



OPUR : Observatoire des Polluants Urbains en Île de France

Thème de recherche : 7.2.

Action de recherche : ETUDE EXPLORATOIRE SUR LES  
VIRUS DANS LES EAUX URBAINES

**DYNAMIQUE DE LA CONTAMINATION VIRALE  
DANS UN ENVIRONNEMENT HYDRIQUE URBAIN**

*Fiche de synthèse*

*Thèse de doctorat Benoit Prevost*

*Date de soutenance 28/09/2015*

*A L'UPE*

- *Informations complémentaires : travail effectué à Eau de Paris, au SIAAP et au LEESU, financements complémentaires : Eau de Paris, DIM R2DS*



## 1. Objectifs du projet

L'objectif majeur du projet est de comprendre la dynamique spatiale et temporelle d'un ensemble de virus d'intérêt sanitaire dans le milieu aquatique urbain. Le modèle d'étude est l'agglomération parisienne, et en particulier la Seine, au centre de la circulation de l'eau dans l'agglomération parisienne. Réceptrice des eaux usées, elle est aussi source d'eau potable, et source d'alimentation en eau non potable (réseau d'eau non potable pour le lavage des rues aujourd'hui, pour d'autres usages demain – eau climatique, eau paysage...-). Il s'agit donc de comprendre le devenir des virus entériques dans des conditions hydrologiques et météorologiques variées, afin d'être en mesure d'évaluer les risques actuels et dans des conditions futures (évolutions hydrologiques liées aux fluctuations climatiques et autres usages de l'eau).

## 2. Problématique

La gastroentérite est une inflammation des tissus du tube digestif entraînant divers symptômes tels que le vomissement, la diarrhée et des douleurs abdominales. Chaque année, cette maladie touche près de 2 milliards de personnes à travers le monde et est à l'origine d'environ 2 millions de décès par déshydratation, principalement au sein des pays en voie de développement. Elle est considérée comme l'une des principales causes de mortalité infantile puisqu'elle est, à elle seule, responsable d'environ 18% des morts d'enfants de moins de 5 ans. Parmi ces décès infantiles, 78% sont observés dans la plupart des pays d'Afrique et d'Asie du sud-est (Farthing et al. 2013). L'impact économique lié à l'ensemble des épisodes de gastroentérites durant une année a été estimé dans plusieurs pays. À titre d'exemples, les coûts annuels engendrés par cette maladie ont été évalués à environ 162 millions d'euros en Angleterre (Lopman et al. 2004), 243 millions d'euros en Australie (Hellard et al. 2003), 135 millions d'euros en Irlande (Rodrigues et al. 2008) et 611 millions d'euros aux Pays-Bas (Friesema et al. 2012). Plusieurs agents étiologiques sont susceptibles d'engendrer une gastroentérite aigüe chez l'Homme:

- les bactéries avec comme principaux agents responsables *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Vibrio cholera* et *Yersinia enterocolitica*.

- les parasites avec majoritairement une implication de *Cryptosporidium parvum* et *C. hominis*, *Giardia intestinalis*, mais également d'amibes (*Entamoeba histolytica*).

- les virus qui sont considérés comme les principaux vecteurs de gastroentérites à travers le monde. En effet, les rotavirus à eux seuls sont considérés par l'organisation mondiale de la Santé (OMS) comme étant responsables d'environ 500 000 morts par an et d'un tiers des cas de gastroentérites à l'échelle mondiale (Farthing et al. 2013). Les norovirus sont à l'origine d'environ 218 000 morts chaque année (Patel et al. 2008) et sont reconnus pour être la principale cause d'épidémies de gastroentérite d'origine alimentaire à travers le monde, avec comme exemple celui des Etats-Unis où les infections par les norovirus représentent plus des deux tiers des gastroentérites liées à la consommation d'aliments contaminés (Acheson et al. 2002). Ces nombreux cas d'épidémies virales d'origines alimentaires justifient parfaitement l'intérêt d'étudier la circulation des virus entériques, mais également leur persistance dans l'environnement. **Or actuellement il existe peu d'études exhaustives sur la dynamique des virus entériques dans l'environnement, et les études publiées se focalisent la plupart du temps sur un ou deux groupes viraux tels que les norovirus, les rotavirus ou les adénovirus.**

Et pourtant, l'importante excrétion de particules virales dans les fèces des individus infectés, jusqu'à  $10^{11}$  copies/g (Blacklow and Greenberg 1991), est à l'origine de la contamination virale des eaux usées qui sont aujourd'hui considérées comme le principal point d'entrée des virus entériques dans le cycle de l'eau. Par conséquent les stations d'épuration, ayant en charge le traitement des eaux usées avant leur rejet dans l'environnement, sont confrontées à des eaux fortement chargées en virus entériques humains face auxquels les traitements d'épuration généralement mis en place n'ont qu'une très faible incidence ou tout du moins ne s'avèrent pas suffisants pour éliminer les risques sanitaires associés à leur circulation dans les milieux aquatiques. Ainsi la transmission hydrique de ces particules virales à l'Homme a pu être mise en évidence par de nombreuses études (Hamza et al. 2011). En effet, l'infection d'individus par des virus entériques a pu être constatée suite à la consommation directe d'eau qui n'était pas convenablement traitée ou bien de manière indirecte par le biais d'activités récréatives dans des eaux contaminées, par la consommation de produits agricoles contaminés par les eaux d'irrigation et/ou par les boues utilisées pour l'épandage, mais aussi suite à la consommation de fruits de mer issus de zones conchylicoles contaminées. Si actuellement le suivi de la qualité microbiologique d'une eau de repose sur le suivi d'indicateurs bactériens, ces derniers ne présentant pourtant pas les mêmes caractéristiques que les virus entériques qui sont dans leur ensemble plus résistants dans l'environnement mais également aux différents traitements mis en place au niveau des structures de traitement de l'eau (station d'épuration et usine de production d'eau potable). Pour répondre à cette limite, plusieurs indicateurs viraux, d'origine fécale ou non, ont été proposés mais pour le moment aucun ne semble pertinent pour une utilisation sur différentes matrices hydriques. **À l'heure actuelle, il est donc nécessaire de rechercher directement les virus entériques pour suivre leur circulation et évaluer la qualité virale d'une eau.**

