations of membranes A and B. The histograms are constructed from the spatial cartography of the hydrophobic/hydrophilic balance (or adhesion force). Inset: Tridimensional charged membranes topography obtained by AFM in contact mode. Mapping performed in Milli-Q water at room temperature.

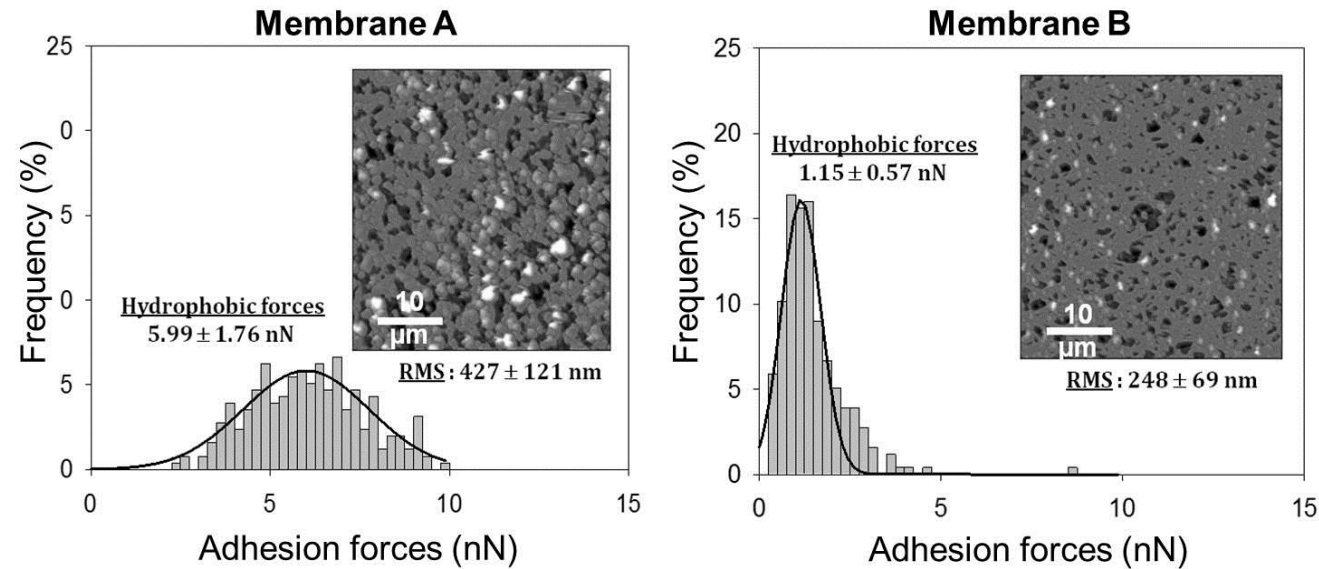
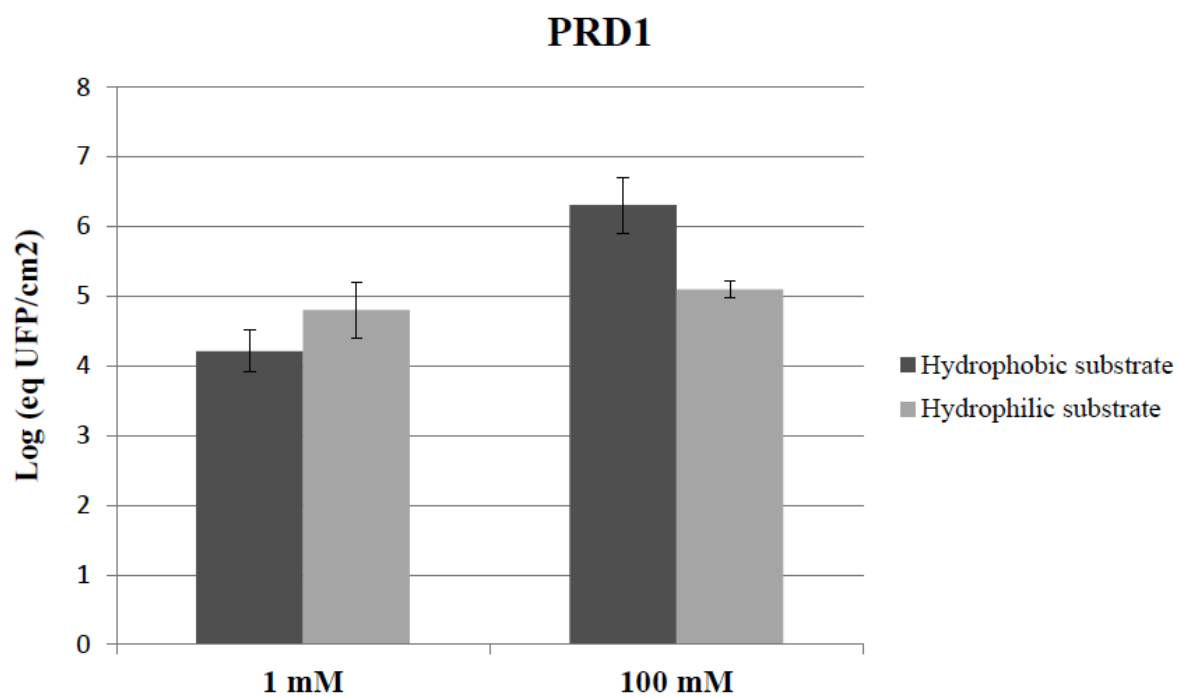


Fig. S2. Adhesion of PRD1 bacteriophage on model hydrophobic and hydrophilic substrates. Initial bulk phages concentration: 10^6 PFU.ml⁻¹; 1 mM and 100 mM NaNO₃ electrolyte concentration; pH 7. Contact time between deposition surface and phages suspension: 3h.



4e partie

Discussion - Conclusion

Suite à l'infection d'individus contaminés, les virus entériques pathogènes pour l'homme (*Norovirus*, virus de l'hépatite A) se retrouvent dans l'environnement, notamment dans le milieu hydrique. Une fois dans l'environnement, à l'extérieur de leurs cellules hôtes, ces particules virales sont considérées comme des particules biologiques inertes dont le comportement va dépendre principalement des propriétés physico-chimiques de l'ensemble de la particule virale. La compréhension du comportement de ces virus dans l'environnement est donc un enjeu majeur de santé publique. Actuellement, il est impossible de cultiver en laboratoire de grandes quantités nécessaires de *Norovirus* pour l'étude de ces propriétés de surface. On fait donc appel à des modèles d'études tels que les bactériophages (phages ARN F-spécifiques, coliphages somatiques, phages de *Bacteroides Fragilis*) ou des particules synthétiques telles que les *Virus Like Particles* (VLPs). Parmi les bactériophages ARN F-spécifiques, le phage MS2 est très souvent utilisé comme représentant le pire modèle lors d'élimination par filtration membranaire ou sur sable (Zerda et al., 1985; van Voorthuizen et al., 2001) dû à la faible valeur de son point isoélectrique ($pI \sim 3,5$). En effet, une valeur de pI faible correspond à la pire situation possible en termes de répulsion électrostatique (virus-membrane). De leur analyse des propriétés interfaciales de MS2, Langlet et al. (2008a) ont conclu que ce phage est en fait une particule molle multicouche (c'est-à-dire perméable) constituée d'une capsid protéique et d'un ARN interne tous deux perméables à des flux externes comme le démontre des expériences d'électrocinétique. Ces observations ont contribué à remettre en question l'évaluation des propriétés de surface des virus telle qu'elle a toujours été admise, notamment les concepts associés au potentiel zêta (charge de surfaces 'dures') engendrant d'importantes approximations. Dans l'état actuel des choses, les virus sont comparés par rapport à leurs valeurs de pI qui cependant sont biaisés par la méthode de mesure et ne représentent que le signe de la charge électrostatique virale dans une zone de pH définie.

