

# Virus Hydriques

S. Wurtzer, B. Prévost [Doctorant R2DS], M. Goulet & L. Moulin  
Collaboration avec le SIAAP et le LEESU (Ecole des ponts/Paris XII)  
Projet intégré au sein du programme PIREN Seine

## I Introduction

De nombreuses espèces de virus sont présentes dans le milieu hydrique, que ce soit dans les eaux douces ou les eaux marines. Parmi ces virus, un certain nombre d'entre eux sont susceptibles de se répliquer dans le système digestif humain et sont regroupés sous la dénomination de virus entériques. La stabilité des virions aux pH acides favorise le passage de la barrière gastrique et l'infection du tractus intestinal, ouvrant potentiellement la porte à une dissémination à d'autres organes cibles. Ces virus sont essentiellement responsables de gastroentérites ou d'hépatites. Dans de rares cas, des atteintes pléiotropiques peuvent survenir telles que des insuffisances respiratoires ou encore des atteintes neurologiques, cutanées ou oculaires. Toutefois, les infections asymptomatiques et pauci-symptomatiques extrêmement fréquentes conduisent à une très large sous-estimation de ces infections virales et donc des dangers liés à ces agents. Les virus entériques sont l'une des principale cause de maladie hydrique et sont donc des pathogènes à surveiller de près, d'autant plus que leurs doses minimales infectieuses sont généralement inférieures à 50 virus infectieux ingérés.

Une personne infectée par un virus entérique excrète dans ses fèces jusqu'à  $10^8$  particules virales par gramme de selles. Les virus excrétés dans les selles se retrouvent ainsi dans les eaux usées. Les cours d'eau d'Ile de France (la Seine et la Marne), étant les principaux réceptacles des eaux usées traitées de l'agglomération parisienne, s'en retrouvent directement impactés. Ces virus hydriques sont très résistants dans l'environnement extérieur et leurs génomes peuvent être détectés dans l'eau durant plusieurs mois, voire années pour les virus les plus résistants (Kotwal, 2014). La contamination virale de ces ressources naturelles, utilisées par Eau de Paris pour la production d'eau potable, constitue un challenge à prendre en considération (Gibson, 2014). Bon nombre d'interrogations subsistent à propos de ces virus pathogènes. L'efficacité des filières de potabilisation, notamment lorsque celles-ci sont confrontées à des pics de contamination des eaux de surface, est très peu connue (Abbaszadegan, 2008). Si bien que des cas de contamination virale par le biais du réseau d'eau potable sont sporadiquement rapportés de façon rétrospective (Fongaro, 2013; Haramoto, 2012; Haramoto, 2013; Jack, 2013; Li, 2013; Mattioli, 2014; Vecchia, 2013; Ye, 2012). Mais la distance potentielle et des temps d'incubation parfois relativement longs conduisent vraisemblablement à une large sous-estimation de ces événements.

Depuis quelques années et l'avènement de la méta-génomique, de nouveaux virus sont couramment isolés. C'est ainsi que 3 nouveaux picornavirus ont fait récemment (février 2013) leur apparition dans la nomenclature. Bien que leur épidémiologie et leur impact étiologique sur les gastro-entérites virales doivent encore être éclaircis, les virus Aichi, les cosavirus et les salivirus constituent de potentiels agents infectieux hydriques émergents à surveiller.

Les travaux conduits par le laboratoire durant l'année 2013 ont permis de compléter l'étude des traitements de désinfection sur différentes classes virales, initiée en 2012 dans le cadre d'un stage de Master 2. Par la suite, une évaluation de la contamination virale des ressources en eau a été entamée. Cette étude en cours porte dans un premier temps sur les eaux de surface et la contribution des rejets d'eaux usées traitées. Elle a nécessité le développement de méthodes de concentration permettant une exploitation sur différentes natures d'eau. Enfin, afin de répondre à la nécessité de prise en compte de nouveaux virus entériques émergents, de nouveaux outils de détection ont été développés et appliqués de façon rétrospective sur les différents échantillons à disposition.