Le but de ce projet a donc été d'étudier la dynamique spatio-temporelle, la diversité et la persistance des virus entériques dans les eaux de surface d'un fleuve en milieu urbain dense. Ce travail s'articule autour de trois grandes parties.

- Choix des virus et mise en place des méthodes d'échantillonnage et de détection
- Campagne d'analyse sur la Seine, la Marne et les rejets, étude des variations spatio-temporelles des concentrations de différents virus entériques au niveau des effluents de stations d'épuration (STEP) et leur impact sur le milieu récepteur
- Evaluation par séquençage haut débit de la diversité de virus entériques humains observée au sein des effluents de STEP. le lien existant entre les cas cliniques de gastroentérites d'origine virale et l'évolution des effluents de STEP à la fois au niveau des charges virales et des diversités génotypiques observées a été analysé.

## 2.1. Choix des virus d'intérêt

Sous le nom de virus entériques sont regroupés l'ensemble des virus susceptibles d'infecter et de se répliquer au sein des cellules du tractus gastro-intestinal mais également de transiter à travers l'épithélium intestinal pour gagner un site de réplication extra-intestinal comme c'est le cas des infections hépatiques. Ainsi ces virus sont principalement responsables des infections à l'origine de gastroentérites et des symptômes qui leur sont associés tels que les douleurs abdominales, les épisodes diarrhéiques, les nausées-vomissements, les maux de tête mais également de l'apparition d'autres types d'affections telles les hépatites et l'apparition de troubles neurologiques (méningites et paralysies flasques aigües). Cependant, il est à noter que la majorité de ces infections virales sont

asymptomatiques ou pauci-symptomatiques (Simpson et al. 2003). Les virus entériques sont des virus non enveloppés composés d'un génome et d'une capsidie icosaédrique présentant tous deux des caractéristiques très diverses d'une famille de virus à une autre. À la suite d'une infection, ces particules virales sont majoritairement excrétées dans les selles de leur hôte. Leur transmission s'effectue exclusivement par la voie oro-fécale et peut être soit directe de personne à personne ou par aérosolisation soit indirecte par le biais d'aliments ou d'eau contaminés (Sair et al. 2002). Les familles auxquelles appartiennent les virus entériques humains, sont répertoriées dans le tableau 1.

## **2.2. Contamination des eaux usées**

Les eaux usées font donc figures de portes d'entrée pour les particules virales excrétées via les fèces humaines. À travers le monde, de nombreuses études ont évalué les fréquences de détection ainsi que les concentrations des virus entériques dans les eaux usées. À titre d'exemple, en Norvège en moyenne  $10^5$  copies/L d'AdV, de NoV GI et GII ont été retrouvées au sein des eaux usées avec des pics de contamination de l'ordre de  $10^7$  copies/L principalement observés durant la période hivernale ce qui présente une cohérence avec les périodes épidémiques de ces virus (Grøndahl-Rosado et al. 2014). En Amérique du Sud, des charges virales similaires ont été observées pour les rotavirus A, les NoV ainsi que pour les HAstV (Victoria et al. 2014). Une autre étude, cette fois ci menée au Japon rapporte des charges virales qui oscillent au cours de l'année entre  $10^4$  et  $10^7$  copies/L pour les AdV, les NoV GI et GII et entre  $10^4$  et  $10^5$  pour les EV (Katayama et al. 2008). Les EV sont également très fréquemment identifiés dans les eaux usées (Afrique du Sud, États-Unis, Pays-Bas, Espagne). Une grande partie de ces études s'intéressent aux NoV du fait qu'ils tiennent une place importante en clinique. La plupart des virus entériques ont une période épidémique ayant lieu durant l'hiver et cela se répercute donc sur les charges virales observées au sein des eaux usées en entrée de STEP. Sima et al. (2011) ont ainsi mis en évidence le caractère saisonnier des NoV avec une charge virale maximale durant la période hivernale, comprise entre  $10^5$  et  $10^9$ /L d'eaux usées et une charge minimale durant l'été qui est comprise entre  $10^2$  et  $10^5$  copies/L. La comparaison des charges virales d'une étude à une autre peut s'avérer difficile du fait de l'existence de plusieurs facteurs susceptibles d'entraîner de fortes variations tels que le volume de l'échantillon filtré, le protocole de concentration virale adopté, le nombre d'habitants raccordé à la STEP étudiée mais aussi en fonction des traitements mis en place au sein des STEP.