Le travail présenté dans ce mémoire se divise en plusieurs parties. La première qui consiste à valider l'hypothèse formulée par Langlet et al. (2008a) à savoir caractériser l'impact du génome sur les propriétés interfaciales du bactériophage MS2. Pour cela nous avons effectué une comparaison des profils électrocinétiques et des profils d'agrégation du phage MS2 et des VLPs correspondantes à ce phage dépourvues de génome. Ces mesures ont été réalisées après purification des virus telle qu'effectuée par Langlet et al. (2008a) dans un milieu aqueux à différentes forces ioniques et différents pH. Suite aux résultats obtenus, nous avons essayé de déterminer l'impact du protocole de purification sur les propriétés interfaciales de ces deux types de particules virales. Dans une seconde partie, nous avons défini l'impact des propriétés

interfaciales sur les capacités d'adhésion virales en utilisant le concept de particules molles multicouches. Le premier aspect consistant à évaluer l'importance de la rugosité, de l'hydrophobicité et des interactions électrostatiques pour l'adhésion sur différents supports abiotiques. Le deuxième aspect consistant à corrélérer les propriétés interfaciales, selon le concept de particules molles à multicouches, de virus à structures variées avec leurs capacités d'adhésion.

Le pI du bactériophage MS2 a été largement mesuré par de nombreux auteurs. Il s'avère qu'il a une valeur variant entre 3,5 et 3,9 (Penrod et *al.*, 1996; Redman et *al.*, 1997; Langlet et *al.*, 2008a). Cependant, la caractérisation des différentes couches constitutives du phage participant à cette valeur de pI n'est pas homogène entre les auteurs. Penrod et *al.* (1996) obtiennent cette valeur uniquement grâce aux acides aminés situés en périphérie de la capside protéique du phage. Cette approche assimile donc les virus à des particules dures et n'est pas en adéquation avec les profils observés lors de la mesure de l'électrocinétique en fonction de la force ionique à savoir la présence d'un plateau non nul à très haute force ionique, typique de la perméabilité de la particule virale (Ohshima, 1995). En accord avec des calculs théorique (Langlet et *al.*, 2008) cette valeur basse de pI reflète la large perméabilité de MS2 au flux électroosmotique développé à l'extérieur et à l'intérieur de la particule lors de sa migration dans le champ électrique pendant la mesure de la mobilité électrophorétique. En effet, le pI du génome du phage MS2 serait de 2,9 et celui de la capside de 9 (Langlet et *al.*, 2008a). Si le phage MS2 était imperméable au flux électrocinétique, la valeur du pI serait donc de 9 ce qui n'est pas observé expérimentalement. La comparaison de l'estimation de la charge électrostatique entre le phage MS2 et les VLPs du phage MS2 se fait donc par l'interprétation de la pente de la courbe de la mobilité électrophorétique en fonction du logarithme de la force ionique. On observe une pente beaucoup plus abrupte pour le phage complet traduisant un rapport plus élevé de densité de charge interne/densité de charge externe confirmant ainsi qu'il y a plus de charge négative à l'intérieur du phage complet. Cependant on ne peut pas affirmer que les VLPs sont entièrement dépourvues de matériel chargé négativement à l'intérieur de leur capside. En effet, les valeurs de mobilités négatives et la présence du plateau à haute force ionique prouvent qu'il y a effectivement certaines charges négatives à l'intérieur de ces particules qui sont sondées par le flux électroosmotique. Peabody et *al.* (2008) montrent que la charge négative des VLPs provient de l'encapsidation d'ARN messager provenant du plasmide lors de leur synthèse. Celui-ci a une taille d'environ 500 nucléotides comparé aux 3560 nucléotides du phage MS2. De plus, cette différence de densité de charge interne conduit à des profils d'agrégation différents. En effet, les phages complets s'agrègent à partir de leur pI

jusqu'à des pH inférieurs quelle que soit la force ionique alors que les VLPs ne s'agrègent qu'à la valeur de leur pI à basse force ionique. Les VLPs ne suivent donc pas le schéma classique selon la théorie de la DLVO sur la stabilité des particules colloïdales. Cette théorie prédit que pour une suspension à particules neutres, les particules sont instables et peuvent s'agréger mais également que l'augmentation de la force ionique entraîne une compression des doubles couches électriques autour des colloïdes qui engendrerait une diminution importante des forces répulsives et donc l'agrégation des particules. Ainsi, pour expliquer le comportement particulier des VLPs, nous raisonnons selon la théorie récente développée par Duval et *al.* (2011) prédisant la magnitude des interactions électrostatiques entre particules à multicouches concentriques portant différentes propriétés. En effet, ces auteurs montrent que le signe et la magnitude des interactions électrostatiques entre des particules molles à multicouches sont déterminées par les propriétés de charge des couches localisées dans la zone de l'ordre de la longueur de Debye (κ^{-1}). Cette longueur reflète la distance des interactions électrostatiques entre les particules ou de manière équivalente les caractéristiques de la double couche électrique autour (ou à l'intérieur) des particules. La longueur de Debye va fortement dépendre de la force ionique. En prenant pour exemple le phage MS2, le diamètre de la couche constituée par l'ARN interne est de $\delta_1 \sim 11,3$ nm et l'épaisseur de la capsid de $\delta_2 \sim 2,1$ nm (Langlet et *al.*, 2008a). La contribution de la couche interne (ARN) dans la détermination des forces répulsives autour de la particule virale va dépendre de la valeur $\kappa\delta_2$. Ainsi, les interactions électrostatiques entre les VLPs vont dépendre de la nature des groupes fonctionnels localisés au niveau de la capsid pour des conditions $\kappa\delta_2 \gg 1$ classiquement observées à haute force ionique. Lorsque $\kappa\delta_2 \ll 1$, les interactions électrostatiques sont déterminées par les éléments situés au niveau de la couche interne. A 100 mM, conditions dans lesquelles la double couche électrique n'est étendue uniquement qu'à la couche périphérique ($\kappa\delta_2 \sim 2,2$), la magnitude des forces répulsives dans la gamme de pH étudiée (2,5 à 7) est apparemment suffisante pour contrebalancer les forces attractives et ainsi empêcher l'agrégation. Lorsque la force ionique diminue, la double couche électrique diminue ($\kappa\delta_2 \sim 0,2$) et fait intervenir les charges négatives internes de manière majoritaire par rapport à la capsid externe. D'après la théorie de Duval et *al.* (2011), pour des valeurs de pH inférieures et supérieures au pI pour lesquelles les éléments intérieurs sont positivement et négativement chargés, respectivement, les VLPs vont subir d'importantes répulsions. Ceci favorise ainsi la stabilité des suspensions VLPs contre l'agrégation et l'apparition de cette agrégation pour des valeurs correspondantes à ce pI .

Ces différences de comportement entre MS2 et VLPs-MS2 conduisent à remettre en question l'utilisation des VLPs de *Norovirus* comme modèles fiables pour étudier le comportement de ces derniers. Néanmoins, d'autres auteurs montrent une similarité de comportement entre les propriétés interfaciales de ces deux particules (Nguyen et *al.*, 2011). Il s'avère que la principale différence entre notre étude et cette dernière est la méthode de purification des virus avant l'évaluation des propriétés interfaciales. En effet, nos particules virales ont été purifiées suite à une dialyse tandis que celles de Nguyen et *al.* (2011) ont été purifiées par précipitation au polyéthylène glycol (PEG). Pour caractériser cet impact de la méthode de purification nous avons comparé nos deux particules virales issues de trois protocoles distincts de purification, les deux cités plus haut et un troisième classiquement utilisé dans la littérature pour la purification de virus, le gradient de chlorure de césium (Penrod et *al.*, 1996; Redman et *al.*, 1997; Tollefson et *al.*, 2007; Gias et *al.*, 2008). Les résultats obtenus suite à la méthode au PEG sont semblables à ceux de Nguyen et *al.* (2011) à savoir qu'il n'y a pas de différence observée entre MS2 et les VLPs-MS2 en termes d'électrocinétique. En effet, on suppose que la présence du PEG en solution rajoute une troisième couche autour des particules virales par liaison avec les protéines de capsid (Chamow et *al.*, 1994; Veronese et *al.*, 2001; Roberts et *al.*, 2002) qui contribuerait à les rendre semblables d'un point de vue électrocinétique par écrantage hydrodynamique de leurs parties internes respectives. Le rayon hydrodynamique observé lors de la mesure de la taille des particules après précipitation au PEG est aux alentours de 40-60 nm (diamètre des particules virales 20-30 nm). Les valeurs obtenues en mobilité électrophorétique en fonction de la force ionique sont donc semblables entre les particules virales complètes et les particules synthétiques et sont nettement inférieures aux valeurs d'électrocinétique obtenues pour MS2 pour les deux autres méthodes, traduisant une impossibilité de sonder le génome. En termes d'agrégation, nous observons cependant une différence entre les deux types de particules contrairement à Nguyen et *al.* (2011) qui ont étudié l'adhésion en fonction du temps à une valeur de pH donné et non fonction du pH. Ainsi, nos résultats indiquent que le phage MS2 est agrégé de pH 6 à pH 2,5 quelle que soit la force ionique alors que les VLPs s'agrègent uniquement aux alentours du *pI* à faible force ionique. Le comportement des VLPs peut être expliqué par la théorie selon Duval et *al.* (2011) décrite plus haut. Qualitativement, le comportement des virus complets est le même que décrit précédemment mais le phénomène d'agrégation apparaît pour des valeurs de pH plus élevées de même pour les VLPs qui cette fois s'agrègent à pH 4 et pas 3. En effet la présence de la couche supplémentaire de PEG pourrait favoriser le rapprochement avec les particules voisines par formation de liaisons hydrogènes ou par attractions hydrophobes des molécules de PEG. Les