## II Etude des traitements de désinfection sur la mesure de la charge virale

Au cours de l'année 2011, des travaux réalisés par le laboratoire ont porté sur la recherche de particules virales au sein des filières de potabilisation d'eaux de surface (usines de Joinville et Orly). Ces travaux ont permis d'une part de développer une méthodologie de filtration et de concentration de différents types de particules virales dans l'eau potable, d'autre part, de mettre en évidence un certain nombre de génomes viraux dans l'eau chlorée en fin de filière de traitement. Ces résultats ne permettaient toutefois pas de renseigner sur le caractère infectieux de ces particules virales. En effet, la plupart des virus isolés ne sont pas cultivables sur des lignées cellulaires, la détection par biologie moléculaire étant la seule approche envisageable.

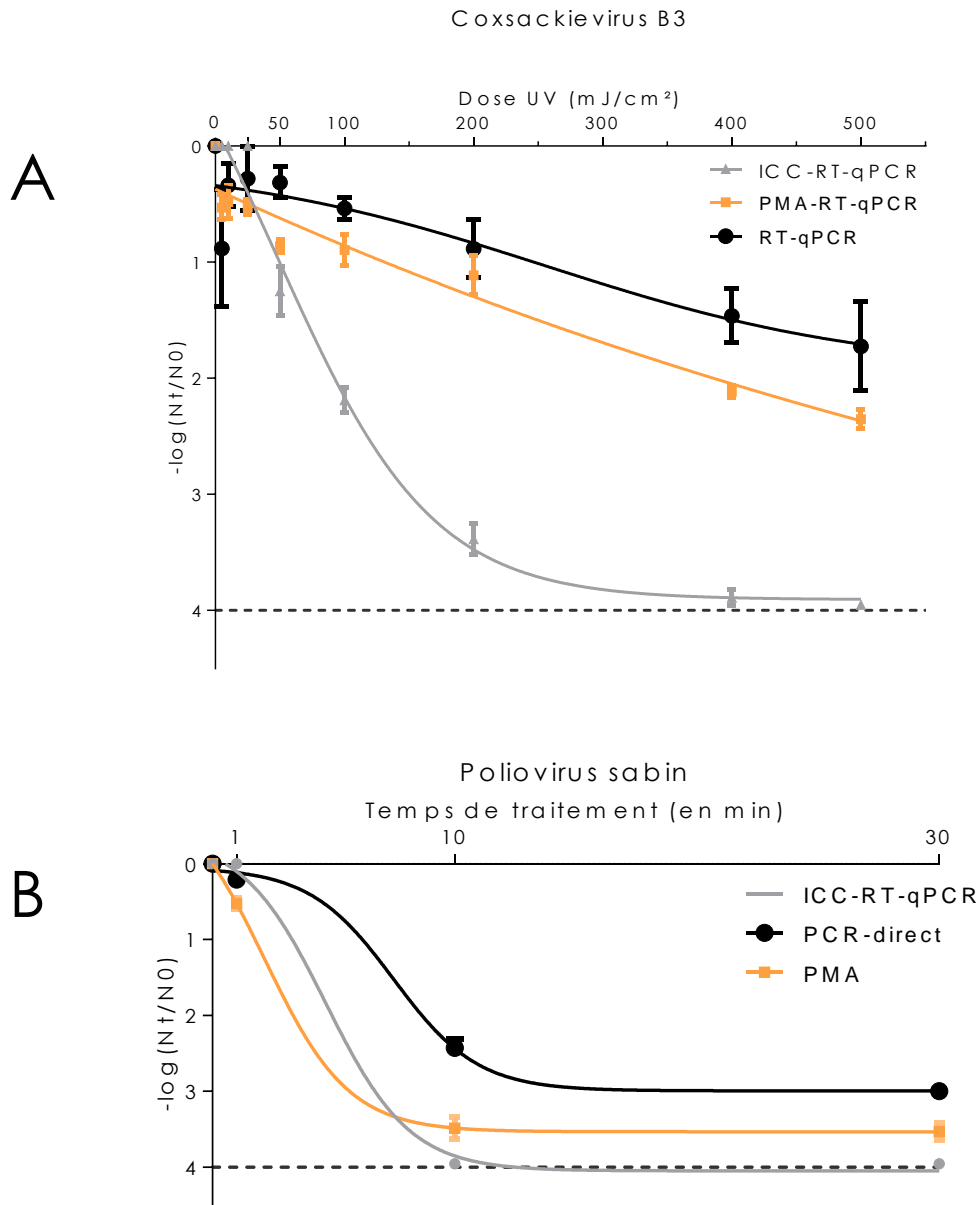
Afin de disposer d'outils complémentaires permettant d'apprécier la pertinence de la détection de génomes viraux dans des échantillons d'eau, des travaux visant à mesurer l'impact de traitements biocides sur la mesure de la charge virale dans l'eau ont été entamés en 2012 et poursuivis en 2013. Ces travaux ont été réalisés *in vitro* sur deux souches d'enterovirus (coxsackievirus B3 et poliovirus Sabin 1) et une souche d'adénovirus (type 41). Deux traitements ont été appliqués : ultraviolets, et chlore. L'effet de la température sur les particules virales a également été étudié. L'effet d'un traitement par ozonation a été initié, mais n'a pu être réalisé à ce jour, faute de disposer d'un générateur fonctionnel.