**Tableau 1: Principaux virus entériques humains susceptibles d'être observés dans les eaux environnementales** (sb : simple brin)

Famille	Genre	Espèce	Nombre de génotypes humains	Taille capsidique (nm)	Taille génome (pb)	Type de génome	Maladie
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	Adénovirus humains	68	70 à 90	30000 à 38000	ADN db	Conjonctivite, gastroentérites, respiratoire, urinaire
<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	Astrovirus humains	8	28 à 30	6800 à 7900	ARN sb (+)	Gastroentérite
<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	Norovirus humains	GI (9), GII (19) et GIV (1)	27 à 35	7700	ARN sb (+)	Gastroentérite
	<i>Sapovirus</i>	Sapovirus humains	GI (7), GII (7), GIV (1) et GV (2)	30 à 38	7700	ARN sb (+)	Gastroentérite
<i>Hepeviridae</i>	<i>Orthohepevirus</i>	Virus de l'hépatite E	> 4	26 à 34	7200	ARN sb (+)	Hépatite
<i>Picornaviridae</i>	<i>Cosavirus</i>	Cosavirus	34	30	7600	ARN sb (+)	Gastroentérite suspectée
	<i>Enterovirus (EV)</i>	EV-A	25	22 à 30	7100 à 8900	ARN sb (+)	Paralysie flasque, méningite, myocardite, respiratoire, conjonctivite, gastroentérite
		EV-B	63				
		EV-C	23				
		EV-D	5				
	<i>Hepatovirus</i>	Virus de l'hépatite A	3	27	7500	ARN sb (+)	Hépatite
	<i>Kobuvirus</i>	Virus Aichi	3	30	7000 à 8200	ARN sb (+)	Gastroentérite suspectée
<i>Salivirus</i>	Salivirus	1	30	8000	ARN sb (+)	Gastroentérite suspectée	
<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	Rotavirus	56 types G et 37 types P	60 à 80	18500	ARN db	Gastroentérite

### 2.3. Efficacité des traitements en STEP

Les traitements mis en place au sein des STEP tels que les boues activées, le lagunage et parfois même un traitement de filtration ou de désinfection sont susceptibles d'entraîner un abattement de la charge virale même s'ils ne sont pas mis en place pour éliminer spécifiquement les particules virales. Kitajima et al. (2011) ont comparé les charges de NoV mesurées en entrée avec celles mesurées en sortie dans une STEP utilisant des traitements de boues activées et une étape de chloration finale. La concentration de NoV en entrée était comprise entre  $10^4$  et  $10^7$  copies/L tout au long de l'année de prélèvement tandis qu'en sortie un abattement entre 2 (99%) et  $4 \log_{10}$  (99,99%) pouvait être observé. Une autre étude réalisée en Italie a révélé pour les mêmes types de traitement que l'étude précédente, un abattement de la charge adénovirale compris entre 0,5 et  $3 \log_{10}$  (68,38% et 99,9%) (Carducci et al. 2008). Simmons et Xagorarakis (2011) ont comparé les réductions de charge virale des AdV et des EV dans différentes STEP après chaque type de traitement appliqué. Ainsi à la suite des traitements basés sur des boues activées, un abattement d'environ  $2 \log_{10}$  (99%) pour les AdV et entre 2,5 et  $4 \log_{10}$  (99,5% et 99,99%) pour les EV a été observé. Suite à ce traitement par boues activées, un traitement au chlore ou aux UV était appliqué entraînant une réduction virale supplémentaire inférieure à  $1 \log_{10}$  (90%) pour les AdV comme pour les EV. L'efficacité des traitements sur la charge virale globale est dépendante de plusieurs facteurs tels que la charge virale entrante, le temps de séjour au sein de la STEP mais également la température et l'ensoleillement. Certaines études suggèrent que les virus entériques s'agrègent entre eux ou à de la matière organique, ce qui les rendrait plus résistants aux traitements de désinfection tels que les ultraviolets, l'ozonation et la chloration (Wigginton and Kohn 2012), favorisant ainsi la persistance de populations plus sensibles. Au contraire, d'autres auteurs ont montré que l'inactivation de bactériophages MS2 par les radiations naturelles était augmentée par la formation de radicaux oxygénés provenant de la dégradation de matières organiques (Kohn et al. 2007).

### 2.4. Contamination des eaux de surface

Malgré l'abattement viral lié aux traitements des STEP, leurs effluents sont susceptibles de contenir de fortes charges virales et sont évacués dans des eaux douces de surfaces tels que les rivières ou les lacs (Grøndahl-Rosado et al. 2014). La charge virale observée au sein des eaux de surface va donc essentiellement dépendre du nombre de personnes raccordées au réseau d'assainissement, de l'efficacité des traitements de la STEP, du nombre de virus associés à des particules sédimentables qui sont donc susceptibles de sédimenter très rapidement et du facteur de dilution entre l'effluent de STEP et le milieu récepteur. Kishida et al. (2012) ont analysé 52 échantillons d'eau issue d'une rivière traversant la ville de Tokyo et ont montré une fréquence de détection de 54% pour les NoV GI, de 63% pour les NoV GII et de 44% pour les AdV avec des concentrations variant entre 10 et  $10^4$  copies/L au cours du temps. Le même type d'étude a été mené en Slovénie avec des fréquences de détection de 17,5% pour les RV-A, entre 33 et 38% pour les NoV GI et GII et de 23% pour les HAstV (Steyer et al. 2011). Le VHA a pu être détecté dans 30% des échantillons d'eau collectés à Singapour (Aw and Gin 2011) et dans 92% des échantillons au Brésil (De Paula et al. 2007) avec des charges virales pouvant atteindre jusqu'à  $10^4$  copies/L. Cependant, très peu d'études mettent en évidence la présence de VHA dans les cours d'eau européens. La population des pays européens présente une séroprévalence aux VHA relativement faible ce qui suggère une cohérence entre l'épidémiologie clinique et la contamination virale des eaux. Schets et al. (2008) ont suivi pendant un an la qualité virale de

l'eau issue principalement de lacs à usages récréatifs ont ainsi pu détecter la présence de NoV, d'EV et de rotavirus A avec des fréquences de détection respectives de 28%, 50% et de 69% tandis qu'aucun VHA et VHE n'a été détecté.