deux autres protocoles engendrent bel et bien des différences de comportement entre ces deux types de particules avec une différence beaucoup plus prononcée entre MS2 et VLPs-MS2 en électrocinétique lorsque les particules sont purifiées par gradient de chlorure de césium. On suggère d'après ces résultats qu'après la dialyse, il reste certaines protéines contaminantes qui seraient éliminées par stricte sélection des particules virales lors du gradient. Ceci expliquerait également l'absence d'agrégation lorsque les particules sont purifiées par gradient de chlorure de césium. Pour aller plus loin dans la caractérisation de l'impact du protocole de purification des particules virales, des expériences de diffusion à rayons X (SAXS, small angle X-ray scattering) aux petits angles ont été réalisées sur les particules purifiées selon les trois méthodes de purification pour confirmer les résultats et les différentes hypothèses émises.

La charge électrostatique et le caractère hydrophobe des bactériophages vont naturellement impacter leurs capacités d'adhésion à différentes surfaces. Ce processus d'adhésion est tout d'abord conditionné par les propriétés de surface du support lui-même en termes de charge de surface, de rugosité et de balance hydrophile/hydrophobe. Nous avons donc évalué la relation intrinsèque existant entre les propriétés interfaciales de trois bactériophages ARN F-spécifiques à différents degrés d'hydrophobicité et leurs profils d'adhésion sur différents supports variant en termes de rugosité et de balance hydrophile/hydrophobe. Pour cela, la rugosité et l'hydrophobicité des supports ont été caractérisées par microscopie à force atomique (AFM) et microscopie à force chimique (CFM). En parallèle, la charge électrostatique, les profils d'agrégation et le degré d'hydrophobicité ont été évalués pour les phages MS2, GA et Q β . L'adhésion des phages est évaluée à des conditions favorables (faible force ionique) mais aussi non favorables (haute force ionique) à la répulsion des interactions électrostatiques et en absence totale d'agrégation des phages. L'étude des propriétés de surface des supports étudiés donne la séquence suivante pour l'hydrophobicité Polypropylène > Inox > Verre et la séquence suivante pour la rugosité Inox > Polypropylène > verre. L'aspect de l'électrostatique a été largement étudié dans des expériences d'adhésion virales, nos résultats à faible force ionique sont en adéquation avec la littérature avec une diminution de la capacité d'adhésion par répulsion électrostatique entre des virus et des supports tous deux chargés négativement. Cependant, nos expériences mettent également en valeur l'impact de deux autres paramètres dans le phénomène d'adhésion des phages: l'hydrophobicité des phages ainsi que des supports et la rugosité des supports. En effet, les résultats démontrent une corrélation avec l'hydrophobicité des phages à savoir que le phage le plus hydrophobe GA adhère le plus sur les supports hydrophobes lorsque l'analyse est faite dans des conditions de forte force ionique excluant tout effet électrostatique et

ne mettant en évidence de ce fait que les caractères hydrophobes des virus et des supports. Ces résultats confirment la séquence de Langlet et *al.* (2008b) obtenue par des profils d'agrégation des phages $GA > Q\beta > MS2$. De plus la séquence d'hydrophobicité des phages est corrélée à leurs capacités d'adhésion sur tous les supports étudiés mettant en évidence que le caractère hydrophobe des virus gouverne clairement leur adhésion quelle que soit la surface dans les conditions où l'impact de l'électrostatique est minime. Cet aspect a également été observé chez les bactéries, le caractère hydrophobe favorise l'adhésion à la fois sur les supports hydrophobes et hydrophiles (Liu et *al.*, 2004). De même la rugosité des supports a un impact sur l'adhésion en augmentant le nombre de phages adhérents par rapport à des supports plus homogènes. En effet, nous observons une adhésion plus importante sur l'inox que sur le support en verre, tous deux étant hydrophiles. Ces observations sont également en adéquation avec des données observées chez les bactéries (Flint et *al.*, 2000; Bruinsma et *al.*, 2003) mais aussi avec des modèles (Katainen et *al.*, 2006).

Afin de mettre en évidence l'impact de la structure interfaciale des bactériophages sur leur capacité d'adhésion, nous avons également choisi d'étudier les propriétés interfaciales (charge et hydrophobicité) de trois phages à structures complètement différentes et ensuite essayer de corréler celles-ci avec leurs capacités d'adhésion. Le phage MS2 avec sa capside à pores et son génome partiellement accolé à la capside, le phage Phi X 174 constitué d'une capside sans pore et d'un génome dont la taille est à peu près équivalente à celle du phage MS2 et enfin le phage PRD1 constitué d'une capside, d'une membrane interne et d'un génome largement plus grand que celui des deux autres phages. Les résultats de mobilité en fonction du logarithme de la force ionique révèlent que le bactériophage ayant la charge effective la plus négative est le bactériophage MS2. Les profils de mobilités sont presque semblables entre Phi X 174 et PRD1 mais nous pouvons émettre l'hypothèse que le bactériophage PRD1 serait chargé plus négativement que Phi X 174 du à son plus gros diamètre qui tendrait à réduire sa mobilité électrophorétique. On en déduit donc la séquence $\text{Phi X 174} < \text{PRD1} < \text{MS2}$ en termes de charge. Ces résultats s'avèrent être fortement en adéquation avec les résultats d'adhésion sur les membranes positives et négatives. Cette approche reste néanmoins strictement qualitative et devrait être approfondie par une caractérisation structurale précise des différents bactériophages utilisés à savoir leur degré de perméabilité et la distribution radiale de densité des différentes couches constituant ces phages (Langlet et *al.*, 2008a). Ces résultats démontrent cependant que les valeurs de points isoélectriques pour ces phages, pouvant être très similaires selon la méthode

de mesure (Michen et Graule, 2010) ne peuvent en aucun cas refléter les différences de charges électrostatiques observées et ainsi les différences de capacité d'adhésion.

Ainsi, notre étude apporte une avancée significative dans la perception des virus tels qu'étant des particules molles, perméables et fortement hétérogènes. En effet, actuellement, dans la communauté scientifique, cette notion reste extrêmement récente concernant ces particules biologiques. Le premier aspect significatif des résultats apportés par ce travail est l'impact du génome sur les propriétés interfaciales du bactériophage MS2 et donc la mise en évidence claire du caractère perméable de ce phage conduisant ainsi à la non-applicabilité d'une charge de surface stricte et donc d'une valeur de potentiel zêta pour caractériser la charge de cette particule phagique. Le deuxième aspect apporté par ce travail est l'inadéquation des valeurs de points isoélectriques pour estimer la charge électrostatique d'une particule virale telle qu'elle est perçue lors de phénomène d'adhésion. Cependant, dans la communauté virologue, cette valeur reste encore le critère de comparaison entre les différents virus. Notre approche reste strictement qualitative mais s'avère être en bonne corrélation avec les capacités d'adhésion. Néanmoins, l'aspect quantitatif des propriétés des phages pourrait être amélioré par l'utilisation de techniques innovantes, par exemple la microscopie à force atomique pour caractériser et quantifier les interactions électrostatiques et hydrophobes par la fonctionnalisation de pointes AFM avec des groupements chargés ou hydrophobes. De plus, cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de paramètres nécessaires à prendre en compte dans des cas d'adhésion virale, notamment la rugosité des surfaces, paramètre déjà étudié pour l'adhésion d'autres particules biologiques telles que les bactéries.