La persistance virale a été évaluée sur la base de différentes caractéristiques : détection du génome viral par qPCR (ou RT-qPCR selon les cas), infectivité par ICC-qPCR (ou ICC-RT-qPCR<sup>1</sup>) ou intégrité de la capsid virale. Cette dernière approche a été réalisée en réalisant une exposition des particules virales à un agent intercalant photo-activable (le propidium mono azide, PMA). Les acides nucléiques des particules virales traitées sont ensuite purifiés et amplifiés. Les particules présentant un défaut d'intégrité de leur capsid sont sensibles à cet agent intercalant qui bloquera l'amplification de leur génome.

---

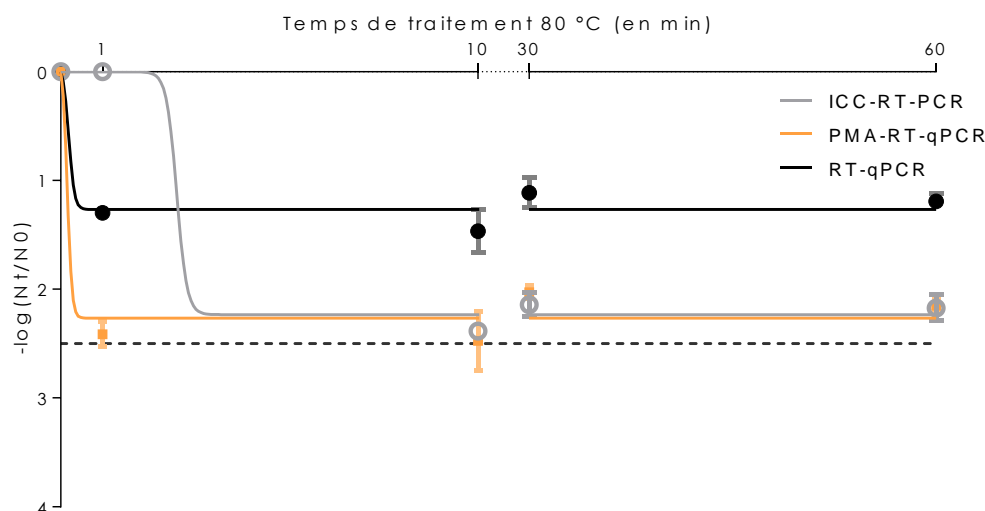
<sup>1</sup> ICC qPCR : Integrated Cell Culture, cette technique couple l'amplification des virus par des lignées cellulaires permissives à une détection du génome viral. Elle permet donc de ne mettre en évidence que les particules infectieuses.