#### **4. Programme de travail - SUIVI DES VIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT**

Le projet de thèse a eu pour objectif d'évaluer les facteurs spatiaux, temporels, épidémiques et de persistance qui expliquent la dynamique des virus entériques en Seine, et qui déterminent les risques de contamination. La forte implication dans le projet d'EAU DE PARIS et du SIAAP a permis de prendre en compte les fonctionnements des usines de traitement (eaux usées et eaux potables) et d'évaluer la dynamique et la diversité des virus entériques dans les rejets de station d'épuration, en Seine et dans les affluents. L'appui des programmes PIREN-Seine et OPUR a permis d'appréhender le devenir des virus sur des sites maîtrisés et instrumentés.

Cette étude s'est focalisée sur les virus entériques d'intérêt dans l'environnement, identifiés dans des épidémies d'origine hydrique ou présentant une survie importante dans les eaux : les entérovirus (poliovirus, echovirus, coxsackievirus A & B), Les adénovirus, les rotavirus (en particulier de type A), les norovirus (génogroupes I, II et IV), les sapovirus, les astrovirus, les virus des hépatites A et E. Nous avons également rajouté les virus Aichi, cosavirus, salivirus, récemment décrits, leur épidémiologie et leur impact étiologique sur les gastro-entérites virales doivent encore être éclaircis, mais ils constituent de potentiels agents infectieux hydriques émergents à surveiller. Pour quantifier toutes ces populations virales, les méthodes de concentration des échantillons et de quantification des virus en PCR en temps réel ont été mises en place au laboratoire d'Eau de Paris de 2012 à 2014.

Une campagne de prélèvement d'un an a été réalisée en 2013-2014 sur la Seine (de l'amont à l'aval de Paris), dans les affluents et dans les rejets de Station d'épuration pour déterminer la dynamique spatiale et temporelle de ces virus. De plus, un travail sur la diversité virale a été menée en 2014-2015 afin d'identifier les différents génotypes d'astrovirus et de norovirus humains ayant circulé au sein de la population humaine Parisienne durant cette année d'étude. Enfin la persistance des virus entériques a été évaluée dans les sédiments et dans les eaux de surface et les eaux potables. Pour cela une méthode de détection par PCR en temps réel des virus ayant une capsidie intègre a été mise en place, puis testée sur les échantillons d'eau de Seine et d'eau traitée en usine de potabilisation. Des pièges à sédiments ont été mis en place en Seine pour évaluer la persistance de virus entériques dans ce compartiment qui peut potentiellement être remis en suspension.

L'ensemble des résultats obtenus durant ces 3 années de thèse ont été exploités afin d'être valorisés au travers de publications dans des revues scientifiques spécialisées ainsi que des communications orales dans des congrès nationaux et internationaux.

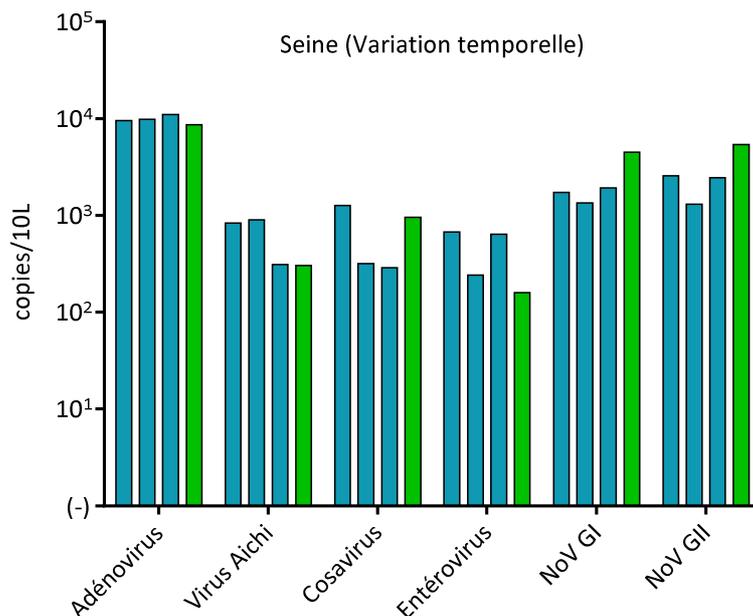
##### **3.1. Campagne de prélèvement et méthode d'analyse**

La bonne réalisation de ces travaux a tout d'abord nécessité le développement de plusieurs outils. En effet, il a été nécessaire de mettre au point une méthode de concentration virale contrôlée permettant ainsi la validation des mesures de charges virales afin de pouvoir les comparer entre eux. Il a également été nécessaire de développer plusieurs outils de détection par biologie moléculaire permettant de détecter les souches circulantes actuelles et qui présentent des limites de quantification similaires pour les différents virus. D'autre part, des travaux préliminaires concernant la variabilité spatio-temporelle de la charge virale dans

le cours d'eau étudié, la Seine, ont été menés afin d'établir un plan d'échantillonnage pertinent.