Ainsi, les résultats fondamentaux de ce travail soulignent l'importance de la structure virale entière dans les propriétés interfaciales qui vont ensuite conditionner le comportement de ces virus dans l'environnement. Cette thèse aboutit à une meilleure caractérisation de la notion « d'interphase » chez les virus remettant en cause la théorie de la DLVO.

Références bibliographiques

1. **Abrescia NGA, Cockburn JJB, Grimes JM, Sutton GC, Diprose JM, Butcher SJ, Fuller SD, San Martín C, Burnett RM, Stuart DI, Bamford DH, Bamford JKH** (2004). Insights into assembly from structural analysis of bacteriophage PRD1. *Nature* 432: 68-74.
2. **Ackermann HW** (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology* 152: 227-243.
3. **Ackermann HW** (2009). Phage classification and characterization. *Methods in Molecular Biology* 501: 127-140.
4. **Ahimou F, Paquot M, Jacques P, Thonart P, Rouxhet PG** (2001). Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods* 45: 119-126.
5. **Allwood P, Malik Y, Hedberg C, Goyal S** (2004). Effect of temperature and sanitizers on the survival of feline calicivirus, *Escherichia coli*, and F-specific coliphage MS2 on leafy salad vegetables. *Journal of Food Protection* 67: 1451-1456.
6. **Aoyama A, Hamatake RK, Hayashi M** (1981). Morphogenesis of phi X174: in vitro synthesis of infectious phage from purified viral components. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 78: 7285-7289.
7. **Aronino R, Dlugy C, Arkhangelsky E, Shandalov S, Oron G, Brenner A, Gitis V** (2009). Removal of viruses from surface water and secondary effluents by sand filtration. *Water Research* 43: 87-96
8. **Attinti R, Wei J, Kniel K, Sims JT, Jin Y** (2010). Virus' (MS2, phiX174, and Aichi) attachment on sand measured by atomic force microscopy and their transport through sand columns. *Environmental Science & Technology* 44: 426-432
9. **Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS, Middaugh CR** (2006). Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry* 281: 19478-19488.
10. **Baert L, Debevere J, Uyttendaele M** (2009). The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *International Journal of Food Microbiology* 131: 83-94.
11. **Bales RC, Li S, Maguire KM, Yahya MT, Gerba CP** (1993). MS-2 and poliovirus transport in porous media: hydrophobic effects and chemical perturbations. *Water Resources Research* 29: 957-963.

12. **Ball JM, Hardy ME, Atmar RL, Conner ME, Estes MK** (1998). Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Journal of Virology* 72: 1345-1353.
13. **Baric RS, Yount B, Lindesmith L, Harrington PR, Greene SR, Tseng F, Davis N, Johnston RE, Klapper DG, Moe CL** (2002). Expression and Self-Assembly of Norwalk Virus Capsid Protein from Venezuelan Equine Encephalitis Virus Replicons. *Journal of Virological Methods* 76: 3023-3030.
14. **Barrabeig I, Rovira A, Buesa J, Bartolome' R, Pinto' R, Prellezo H, Domínguez A** (2010). Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler. *BMC Infectious Diseases* 10: 269.
15. **Benson SD, Bamford JKH, Bamford DH, Burnett RM** (1999). Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structures. *Cell* 98: 825-833.
16. **Black EP, Cascarino J., Guana D, Kniel KE, Hicks DT, Pivarnik LF, Hoover DG** (2010). Coliphage as pressure surrogates for entericviruses in foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11: 239–244.
17. **Bollback JP, Huelsenbeck JP** (2001). Phylogeny, genome evolution, and host specificity of single-stranded RNA bacteriophage (family *Leviviridae*). *Journal of Molecular Evolution* 52: 117-128.
18. **Borrego JJ, Cornax R, Morinigo MA, Martinez-Manzanares E, Romero P** (1990). Coliphages as an indicator of faecal pollution in water. their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Water Research* 24: 111-116.
19. **Boudaud N, Machinal C, David F, Fréval-Le Bourdonnec A, Jossent J, Bakanga F, Arnal C, Jaffrezic MP, Oberti S, Gantzer C** (2012). Removal of MS2, Q β , and GA bacteriophages during drinking water treatment at pilot scale. *Water Research* 46: 2651-2664
19. **Brorson K, Shen H, Lute S, Pérez JS, Frey DD** (2008). Characterization and purification of bacteriophages using chromatofocusing. *Journal of Chromatography A* 1207: 110-121.
20. **Bruinsma GM, M. R-A, de Vries J, Busscher HJ, van der Linden ML, Hooymans JM, van der Mei HC** (2003). Multiple surface properties of worn RGP lenses and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomaterials* 24: 1663-1670.
21. **Buisson Y, Nicand E** (2005). Vaccination contre l'hépatite A. *EMC-Hépatogastroentérologie* 2: 75-85.

22. **Busscher HJ, van de Belt-Gritter B, van der Mei HC** (1995). Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5: 111-116.
23. **Butler PJ** (1984). The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus. *Journal of General Virology* 65: 253-279.
24. **Caspar DL, Klug A** (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 27: 1-24.
25. **Chamow SC, Kogan TP, Venuti M, Gadek T, Harris RJ, Peers DH, Mordenti J, Shak S, Ashkenazi A** (1994). Modification of CD4 Immunoaderin with Monomethoxypoly(Ethylene Glycol) Aldehyde Via Reductive Alkylation. *Bioconjugate Chemistry* 5: 133-140.
26. **Childs JD, Birnboim HC** (1975). Polyacrylamide gel electrophoresis of intact bacteriophage T4D particles. *Journal of Virology* 16: 652-661.
27. **Collins KE, Cronin AA, Rueedi J, Pedley S, Joyce E, Humble PJ, Tellam JH** (2006). Fate and transport of bacteriophage in UK aquifers as surrogates for pathogenic viruses. *Engineering Geology* 85: 33-38.
28. **Curtiss LK, Krueger RG** (1974) Localization of coliphage MS2 A-protein. *Journal of Virology* 14: 503-508.
29. **Dague E, Duval JFL, Jorand F, Thomas F, Gaboriaud F** (2006). Probing surface structures of *Shewanella spp.* by microelectrophoresis. *Biophysical Journal* 90: 2612-2621.
30. **Deboosere N, Pinon A, Caudrelier Y, Delobel A, Merle G, Perelle S, Temmam S, Loutreul J, Morin T, Estienney M, Belliot G, Pothier P, Gantzer C, Vialette M** (2012). Adhesion of human pathogenic entericviruses and surrogateviruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiology* 32: 48-56.
31. **Derjaguin BV, Landau L** (1941). *Acta Physico-Chimica Sinica* 14: 633-662
32. **Dingle KE, Lambden PR, Caul EO, Clarke IN** (1995). Human enteric Caliciviridae: the complete genome sequence and expression of virus-like particles from a genetic group II small round structured virus. *Journal of General Virology* 76: 2349-2355.
33. **Dokland T, Bernal RA, Burch A, Pletnev S, Fane BA, Rossmann MG** (1999). The role of scaffolding proteins in the assembly of the small, single-stranded DNA virus ϕ X174. *Journal of Molecular Biology* 288: 595-608.
34. **Douglas HW, Williams BL, Rondle CJM** (1969). Micro-electrophoresis of Pox Viruses in Molar Sucrose. *Journal of General Virology* 5: 391-396.