Les résultats illustrés par les figures 4 et 5 montrent qu'il existe une discordance entre la détection génomique et l'infectivité réelle des particules quel que soit le traitement biocide subi par les particules virales (exposition au chlore ou aux UV) ou son environnement (température). Par ailleurs, la méthode de mesure de l'intégrité de la particule virale permet de générer des résultats proches de l'infectivité virale dans certaines conditions. En effet, cet outil offre une bonne corrélation avec la mise en culture des virus lorsque ceux-ci ont subi une exposition au chlore, traitement affectant principalement la capside virale ou à la température. Cet outil n'est toutefois pas exploitable pour des virus inactivés par une exposition aux UV, traitement affectant principalement le génome viral.



**Figure 4, Panneaux A & B effet de traitement (UV et Chlore respectivement). Les points expérimentaux sont représentés ainsi qu'une modélisation de la réponse. Différentes méthodes de détections sont présentées, RTqPCR en noir, ICC qPCR (infectiosité) en gris et PMA (état des particules virales en orange)**

## Coxsackievirus B3



**Figure 5 : Effet de la Température sur les particules virales. Différentes méthodes de détections sont présentées, RTqPCR en noir, ICC qPCR (infectiosité) en gris et PMA (état des particules virales en orange)**

Bien qu'offrant une méthode alternative intéressante pour refléter l'infectivité virale, l'évaluation de l'intégrité de la capsid virale montre toutefois des limites, ne nous permettant pas une application sur des échantillons d'eau. A ce jour, la recherche d'infectivité n'est envisageable que pour certains entérovirus et adénovirus, la [détection de génomes viraux restant la seule alternative pour l'ensemble des virus entériques](#).

### III Développement d'une méthode de filtration et de concentration à partir de différentes natures d'eau

Les travaux conduits en 2011-12 au laboratoire ont permis de développer un nouveau protocole de filtration et de concentration de particules virales à partir d'un échantillon d'eau potable. Dans le cadre du projet de thèse de Benoit Prévost, initiée à la fin de l'année 2012, ce protocole a subi quelques ajustements de façon à pouvoir être pratiqué sur des échantillons d'eau de surface, mais également des eaux de rejets de station d'épuration. Ces optimisations ont porté sur la composition de la solution d'éluion et des étapes de traitement au cours des concentrations secondaires et tertiaires.

En bref, ce protocole repose sur une filtration d'un volume de 10 L d'eau sur une cartouche Nanoceram, suivie d'une sonication et une éluion en flux inversé à l'aide d'une solution composée principalement de 1% d'extrait de bœuf, 0,1% Tween 80 et 0,1% Polyphosphate à pH9,5. Les particules virales éluées sont mises à flocculer à pH 3,5 et sont sédimentées par centrifugation. Elles sont enfin purifiées par filtration 0.22

µm et ultracentrifugées sur cousin de sucrose à 40% de manière à éliminer un maximum de macroparticules organiques et d'inhibiteurs enzymatiques solubles. Des calculs de rendement ont été réalisés sur différentes matrices d'eau (eau potable, eau de surface et eau de rejet de STEP) avec différents virus. Ces résultats non présentés montrent que cette méthode est applicable à différents types d'échantillons.

#### IV Développement d'un contrôle viral de processus

La méthode de filtration pour concentrer les particules virales de l'échantillon d'eau initial est relativement complexe, chaque étape pouvant être affectée par la nature et la composition de l'échantillon analysé. Afin de s'assurer de la fiabilité de chaque analyse réalisée, un contrôle viral de processus a été développé. Ce contrôle viral se devait de présenter des caractéristiques morphologiques et physico-chimiques proches des virus d'intérêt. Quelques éléments de la littérature ont rapporté l'utilisation de MNV-1 (murine norovirus 1), de FCV (feline calicivirus), de mengovirus ou de bactériophage MS-2 (Butot, 2014). Nous avons fait le choix au laboratoire d'utiliser directement un agent viral d'intérêt modifié. Ce contrôle est un adénovirus 5, présentant une délétion des gènes E1 et E3, substitués par l'insertion d'un gène LacZ. Cette portion du génome est exploitée pour la détection spécifique de ce contrôle adénoviral par qPCR. Par ailleurs, une mutagénèse dirigée a été réalisée sur les sites d'hybridation des amorces utilisées pour la détection des adénovirus, rendant son amplification inefficace. Une vérification de la mutagénèse et la production virale de ce contrôle est encore en cours de réalisation. La réalisation d'une telle mutagénèse dirigée sur un plasmide de 40 kbp constituerait en soit un objet de publication dans une revue scientifique internationale appropriée. Ce contrôle viral de processus renseignera sur le rendement de l'intégralité de la méthode pour chaque échantillon individuellement, permettant d'exclure toute analyse ayant présenté une quelconque inhibition.