Une première étude focalisée sur les *Enterovirus*, (Wurtzer et al 2014) a permis de juger la pertinence de l'utilisation de kits commerciaux de détection de virus entériques sur des matrices environnementales d'eau. La plupart de ces kits se sont avérés peu performants par rapport aux outils que nous avons développés, notamment du fait d'une sensibilité aux inhibiteurs présents dans les matrices hydriques. De plus, les résultats obtenus soulignaient que ce type d'échantillon était susceptible d'affecter les rendements d'extraction des acides nucléiques. Ils rappelaient la nécessité de mettre en place des contrôles des étapes d'extraction et d'amplification, pas toujours présents dans les kits commerciaux, permettant de s'assurer des résultats obtenus. Dans un dernier temps, ce nouvel outil de détection, conçu *in silico* en intégrant les séquences de variants viraux les plus récents disponibles, a été éprouvé sur des échantillons environnementaux. Le génotypage des virus détectés a permis de confirmer expérimentalement la capacité de cet outil à détecter un large spectre d'*Enterovirus*. Nous en avons donc conclu qu'il était nécessaire de développer des outils d'analyse pour mener à bien l'étude de la dynamique virale en Seine.

Cette stratégie de développement *in silico* des sondes et amorces et leur validation grâce à un soucier viral présentant la diversité des virus rencontrés a été appliquée à l'ensemble des virus d'intérêt.

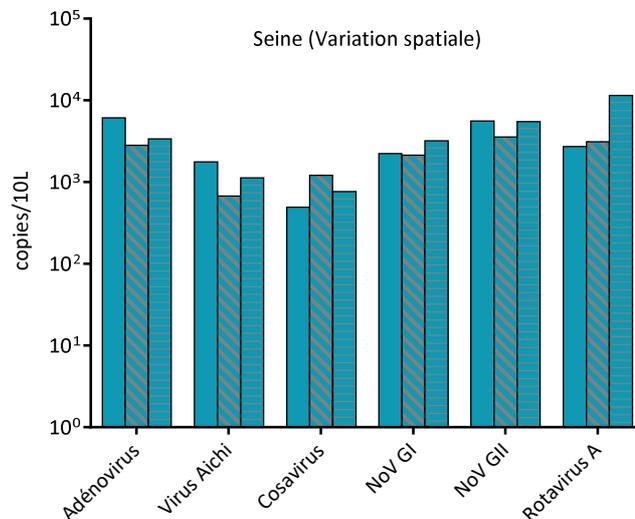


**Figure 1 : Evaluation de la variabilité temporelle de la charge virale dans la Seine (prélèvement moyen sur 24h en vert et prélèvements ponctuels en bleu). Données issues d'une seule campagne de prélèvement qui était représentative des trois campagnes réalisées. Seuls les virus entériques pour lesquels une charge virale a pu être observée ont été représentés.**

Avant d'initier la campagne de prélèvement, nous avons évalué la variabilité temporelle de la charge virale grâce à la mise en place de prélèvements visant à comparer la représentativité d'un prélèvement ponctuel par rapport à un prélèvement moyen sur 24h. Pour se faire, un prélèvement ponctuel de 10L a été réalisé à trois moments distincts de la journée

(matin, soir et matin) ainsi qu'un prélèvement moyen sur 24h. Ce prélèvement moyen sur 24h a été réalisé à l'aide d'un préleveur automatique permettant d'effectuer des prélèvements de 500 mL toutes les heures pendant 24h. Ensuite, les charges virales observées pour chaque échantillon ont été comparées les unes avec les autres. Aucune différence significative entre les concentrations de chacun des virus retrouvés dans ces échantillons n'a pu être constatée (Figure 1) et la comparaison de la charge virale propre à chaque virus et à chaque échantillon durant les 3 campagnes prélèvement n'a montré aucune différence significative après la réalisation d'un test de Friedman. Ainsi la p-value était de 0,151 pour les adénovirus, de 0,055 pour les virus Aichi, de 0,771 pour les cosavirus de 0,405 pour les NoV GI, de 0,370 pour les NoV GII et de 0,609 pour les rotavirus de type A.

L'étude de la variabilité spatiale a, elle, été menée en prélevant 3 échantillons ponctuels de 10L dont un a été prélevé rive droite, un autre au centre de la rivière (la Seine) et un dernier au niveau de la rive gauche. L'analyse statistique de la charge virale de ces échantillons n'a pas révélé de différence significative d'un échantillon à l'autre (Figure 2). L'ensemble des expérimentations concernant l'étude de la variabilité temporelle et spatiale ont chacune été réalisées en triplicat. La comparaison de la charge virale propre à chaque virus et à chaque échantillon durant les 3 campagnes prélèvement n'a montré aucune différence significative après la réalisation d'un test de Friedman. Ainsi la p-value était de 0,999 pour les adénovirus, de 0,930 pour les virus Aichi, de 0,652 pour les cosavirus de 0,480 pour les NoV GI, de 0,530 pour les NoV GII et de 0,052 pour les rotavirus de type A.



**Figure 2 : Evaluation de la variabilité spatiale de la charge virale dans la Seine (prélèvement rive gauche en bleu plein, au centre en bleu hachurée et rive droite en bleu rayé). Données issues d'une seule campagne de prélèvement qui était représentative des trois campagnes réalisées. Seuls les virus entériques pour lesquels une charge virale a pu être observée ont été représentés.**

Au vu des résultats de ces travaux préliminaires, nous avons donc opté pour une stratégie de prélèvements basée sur de l'échantillonnage ponctuel. Le choix des points de prélèvements a été établi en prenant en compte les rejets de STEP, les points de la Seine (milieu récepteur) en amont et en aval de ces différents rejets de STEP et les affluents de la

Seine afin d'en étudier l'impact sur les flux viraux en Seine. La campagne de prélèvement est présentée sur la figure 3.