35. **Dowd SE, Pillai SD, Wang S, Corapcioglu MY** (1998). Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 405-410.
36. **Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK** (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology* 85: 79-87.
37. **Duval JFL, Ohshima H** (2006). Electrophoresis of diffuse soft particles. *Langmuir* 22: 3533-3546.
38. **Duval JFL, Gaboriaud F** (2010). Progress in electrohydrodynamics of soft microbial particle interphases. *Current Opinion in Colloid & Interface* 15: 184-195.
39. **Duval JFL, Merlin J, Narayana PAL** (2011). Electrostatic interactions between diffuse soft multi-layered (bio)particles: beyond Debye-Huckel approximation and Deryagin formulation. *Physical Chemistry Chemical Physics* 13: 1037-1053.
40. **EFSA** (2011). The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2009. *EFSA Journal* 9: 2090.
41. **Estes MK, Ball JM, Guerrero RA, Opekun AR, Gilger MA, Pacheco SS, Graham DY** (2000). Norwalk virus vaccines: challenges and progress. *Journal of Infectious Diseases* 181: S367-S373.
42. **Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA** (2005). Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press.
43. **Feng YY, Ong SL, Hu JY, Tan XL, Ng WJ** (2003). Effects of pH and temperature on the survival of coliphages MS2 and Q β . *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30: 549-552
44. **Flint SH, Brooks JD, Bremer PJ** (2000). Properties of the stainless steel next term previous term steel next term substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food engineering* 43: 235-242.
45. **Floyd R, Sharp DG** (1978). Viral aggregation: quantitation and kinetics of the aggregation of poliovirus and reovirus. *Applied and Environmental Microbiology* 35: 1079-1083.
46. **Fraisse A, Temmam S, Deboosere N, Guillier L, Delobel A, Maris P, Vialette M, Morin, Perelle S** (2011). Comparison of chlorine and peroxyacetic-based disinfectant to inactivate Feline calicivirus, Murine norovirus and Hepatitis A virus on lettuce. *International Journal of Food Microbiology* 151: 98–104.

47. **Fujioka RS, Yoneyama BS** (2002). Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. In: Asian Waterqual 2001: IWA Asia-Pacific Regional Conference, Fukuoka, Japan.
48. **Gassilloud B, Gantzer C** (2005). Adhesion-aggregation and inactivation of poliovirus 1 in groundwater stored in a hydrophobic container. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 912-920.
49. **Gerba CP** (1984). Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Advances in Applied Microbiology* 30: 133-168.
50. **Gias E, Nielsen SU, Morgan LAF, Toms GL** (2008). Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation in iodixanol density gradient. *Journal of Virological Methods* 147: 328-332.
51. **Golmohammadi R, Valegard K, Fridborg K, Liljas L** (1993). The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 234: 620-639.
52. **Goodridge L, Goodridge C, Wu J, Griffiths M, Pawliszyn J** (2004). Isoelectric point determination of norovirus virus-like particles by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. *Analytical Chemistry* 76: 48-52.
53. **Grahn AM, Haase J, Lanka E, Bamford DH** (2002). Assembly of a functional phage PRD1 receptor depends on 11 genes of the IncP plasmid mating pair formation complex. *Journal of Bacteriology* 179: 4733-4740.
54. **Guerrero ML, Noel JS, Mitchell DK, Calva JJ, Morrow AL, Martinez J, Rosales G, Velazquez FR, Monroe SS, Glass RI, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM** (1998). A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatric Infectious Disease Journal* 17: 723-727.
55. **Gust ID** (1992). A vaccine against hepatitis A--at last. *Medical Journal of Australia* 157: 345-346.
56. **Hänninen AL, Bamford DH, Bamford JKH** (1997). Assembly of membrane-containing bacteriophage PRD1 is dependent on GroEL and GroES. *Virology* 227: 207-210.
57. **Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis BL, Naud P, De Carvalho NS, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint WG, Dubin G** (2004). Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *The Lancet* 364: 1757-1765.

58. **Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, Rose JB** (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3163-3170.
59. **Hayashi MN, Yaghamai R, McConnell M, Hayashi M** (1989). mRNA stabilizing signals encoded in the genome of the bacteriophage phi x174. *Molecular Genetics & Genomics* 216: 364-371.
60. **Heisenberg M** (1966). Formation of defective bacteriophage particles by fr amber mutants. *Journal of Molecular Biology* 17: 136-144.
61. **Hermansson M** (1999). The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14: 105-119.
62. **Horká M, Kubíček O, Ruzicka F, Holá V, Malinová I, Slais K** (2007). Capillary isoelectric focusing of native and inactivated microorganisms. *Journal of Chromatography A* 1155: 164-171.
63. **Horman A, Rimhanen-Finne R, Maunula L, von Bonsdorff CH, Torvela N, Heikinheimo A, Hanninen ML** (2004). *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 87-95.
64. **Hughes MP, Morgan H, Rixon FJ** (2002). Measuring the dielectric properties of herpes simplex virus type 1 virions with dielectrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1571: 1-8.
65. **Israelachvili JN** (1992). *Intermolecular and surface forces*, 2nd edn. Academic Press, London.
66. **Jiang S, Noble R, Chu W** (2001). Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 179-184.
67. **Jiang X, Wang M, Graham DY, Estes MK** (1992). Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J Virol* 66: 6527-6532.
68. **Jin Y, Chu Y, Li Y** (2000). Virus removal and transport in saturated and unsaturated sand columns. *Journal of Contaminant Hydrology* 43: 111-128.
69. **Jin Y, Flury M** (2002). Fate and transport of viruses in porous media. *Advances in Agronomy* 77: 39-102.
70. **Jofre J** (2009). Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? *Journal of Applied Microbiology* 106: 1059-1069.

71. **Johnson JE, Speir JA** (1997). Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies. *Journal of Molecular Biology* 269: 665-675.
72. **Katainen J, Paajanen M, Ahtola E, Pore V, Lahtinen J** (2006). Adhesion as an interplay between particle size and surface roughness. *Journal of Colloid and Interface Science* 304: 524-529.
73. **Kitamoto N, Tanaka T, Natori K, Takeda N, Nakata S, Jiang X, Estes MK** (2002). Cross-reactivity among several recombinant calicivirus virus-like particles (VLPs) with monoclonal antibodies obtained from mice immunized orally with one type of VLP. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 2459-2465.
74. **Klovins J, Overbeek GP, van den Worm SH, Ackermann HW, van Duin J** (2002). Nucleotide sequence of a ssRNA phage from *Acinetobacter*: kinship to coliphages. *Journal of General Virology* 83: 1523-1533.
75. **Knappett PS, Emelko MB, Zhuang J, McKay LD** (2008). Transport and retention of a bacteriophage and microspheres in saturated, angular porous media: effects of ionic strength and grain size. *Water Research* 42: 4368-4378.
76. **Koopmans M, Duizer E** (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90: 23-41.
77. **Korant BD, Lonberg-Holm K, Yin FH, Noble-Harvey J** (1975). Fractionation of biologically active and inactive populations of human rhinovirus type 2. *Virology* 63: 384-394.
78. **Kos B, Susković J, Vuković S, Simpraga M, Frece J, Matosić S** (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94: 981-987.
79. **Kukavica-Ibrulj I, Darveau A, Jean J, Fliss I** (2004). Hepatitis A virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *Journal of Applied Microbiology* 97: 923-934.
80. **Langlet J, Gaboriaud F, Gantzer C, Duval JFL** (2008a). Impact of chemical and structural anisotropy on the electrophoretic mobility of spherical soft multilayer particles: the case of bacteriophage MS2. *Biophysical Journal* 94: 3293-3312.
81. **Langlet J, Gaboriaud F, Duval JFL, Gantzer C** (2008b). Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: Implication for membrane filtration processes. *Water Research* 42: 2769-2777.