#### V Développement d'outils de détection génomique de virus hydriques émergents

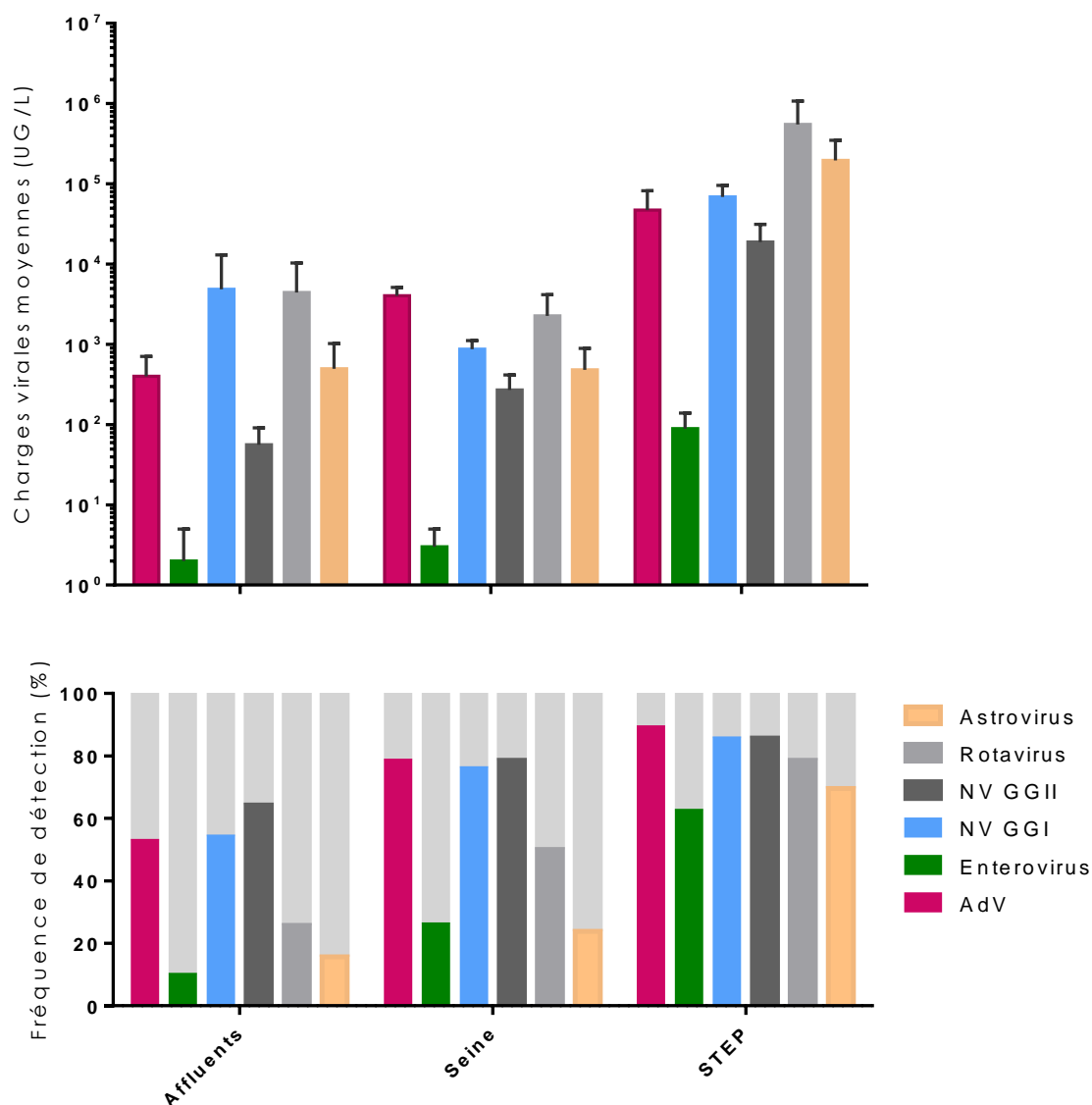
Compte tenu de l'émergence (au moins bibliographique) de nouveaux virus hydriques, potentiellement responsables de gastro-entérites, des outils moléculaires ont été mis en place afin de permettre la détection génomique des virus Aichi, des cosavirus et des salivirus. Des amorces et des sondes, tirées de la littérature, permettant une amplification spécifique de chacun de ces virus ont été vérifiées par bio-informatique et éventuellement ajustées/modifiées. Les conditions réactionnelles d'amplification par RT-qPCR ont été optimisées. Ne disposant pas de souches positives pour ces virus, les amplifications ont directement été appliquées à des échantillons environnementaux de façon rétrospective. Les résultats seront plus précisément détaillés par la suite. Toutefois, un certain nombre d'échantillons se sont révélés positifs pour au moins un de ces virus. Les acides nucléiques issus de ces échantillons ont servi de matrice pour la fabrication d'un contrôle positif d'amplification. En bref, les amplicons spécifiques de chaque virus ont été sous-clonés individuellement dans