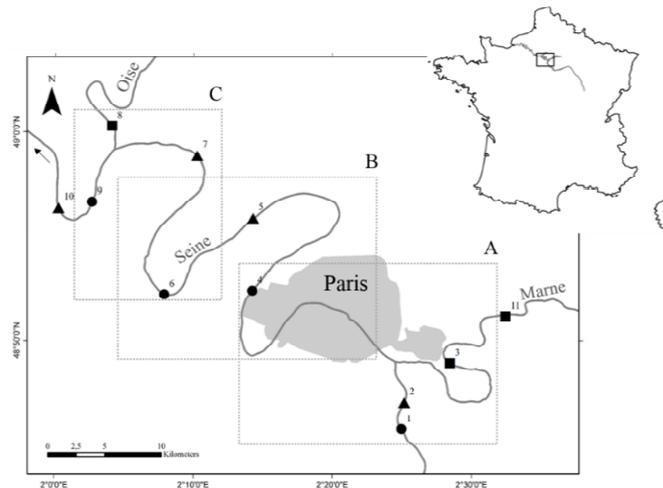


Figure 3. Cartographie des points de prélèvement sur la Seine ●, ses affluents ■ et les stations d'épuration ▲. Cette portion d'étude la Seine a été sub-divisée en 3 sections notées A, B et C.

### 3.2. Profil des équipes de recherche et partenariat

Potentiel scientifique :

- o nombre total de chercheurs et enseignants chercheurs travaillant sur le projet : 1 PRU, 5 chercheurs ingénieurs
- o nombre total de doctorants et post-doctorants travaillant sur le projet : 1 doctorant
- o nombre total de doctorants et post-doctorants bénéficiant d'une allocation de la région : 1 doctorant
- o laboratoires travaillant en interaction avec d'autres réseaux :
  - thèse effectuée au sein de 3 laboratoires de recherche académique (LEESU), et appliquée (Eau de Paris, SIAAP),
  - thèse intégrée dans deux programmes de recherche interdisciplinaire en région parisienne (Piren-Seine et OPUR),
  - échantillonnage réalisé dans le cadre du SOERE Urbis et de la Zone Atelier Seine
  - collaboration avec le Centre National de Référence des virus entériques (CHU, Dijon)

Financement du projet : description des principaux partenaires financiers

- o Part du financement régional du DIM R2DS dans le plan de financement du projet Allocation doctorale : 102200 euros
- o Part des financements propres des institutions parties prenantes du programme :
  - SIAAP : 50 000 euros
  - Eau de Paris : 350 000 euros

### 3.3. Membres du consortium

- o Prevost Benoit, Lucas Françoise,
  - LEESU (UMR MA 102, Université Paris-Est, Agro ParisTech), Université Paris-Est Créteil, 61, Avenue du Général-de-Gaulle, 94010 Créteil cedex, France
- o Goncalves Alexandre, Richard Fanny,
  - SIAAP, Direction du développement et de la prospective, 82, Avenue Kléber, 92700 Colombes, France
- o Wurtzer Sébastien, Moulin Laurent
  - Eau de Paris, DRDQE, R&D biologie, 33, Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry sur seine, France.
- o laboratoires travaillant en interaction : CNR des virus Entériques (Pierre. Pothier)

## 4. Résultats Scientifiques

### 4.1. Virus entériques circulant dans les eaux de la Seine

La campagne de prélèvement annuelle en Seine a permis d'une part de caractériser les variations temporelles de la charge virale et de la diversité des populations circulantes. 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 utilisé. Des contrôles spécifiques des étapes d'extraction des acides nucléiques et d'amplification génomique ont été inclus également et ont permis la validation des résultats. Ces derniers sont présentés sur la figure 4