82. **Langlet J** (2008c) Propriétés interfaciales des bactériophages ARN F-spécifiques: Implication lors des processus d'adhésion-agrégation. Thèse, Université Henri Poincaré-Nancy I.
83. **Legendre D, Fastrez J** (2005). Production in *Saccharomyces cerevisiae* of MS2 virus-like particles packaging functional heterologous mRNAs. *Journal of Biotechnology* 117: 183-194.
84. **Lima SM, Vaz AC, Souza TL, Peabody DS, Silva JL, Oliveira AC** (2006). Dissecting the role of protein-protein and protein-nucleic acid interactions in MS2 bacteriophage stability. *FEBS Journal* 273: 1463-1475.
85. **Lin MY, Lindsay HM, Weitz DA, Ball RC, Klein R, Meakin P** (1989). Universality in colloid aggregation. *Nature* 339: 360-362.
86. **Loisy F, Atmar RL, Guillon P, Le Cann P, Pommepuy M, Le Guyader FS** (2004). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods* 123: 1-7.
87. **Loveland JP, Ryan JN, Amy GL, Harvey RW** (1996). The reversibility of virus attachment to mineral surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect* 107: 205-221.
88. **Lukasik J, Scott TM, Andryshak D, Farrah SR** (2000). Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2914-2920.
89. **Lytle CD, Routson LB** (1995). Minimized virus binding for tests of barrier materials. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 643-649.
90. **Lytle CD, Routson LB, Jain NB, Myers MR, Green BL** (1999). Virus passage through track-etch membranes modified by salinity and a nonionic surfactant. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2773-2775.
91. **Mackiewicz V, Roque-Afonso AM, Dussaix E** (2006). HépatiteA: De l'évidence au piège diagnostique. *Revue Française des Laboratoires* 2006: 51-56.
92. **Malescio G** (2003) .Intermolecular potentials - past, present, future. *Nature Materials* 2: 501-503.
93. **Mandel B** (1971). Characterization of type 1 poliovirus by electrophoretic analysis. *Virology* 44: 554-568.
94. **Mastico RA, Talbot SJ, Stockley PG** (1993). Multiple presentation of foreign peptides on the surface of an RNA-free spherical bacteriophage capsid. *Journal of General Virology* 74: 541-548.

95. **Mattle MJ, Crouzy B, Brennecke M, Wigginton KR, Perona P, Kohn T** (2011). Impact of Virus Aggregation on Inactivation by Peracetic Acid and Implications for Other Disinfectants. *Environmental Science & Technology* 45: 7710–7717.
96. **Maunula L, Miettinen IT, von Bonsdorff CH** (2005). Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerging Infectious Diseases journal* 11: 1716-1721.
97. **Maunula L, Roivainen M, Keränen M, Mäkelä S, Söderberg K, Summa M, von Bonsdorff CH, Lappalainen M, Korhonen T, Kuusi M, Niskanen T** (2009). Detection of human Norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Euro Surveillance* 14: 19435
98. **McKay LD, Harton AD, Wilson GV** (2002). Influence of flow rate on transport of bacteriophage in shale saprolite. *Journal of Environmental Quality* 31: 1095-1105.
99. **Michen B, Graule T** (2010). Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology* 109: 388-397.
100. **Mix TW** (1974). The physical chemistry of membrane–virus interaction. *Developments in Industrial Microbiology* 15: 136-142.
101. **Mouillot L, Netter R** (1977). Identification of Orthopox virus by isoelectrofocusing in a granulated gel. *Annales de Microbiologie* 128: 417-419.
102. **Murray JP, Parks GA** (1980). Poliovirus adsorption on oxide surfaces: correspondence with the DLVO-Lifshitz theory of colloid stability. American Chemical Society, Washington
103. **Nguyen TH, Easter N, Gutierrez L, Huyett L, Defnet E, Mylon SE, Ferri JK, Ai Viet N** (2011). The RNA core weakly influences the interactions of the bacteriophage MS2 at key environmental interfaces. *Soft Matter* 7: 10449-10456.
104. **Nicand E, Bigaillon C, Tessé S** (2008). HépatiteE : maladieémergente ? *Pathologie Biologie* 57: 203-211.
105. **Ninham BW** (1999). On progress in forces since the DLVO theory. *Advances in Colloid and Interface Science* 83: 1-17.
106. **O'Callaghan R, Bradley R, Paranchych W** (1973). Controlled alterations in the physical and biological properties of R17 bacteriophage induced by gunaidine hydrochloride. *Virology* 54: 476-494.
107. **Ohshima H** (1995). Electrophoresis of soft particles. *Advances in Colloid and Interface Science* 62: 189-235.

108. **Overby LR, Barlow GH, Doi RH, Jacob M, Spiegelman S** (1966). Comparison of two serologically distinct ribonucleic acid bacteriophages. I. Properties of the viral particles. *Journal of Bacteriology* 91: 442-448.
109. **Paul JH, Kellogg CA** (2000). Ecology of Bacteriophages in Nature. *Viral Ecology*: 211–246.
110. **Peabody D, Manifold-Wheeler B, Medford A, Jordan S, do Carmo Caldeira J, Chackerian B** (2008). Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2. *Journal of Molecular Biology* 380: 252-263.
111. **Penrod SL, Olson TM, Grant SB** (1995). Whole Particle Microelectrophoresis for Small Viruses. *Journal of Colloid and Interface Science* 173: 521-523.
112. **Penrod SL, Olson TM, Grant SB** (1996). Deposition Kinetics of Two Viruses in Packed Beds of Quartz Granular Media. *Langmuir* 12: 5576-5587
113. **Pham M, Mintz EA, Nguyen TH** (2009). Deposition kinetics of bacteriophage MS2 to natural organic matter: Role of divalent cations. *Journal of Colloid and Interface Science* 338: 1-9.
114. **Pickett GG, Peabody DS** (1993). Encapsidation of heterologous RNAs by bacteriophage MS2 coat protein. *Nucleic Acids Research* 21: 4621-4626.
115. **Prasad BV, Hardy ME, Dokland T, Bella J, Rossmann MG, Estes MK** (1999). X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science* 286: 287-290.
116. **Priano C, Arora R, Butke J, Mills DR** (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: 283-297.
117. **Purcell RH, Emerson SU** (2008). Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *Journal of Hepatology* 48: 494-503.
118. **Redman JA, Grant SB, Olson TM, Hardy ME, Estes MK** (1997). Filtration of recombinant norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions. *Environmental Science & Technology* 31: 3378-3383.
119. **Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM** (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 459-476.
120. **Rossmann MG, Abad-Zapatero C, Erickson JW, Savithri HS** (1989). RNA-protein interactions in some small plant viruses. *J Biomol Struct Dynam* 1: 565–579.

121. **Rydman PS, Caldentey J, Butcher SJ, Fuller SD, Rutten T, Bamford DH** (2001). Bacteriophage PRD1 contains a labile receptor-binding structure at each vertex. *Journal of Molecular Biology* 291: 575-587.
122. **Salo RJ, Mayor HD** (1978). Isoelectric focusing of parvoviruses. *Intervirology* 10: 87-93.
123. **Santi L, Huang Z, Mason H** (1996). Virus like particles production in green plants. *Methods* 40: 66–76
124. **Savilahti H, Bamford DH** (1993). Protein-primed DNA replication: Role of inverted terminal repeats in the Escherichia coli bacteriophage PRD1 life cycle. *Journal of Virology* 67: 4696-4703.
125. **Schaldach CM, Bourcier WL, Shaw HF, Viani BE, Wilson WD** (2006). The influence of ionic strength on the interaction of viruses with charged surfaces under environmental conditions. *Journal of Colloid and Interface Science* 294: 1-10.
126. **Schaper M, Jofre J** (2000). Comparison of methods for detecting genotypes of F-specific RNA bacteriophages and fingerprinting the origin of faecal pollution in water samples. *Journal of Virological Methods* 89: 1-10.
127. **Schijven JF, Hassanizadeh M** (2000). Removal of Viruses by Soil Passage: Overview of Modeling, Processes, and Parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30: 49-127.
128. **Schijven JF, Hassanizadeh SM, de Bruin HA** (2002). Column experiments to study nonlinear removal of bacteriophages by passage through saturated dune sand. *Journal of Contaminant Hydrology* 58: 243-259.
129. **Schwartzbrod L** (1991) Virus et milieu hydrique. In : *Virologie des milieux hydriques*. In: Lavoisier TD (ed), Paris, pp 1-33.
130. **Shellenberger K, Logan BE** (2002). Effect of Molecular Scale Roughness of Glass Beads on Colloidal and Bacterial Deposition. *Environmental Science and Technology* 36: 184 -189.
131. **Shiba T, Suzuki Y** (1981). Localization of A protein in the RNA-A protein complex of RNA phage MS2. *Biochimica et Biophysica Acta* 654: 249-255.
132. **Shields PA, Farrah SR** (1983). Influence of salts on electrostatic interactions between poliovirus and membrane filters. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 526-531.
133. **Shields PA, Farrah SR** (2002). Characterization of Virus Adsorption by Using DEAE-Sephadex and Octyl- Sepharose. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3965-3968.