un vecteur plasmidique pCR2.1 TOPO puis séquencés. . L'obtention de chacun de ces plasmides de contrôle permet d'évaluer précisément les performances de détection de chacun de ces virus.

## VI Evaluation de la contamination virale de la Seine

Les cours d'eau d'Ile de France (la Seine et la Marne) sont les principaux exutoires des eaux usées traitées de l'agglomération parisienne, mais plus généralement de l'ensemble des rejets urbains. La charge, la persistance et la dynamique des virus humains dans les bassins versants urbanisés ainsi que l'impact de ces rejets urbains restent encore mal connues. À l'heure de l'utilisation des eaux de surfaces comme ressources pour la production d'eau potable et de la réouverture du réseau d'eau non potable parisien, il paraît nécessaire de disposer de davantage de données concernant cette problématique. De ce fait, la surveillance et la gestion de ces particules virales potentiellement infectieuses pour l'Homme sont de réels enjeux de santé publique.

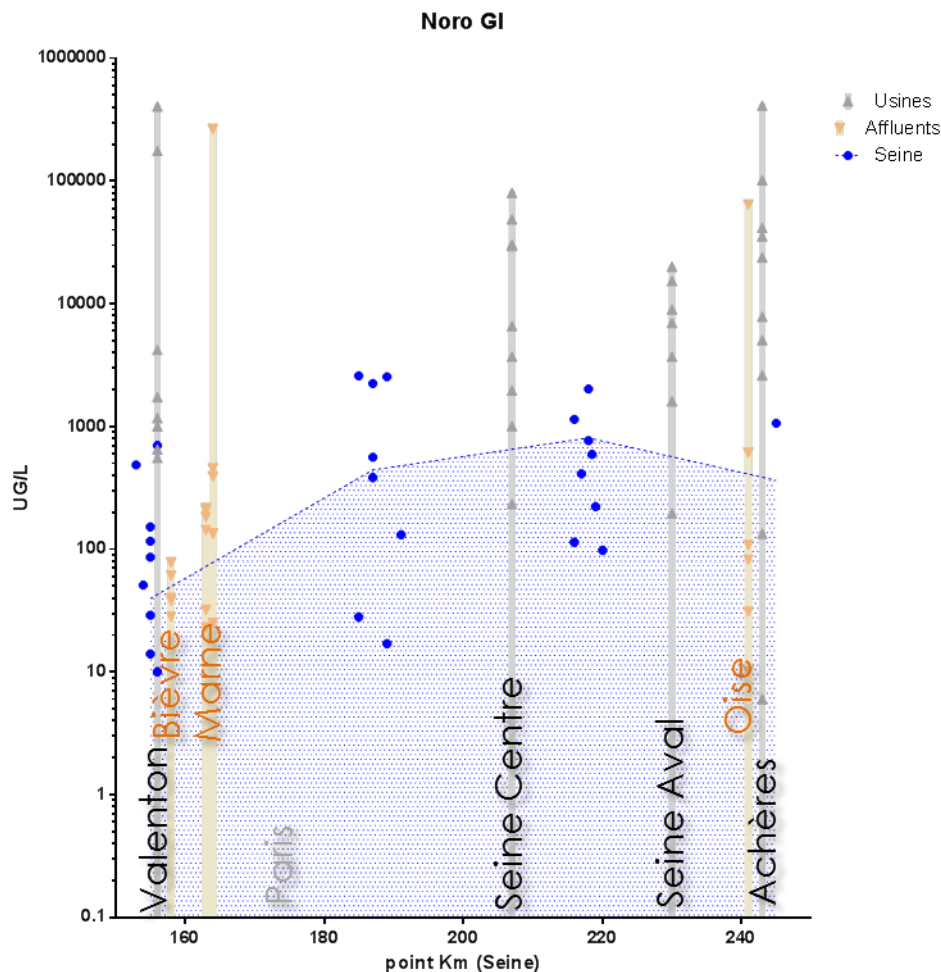
Les résultats présentés sont issus des huit premiers mois d'une campagne de prélèvement d'un an, essentiellement basée sur la Seine et ses principaux affluents. Ce suivi permet d'une part de caractériser les variations temporelles de la charge virale et de la diversité des populations circulantes. Cet aspect fait partie intégrante des projets de l'année 2014. D'autre part, l'influence des rejets de stations d'épuration (STEP) sur la contamination virale de ce cours d'eau a également été évaluée. Un contrôle global de la méthode, basé sur un adénovirus 5 modifié, a été développé. Des contrôles spécifiques des étapes d'extraction des acides nucléiques et d'amplification génomique ont été inclus également. Les données rétrospectives obtenues pour les nouveaux virus émergents (Aichi virus, Salivirus et Cosavirus, ainsi que les sapovirus) sont encore en cours de traitement et ne seront discutées par la suite.