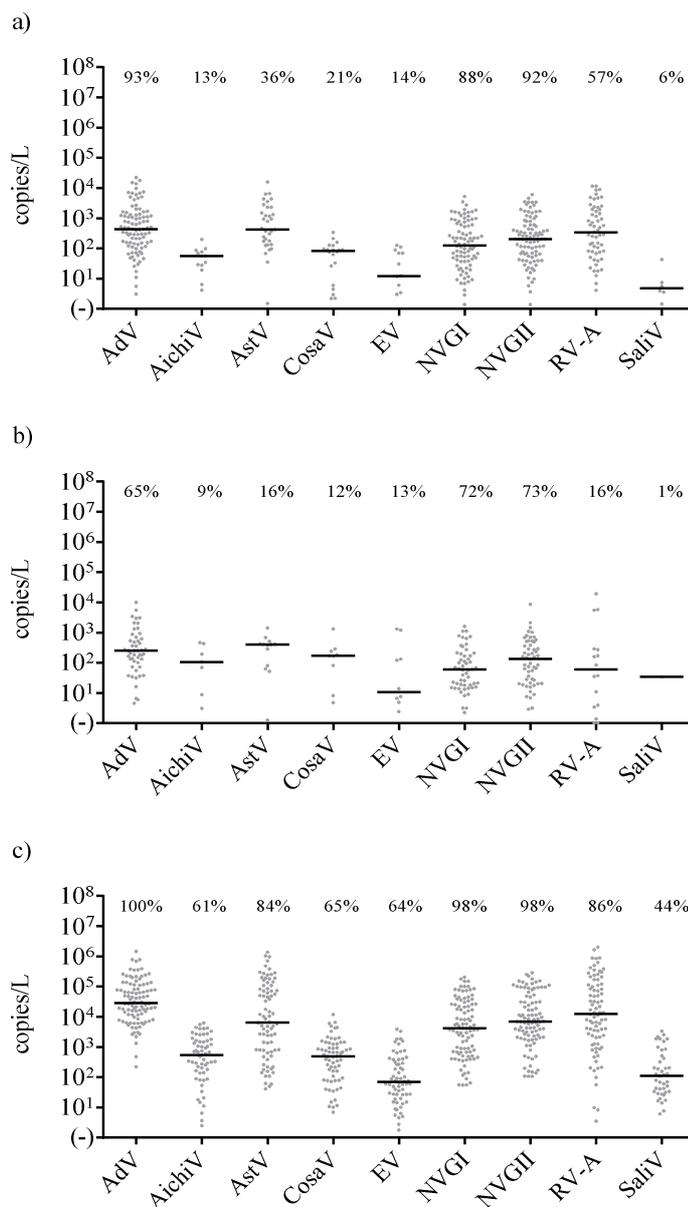
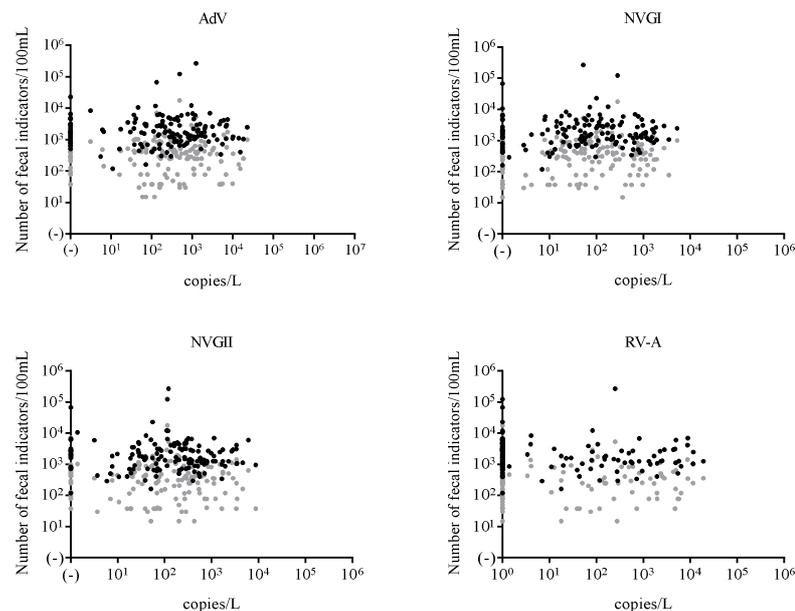


Figure 4. Concentrations et occurrences de virus entériques mesurées dans les échantillons d'eau de Seine (a), d'affluents de la Seine (b) et d'effluents de station d'épuration (c).

Les résultats montrent que les adénovirus, les astrovirus, les rotavirus, ainsi que les norovirus de génogroupe I et II constituaient les populations virales les plus abondantes et présentant les plus fortes occurrences dans les échantillons d'eau de Seine (4.a), d'eau d'affluents (4.b) et de rejets de station d'épuration (4.c). Pour la première fois, une étude française met en évidence la présence de virus Aichi, de cosavirus et dans une moindre mesure de salivirus dans des effluents de station d'épuration, ainsi que dans des eaux de surface. Aucun virus des hépatites A et E n'a été mis en évidence au cours de cette étude.

L'analyse des indicateurs fécaux bactériens (*E. coli* et *Enterococcus fecalis*) n'a pas permis de mettre en évidence une corrélation significative entre la présence de pathogènes viraux et celle de ces indicateurs de contamination fécale (figure 5).



**Figure 5. Corrélation entre les charges virales mesurées et la quantité d'indicateurs fécaux (*E. coli* et *enterocques*) dans des eaux de surface (n = 150)**

#### 4.2. Contribution des rejets de STEP

L'influence de l'agglomération parisienne a été estimée en comparant les charges virales mesurées dans les échantillons les plus en amont et en aval sur la Seine de cette étude et montre que les charges virales en aval étaient significativement plus élevées que celles mesurées en amont pour les populations virales majoritaires retrouvées.

L'analyse du flux viral journalier a permis (i) d'étudier l'impact réel des rejets de stations d'épuration sur la contamination viral de la Seine mais également (ii) d'observer l'absence de rejet viraux non pris en compte dans notre plan de prélèvement. Pour modéliser la contribution des affluents et des effluents de STEP, la Seine a été scindée en 3 sections notées A, B et C (figure 3). Les résultats présentés sur la figure 7 montrent que, pour chacune des sections analysées, le flux viral mesuré en aval de la portion correspond à la somme du flux mesuré en amont, du flux viral provenant des effluents de STEP et du flux viral issu des affluents (cas des sections A et C uniquement), ce qui valide nos résultats et démontre l'absence de rejets alternatifs majeurs viraux important dans les eaux de surface. Les résultats soulignent également la contribution majoritaire des effluents de STEP à la contamination

de la Seine, tandis que la contribution des affluents (Marne et Oise) demeurait l'essentiel du temps très minoritaire.

De plus, les flux viraux les plus importants ont été enregistrés sur la période de décembre 2013 à mars 2014 et résultaient principalement d'une augmentation des flux viraux issus des effluents de STEP. Par ailleurs, l'augmentation des taux d'incidence des diarrhées aiguës en Ile de France (données issues du réseau Sentinelles) était en accord avec l'augmentation des flux viraux dans les effluents de STEP sur la même période (trait grisé, figure 6).