134. **Shirasaki N, Matsushita T, Matsui Y, Oshiba A, Ohno K** (2009). Estimation of norovirus removal performance in a coagulation-rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs. *Water Research* 44: 1307-1316.
135. **Sigg L, Behra P, Stumm W** (2006). *Chimie des milieux aquatiques - Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement*, 4ème edn. Sciences Sup.
136. **Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP** (2009). Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1769–1780.
137. **Smith HO, Hutchison III CA, Pfannkoch C, Venter JC** (2003). Generating a synthetic genome by whole genome assembly: ϕ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 15440-15445.
138. **Sobsey M, Hall R, Hazard R** (1995). Comparative reductions of hepatitis A virus, enteroviruses and coliphage MS2 in miniature soil columns. *Water Science and Technology* 31: 203–209.
139. **Strömsten NJ, Bamford DH, Bamford JKH** (2003). The unique vertex of bacterial virus PRD1 is connected to the viral internal membrane. *Journal of Virology* 77: 6314-6321.
140. **Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Estes MK** (2003). Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*: 241-247.
141. **Tars K, Bundule M, Fridborg K, Liljas L** (1997). The crystal structure of bacteriophage GA and a comparison of bacteriophages belonging to the major groups of *Escherichia coli* leviviruses. *Journal of Molecular Biology* 271: 759-773.
142. **Tartera C, Jofre J** (1987). Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1632-1637.
143. **Tartera C, Jofre J, Lucena F** (1988). Relationship between numbers of enteroviruses and bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in different environmental samples. *Environmental Technology Letters* 9: 407-410.
144. **Taylor DH, Bosmann HB** (1981). Measurement of the electrokinetic properties of vaccinia and reovirus by laser-illuminated whole-particle microelectrophoresis. *Journal of Virological Methods* 2: 251-260.
145. **Taylor DH, Moore RS, Sturman LS** (1981). Influence of pH and electrolyte composition on adsorption of poliovirus by soils and minerals. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 976-984.

146. **Thill A** (1999) Agrégation des particules: structure, dynamique et simulation. Application au cas d'un écoulement stratifié : l'estuaire du Rhône. Aix-Marseille 3, Aix-Marseille, p 399.
147. **Tollefson AE, Kuppuswamy M, Shashkova EV, Doronin K, Wold WS** (2007) Preparation and titration of CsCl-banded adenovirus stocks. *Methods in Molecular Medicine* 130: 223-235.
148. **Toropova K, Basnak G, Twarock R, Stockley PG, Ranson NA** (2008). The three-dimensional structure of genomic RNA in bacteriophage MS2: implications for assembly. *Journal of Molecular Biology* 375: 824-836.
149. **Uchiyama A, Fane BA** (2005). Identification of an interacting coat-external scaffolding protein domain required for both the initiation of ϕ X174 procapsid morphogenesis and the completion of DNA packaging. *Journal of Virology* 79: 6751-6756.
150. **Valegård K, Fridborg K, Liljas L** (1994). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the bacteriophage Qbeta. *Acta Crystallographica Section D* 50: 105-109
151. **van Oss CJ** (1996). Forces interfaciales en milieux aqueux. Masson.
152. **van Oss CJ** (2003). Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *Journal of Molecular Recognition* 16: 177-190.
153. **van Voorthuizen EM, Ashbolt NJ, Schafer AI** (2001). Role of hydrophobic and electrostatic interactions for initial enteric virus retention by MF membranes. *Journal of Membrane Science* 194: 69-79.
154. **Veronese FM** (2001). Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials* 22: 405-417.
155. **Verwey EJ, Overbeek JTG** (1948) Theory of the stability of lyophobic colloids. Dover Publications.
156. **Vinje J, Oudejans SJ, Stewart JR, Sobsey MD, Long SC** (2004). Molecular detection and genotyping of male-specific coliphages by reverse transcription-PCR and reverse line blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5996-6004.
157. **Wait DA, Sobsey MD** (2001). Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater. *Water Science and Technology* 43: 139-142
158. **Walshe GE, Pang L, Flury M, Close ME, Flintoft M** (2010). Effects of pH, ionic strength, dissolved organic matter, and flow rate on the co-transport of MS2 bacteriophages with kaolinite in gravel aquifer media. *Water Research* 44: 1255-1269.

159. **Walz JY** (1998). The effect of surface heterogeneities on colloidal forces. *Advances in Colloid and Interface Science* 74: 119-168.
160. **Ward RL** (1978). Mechanism of poliovirus inactivation by ammonia. *Journal of Virology* 26: 299-305.
161. **Westrell T, Dusch V, Ethelberg S, Harris J, Hjertqvist M, Jourdan-da Silva N, Koller A, Lenglet A, Lisby M, Vold L** (2010). Norovirus outbreaks linked to oyster consumption in the United Kingdom, Norway, France, Sweden and Denmark, 2010. *Euro Surveill* 15: 8–11.
162. **WHO/FAO** (2008) *Viruses in Food Scientific Advice to support risk management activities*. 58p.
163. **Wolff MW, Siewert C, Hansen SP, Faber R, Reichl U** (2010) .Purification of cell culture-derived modified vaccinia ankara virus by pseudo-affinity membrane adsorbers and hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 107: 312-320.
164. **Zerda KS** (1982). Adsorption of viruses to charge-modified silica. *Baylor College of Medicine, Houston*.
165. **Zerda KS, Gerba CP** (1984). Agarose isoelectrofocusing of intact virions. *Journal of Virological Methods* 9: 1-6.
166. **Zerda KS, Gerba CP, Hou KC, Goyal SM** (1985). Adsorption of viruses to charge-modified silica. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 91-95.
167. **Zhuang J, Jin Y** (2003). Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: effects of ionic strength and composition. *Journal of Contaminant Hydrology* 60: 193-209.
168. **Zhuang J, Jin Y** (2008). Interactions between viruses and goethite during saturated flow: effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *Journal of Contaminant Hydrology* 98: 15-21.
169. **Ziedaite G, Daugelavičius R, Bamford JKH, Bamford DH** (2005) The holin protein of bacteriophage PRD1 forms a pore for small-molecule and endolysin translocation. . *Journal of Bacteriology* 187: 5397-5405.
170. **Ziedaite G** (2008) *DNA Packaging and Host Cell Lysis: Late Events in Bacteriophage PRD1 Infection*. ACADEMIC DISSERTATION, Helsinki.
171. **Zlotnick A, Aldrich R, Johnson JM, Ceres P, Young MJ** (2000). Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology* 277: 450-456.

Liste des publications

- 1- **C. Dika**, J.F.L. Duval, M. H. Ly-Chatain, C. Merlin, C. Gantzer.
Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: a comparison between MS2 and corresponding VLPs. *Applied environmental Microbiology* 2011, 14: 4939-4948. Impact factor (2011): 3,8
- 2- **C. Dika**, C. Gantzer, A. Perrin and J. F. L. Duval.
Impact of virus purification protocol on aggregation and electrokinetics of MS2 phage and corresponding VLPs. Soumise à *Physical Chemistry Chemical Physics*. Impact factor (2012): 3,57
- 3- **C. Dika**, M. H. Ly-Chatain, G. Francius, J.F.L. Duval and C. Gantzer.
Non-DLVO adhesion of F-specific RNA bacteriophages to abiotic surfaces: Importance of surface roughness, hydrophobic and electrostatic interactions. Soumise à *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Impact factor (2012): 3,35
- 4- **C. Dika**, J.F.L. Duval, A. Perrin and C. Gantzer.
Relation between interfacial properties and adhesion capacities of MS2, Phi X 174 and PRD1: Concept of soft multilayered particles. (Sous correction).