**Figure 6 : Concentration moyenne (et écart type) observé sur la Seine, ses affluents et les rejets de STEP (panneau haut). Pourcentage de détection sur l'ensemble des échantillons (panneaux bas).**

Cette campagne de prélèvements a permis de mettre en évidence les populations virales circulantes majoritaires. 53% des échantillons provenant des affluents étaient positifs en adénovirus, contre 79% dans la portion de Seine Paris intra-muros et 89% des rejets de STEP. Les concentrations moyennes observées étaient respectivement de 400 unités génomes/L, 4021 ug/L et 47136 ug/L. 54% des échantillons provenant des affluents étaient positifs en norovirus de génogroupe I, contre 76% dans la portion de Seine Paris intra-muros et 86% des rejets de STEP. Les concentrations moyennes observées étaient respectivement de 4848 ug/L, 871 ug/L et 68767 ug/L. 64% des échantillons provenant des affluents étaient positifs en norovirus de génogroupe II, contre 79% dans la portion de Seine Paris intra-muros et 86% des rejets

de STEP. Les concentrations moyennes observées étaient respectivement de 56 ug/L, 270 ug/L et 18818 ug/L. 26% des échantillons provenant des affluents étaient positifs en rotavirus de type A, contre 50% dans la portion de Seine Paris intra-muros et 79% des rejets de STEP. Les concentrations moyennes observées étaient respectivement de 4422 ug/L, 2260 ug/L et 551056 ug/L. Dans une moindre mesure, des astrovirus et des entérovirus ont également été détectés, leur fréquence n'excédant pas 15% dans les affluents, 26% en Seine et 70% en rejets de STEP. Pour l'ensemble des échantillons analysés, aucun virus des hépatites A et E n'a été détecté. Un profil de la contamination de la Seine est présenté Figure 7



**Figure 7 : Evolution de la contamination de la Seine en Norovirus GI. Points ; résultats ponctuels, ligne bleue ; concentration moyenne aux points de prélèvements. En bleu prélèvements en Seine, Orange, prélèvements dans les affluents, Noir prélèvements en STEP.**

Ces premières observations de suivi de la charge virale dans la Seine indiquent le rôle important des rejets de STEP dans la contamination virale de ce fleuve. Une évaluation de la diversité des populations virales au sein de ces échantillons fait l'objet de travaux complémentaires et est en cours de réalisation afin de préciser la nature des apports viraux potentiels. Ces travaux de thèse, prévue jusqu'à 2016, feront l'objet d'une prochaine publication.



En plus des publications scientifiques, un comité de thèse composé de membres du laboratoire (S. Wurtzer et L. Moulin), des équipes encadrantes (F. Lucas, A. Goncalves) et de membre extérieurs (CNR virus enteriques, Réseau Sentinelle, Membre du PIREN) se réunira annuellement pour présentation de ces travaux

## VII Bibliographie

- Abbaszadegan, M., P. Monteiro, N. Nwachuku, A. Alum and H. Ryu (2008). "Removal of adenovirus, calicivirus, and bacteriophages by conventional drinking water treatment." *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 43(2): 171-177.
- Butot, S., S. Zuber and L. Baert (2014). "Sample preparation prior to molecular amplification: Complexities and opportunities." *Curr Opin Virol* 4C: 66-70.
- Fongaro, G., M. A. Nascimento, C. Rigotto, G. Ritterbusch, A. D. da Silva, P. A. Esteves and C. R. Barardi (2013). "Evaluation and molecular characterization of human adenovirus in drinking water supplies: viral integrity and viability assays." *Virol J* 10: 166.
- Gibson, K. E. (2014). "Viral pathogens in water: occurrence, public health impact, and available control strategies." *Curr Opin Virol* 4C: 50-57.
- Haramoto, E., M. Kitajima, N. Kishida, H. Katayama, M. Asami and M. Akiba (2012). "Occurrence of viruses and protozoa in drinking water sources of Japan and their relationship to indicator microorganisms." *Food Environ Virol* 4(3): 93-101.
- Haramoto, E., M. Kitajima, N. Kishida, Y. Konno, H. Katayama, M. Asami and M. Akiba (2013). "Occurrence of pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan." *Appl Environ Microbiol* 79(23): 7413-7418.
- Jack, S., D. Bell and J. Hewitt (2013). "Norovirus contamination of a drinking water supply at a hotel resort." *N Z Med J* 126(1387): 98-107.
- Kotwal, G. and J. L. Cannon (2014). "Environmental persistence and transfer of enteric viruses." *Curr Opin Virol* 4C: 37-43.
- Li, Y., H. Guo, Z. Xu, X. Zhou, H. Zhang, L. Zhang, J. Miao and Y. Pan (2013). "An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with a secondary water supply system in a factory in south China." *BMC Public Health* 13: 283.
- Mattioli, M. C., A. B. Boehm, J. Davis, A. R. Harris, M. Mrisho and A. J. Pickering (2014). "Enteric Pathogens in Stored Drinking Water and on Caregiver's Hands in Tanzanian Households with and without Reported Cases of Child Diarrhea." *PLoS One* 9(1): e84939.
- Nielsen, A. C., M. L. Gyhrs, L. P. Nielsen, C. Pedersen and B. Bottiger (2013). "Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus, and salivirus in young children." *J Clin Virol* 57(3): 239-242.
- Vecchia, A. D., M. Kluge, J. V. dos Santos da Silva, J. Comerlato, M. T. Rodrigues, J. D. Fleck, R. B. da Luz, T. F. Teixeira, P. M. Roehe, R. Capalunga, A. B. Oliveira and F. R. Spilki (2013). "Presence of Torque teno virus (TTV) in tap water in public schools from Southern Brazil." *Food Environ Virol* 5(1): 41-45.
- Ye, X. Y., X. Ming, Y. L. Zhang, W. Q. Xiao, X. N. Huang, Y. G. Cao and K. D. Gu (2012). "Real-time PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China." *Curr Microbiol* 65(3): 244-253.