Communications orales

- 5- **C. Dika**, C. Merlin, C. Gantzer.
Influence of internal structures (genome) on surface properties of MS2 phage.
SarlorLux symposium, septembre 2009 (Nancy, France).
- 6- **C. Dika**, L. Tisserant, G. Francius, J.F.L. Duval, C. Gantzer.
Relations entre propriétés interfaciales et capacités d'adhésion/agrégation des bactériophages MS2 et Phi X 174.
Congrès BIOADH, octobre 2011 (Nice, France).
- 7- C. Gantzer, **C. Dika**, J. F. L. Duval.
Determination of surface properties of viral particles: a challenge to explain their fate in aquatic media.
Interface against pollution, juin 2012, Nancy, France.

Communications affichées

- 8- **C. Dika**.
Vulgarisation du sujet de thèse (Propriétés interfaciales des virus).
Doctoriales Lorraine 2011, Ventron, France.
- 9- **C. Dika**, J. F. L. Duval, C. Merlin and C. Gantzer
Impact of genome on aggregation and electrokinetics of MS2 phage, influence of the virus purification protocol.
Interface against pollution 2012, Nancy, France.
- 10- L. Mathieu, **C. Dika**, J. Duval, C. Merlin, F. Gosselin, C. Gantzer.
Biointerfaces de particules molles. Cas des bactériophages ARN F-spécifiques et de *Legionella pneumophila*.
Institut Jean Barriol, Chimie et Physique Moléculaires et Biomoléculaires, octobre 2012, Nancy, France.

Abstract

Outside their host cell, viruses may be considered as inert particles whose behavior is mainly guided by their interphasial physico-chemical properties, in particular their electrostatic charge and their hydrophobic/hydrophilic balance. At present, it is impossible to classify the fate and behavior of viruses according to their sole electrostatic surface charge. Most recently, some authors proposed that viruses should be considered as soft, permeable and highly heterogeneous particles (Biophysical Journal 94, 2008, 3293) instead of simple 'academic' hard spheres. The aim of this work is to characterize the interfacial properties of bacteriophages using the soft multilayer particles concept in order to interrelate appropriately their reactivity (adhesion, aggregation) and their physico-chemical features.

F-specific RNA phages and enteric pathogenic viruses consist of a proteic capsid and a RNA genome. At first, it was demonstrated that the RNA encapsulated by the capsid do have a major impact on the physico-chemical properties of the virus as a whole, in particular its electrophoretic mobility. We further compared for the first time electrohydrodynamic features of MS2 phage with those of the corresponding Virus Like Particles (VLPs, virus particles without RNA) under different pH and ionic strength conditions. In line with theoretical predictions based on the soft particles concept, it is shown that complete phages are more negative than VLPs. The aggregation properties of both types of phages significantly differ with an occurrence of aggregation for VLPs at the isoelectric point and under low ionic strength conditions only, thereby demonstrating the major influence of the genome on stability of viral suspensions. We then analyzed the influence of the virus purification method on the observed differences in terms of stability and electrohydrodynamics behavior. The comparison of three different methods revealed that purification by dialysis and by cesium chloride gradient maintained behavioral differences between the two types of particles, while the polyethylene glycol precipitation-based protocol lead to more comparable electrokinetic properties but still significantly different aggregation behavior.

In the second part we studied the interfacial properties of F-specific RNA phages exhibiting similar structures (MS2, GA and Q β). According to the soft particles concept, it appeared that the three phages display similar electrostatic charge while their hydrophobicity degree follows the sequence MS2 < Q β < GA, with GA being the most hydrophobic phage. These properties were then successfully correlated to adhesion capacities onto industrial substrates (glass, stainless steel, polypropylene) whose surface characteristics were addressed by AFM. The results highlight the impact of roughness and hydrophobicity of the deposition surfaces which tend to increase viral adhesion. Viruses with different soft multilayered structures (Phi X 174, PRD1, MS2) were then investigated with as result the following sequence for the electrostatic charge: Phi X 174 < PRD1 < MS2 (MS2 being the most negatively charged phage). A positive correlation between these properties and adhesion capacities onto charged surfaces and onto strictly hydrophilic or hydrophobic materials has further been established.

The experimental and theoretical approaches adopted in this work contribute to a better characterization of the "multilayer" aspect of viral particles in connection with their reactivity (stability versus aggregation and adhesion). In particular, peculiar viral behaviors are addressed and could not be understood on the basis of conventional theories, such as DLVO and electrophoresis models for hard particles.

Keywords: bacteriophages, interfacial properties, soft particles, adhesion, aggregation.

Résumé

Hors de leur cellule hôte, les virus se comportent comme des particules biologiques inertes dont le comportement est principalement guidé par les propriétés physico-chimiques dites de surface, en particulier la charge et la balance hydrophile/hydrophobe. A l'heure actuelle, il est impossible de prédire le comportement de virus en arguant uniquement de leur charge de surface. Très récemment, des auteurs proposent que les virus devraient plutôt être assimilés à des particules molles perméables et fortement hétérogènes (Biophysical Journal 94, **2008**, 3293) et non de simples sphères dures. L'objectif de ce travail est de caractériser les propriétés interfaciales des bactériophages selon le concept de particules molles multicouches afin de pouvoir les classer/hierarchiser selon leur réactivité en terme de capacités d'adhésion sur des surfaces abiotiques ou leur agrégation.

Les phages ARN F-spécifiques tout comme les virus entériques pathogènes sont constitués d'une capsid protéique à l'intérieur de laquelle se trouve un génome à ARN. Dans un premier temps, il a été démontré que les éléments situés à l'intérieur de la capsid ont une influence majeure sur les propriétés physico-chimiques en particulier électrocinétiques. En effet, nous avons comparé pour la première fois les propriétés électrohydrodynamiques de phages MS2 avec celles de *Virus Like Particles* correspondantes (VLPs, particules virales dépourvues de génome) dans différentes conditions de pH et de force ionique. Selon des principes précédemment établis et basés sur un formalisme pour l'électrophorèse de particules molles multicouches, on démontre entre autre que les phages complets portent une charge volumique plus importante que les VLPs. Les profils d'agrégation pour chaque type de particules sont différents avec une survenue de l'agrégation uniquement au point isoélectrique et à faible force ionique pour les VLPs, montrant ainsi l'impact du génome sur les propriétés de stabilité de suspensions virales. Nous avons ensuite caractérisé l'influence de la méthode de purification sur les différences observées de propriétés électrocinétiques et d'agrégation. La confrontation de trois méthodes distinctes révèle que les purifications par dialyse et par gradient de chlorure de césium maintiennent les différences de comportement entre les deux types de particules tandis que la précipitation au polyéthylène glycol atténue ces différences pour ce qui est des caractéristiques électrocinétiques mais les différences persistent au niveau du comportement d'agrégation.

Dans une seconde partie nous avons d'une part étudié les propriétés interfaciales de différents virus ARN F-spécifiques (MS2, GA et Q β) à structures similaires. Au moyen du concept de particules molles multicouches, nous avons montré que les trois phages présentent une charge électrostatique similaire et leur degré d'hydrophobicité respectif est établi selon la séquence MS2 < Q β < GA, GA étant le plus hydrophobe. Ces propriétés ont ensuite été corrélées aux capacités d'adhésion sur des supports industriels (verre, inox, polypropylène) dont les propriétés de surface ont été caractérisées par AFM. L'étude met en évidence l'impact de la rugosité et de l'hydrophobicité des surfaces de dépôt qui tendent à augmenter l'adhésion virale. Des virus à structures multicouches différentes (Phi X 174, PRD1, MS2) ont également fait l'objet d'investigation en termes de propriétés électrocinétiques, d'agrégation et d'adhésion. Les résultats montrent la séquence suivante concernant la charge électrostatique Phi X 174 < PRD1 < MS2 (MS2 étant le plus chargé négativement). Par ailleurs, une corrélation positive entre ces propriétés et les capacités d'adhésion des phages sur des surfaces chargées et des supports strictement hydrophiles ou hydrophobes a été établie.

Ainsi les méthodes expérimentales et théoriques de ces travaux ont abouti à une meilleure caractérisation de l'aspect « multicouches » des particules virales notamment certaines particularités impossibles à démontrer sur la base de modèles conventionnels type DLVO et électrophorèse de particules dures.

Mots clés: bactériophages, propriétés interfaciales, particules molles, adhésion, agrégation.