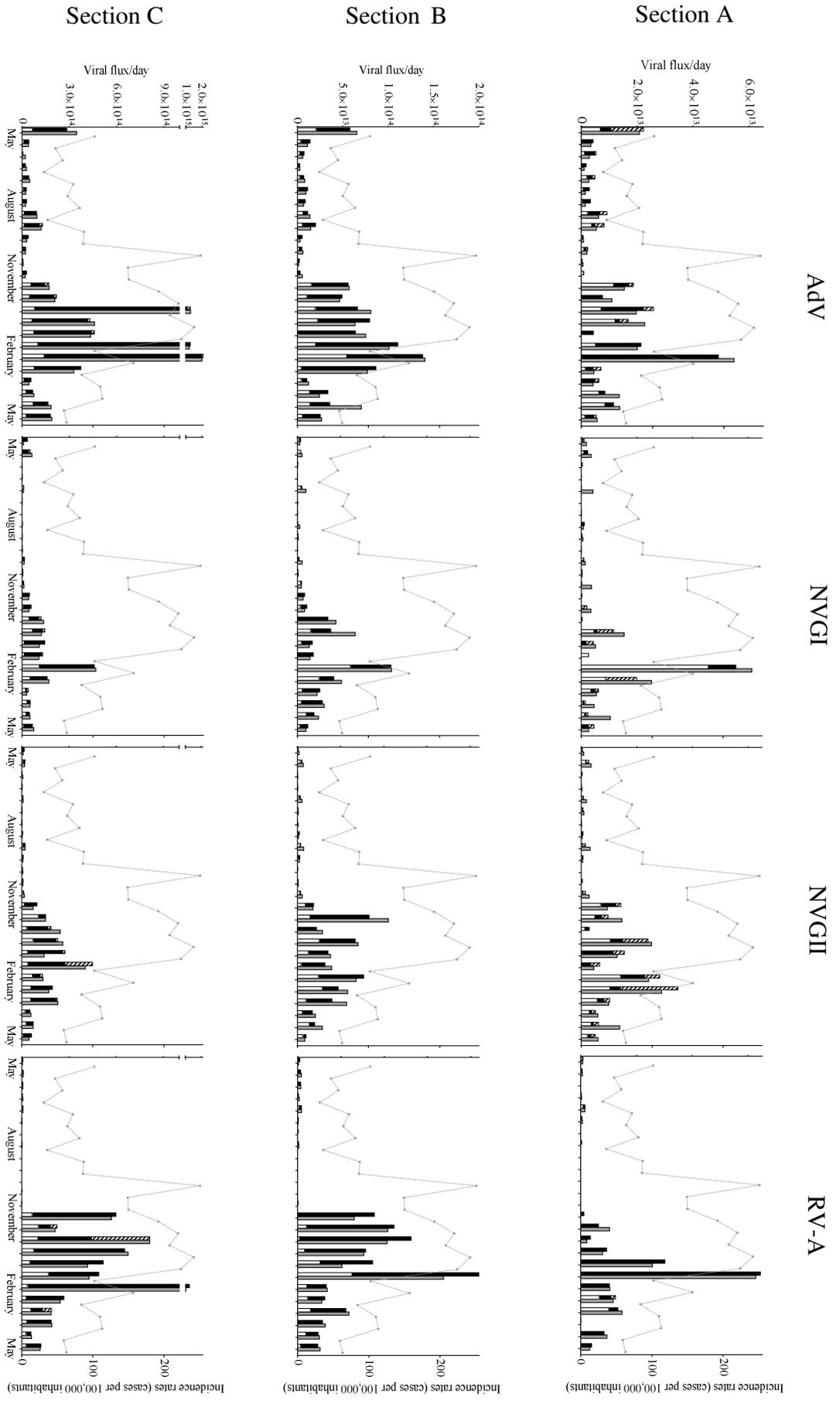
Le calcul des flux viraux s'est avéré une approche pertinente dans l'identification des sources de contamination virale de la Seine puisqu'il a permis la prise en compte du débit de chaque rejet et du débit du milieu récepteur, dans le cas de notre étude la Seine, et de prendre en compte les effets de dilutions. Ainsi, les effluents de STEP ont été identifiés comme les principaux contributeurs de pollution virale du bassin versant étudié. La mise en place de traitements de désinfection des particules virales au niveau des STEP pourrait permettre de limiter la circulation de la quasi-totalité des virus entériques humains dans les milieux hydriques. De plus, sur les 90 km de tronçon urbain de la Seine qui ont été étudiés, une accumulation des flux viraux a été observée. Ce constat souligne d'une part la capacité des particules virales à persister dans l'environnement et d'autre part une sédimentation de ces particules virales relativement faible ou tout du moins équivalente à la quantité de virus remobilisés par remise en suspension des sédiments.

#### 4.3. Variation saisonnière des densités virales

Les charges virales mesurées au niveau des effluents de STEP, et donc par extension celles mesurées dans les rivières, suivent un effet saisonnier au même titre que la plupart des virus entériques. En effet, au vu des données issues du réseau Sentinelles, une cohérence a pu être observée entre l'état sanitaire de la population raccordée à un système de traitement des eaux usées et les variations de charges virales observées en sortie de STEP.

Etant donné, que l'eau de la Seine est utilisée comme source de captage par les usines de potabilisation, il serait intéressant de voir si durant la période hivernale où les charges virales observées sont les plus importantes, avec des valeurs pouvant aller jusqu'à  $1,16 \times 10^4$  copies/L uniquement pour les rotavirus de type A dans la Seine, les traitements au niveau de ces usines de potabilisation ne nécessiteraient pas des ajustements.

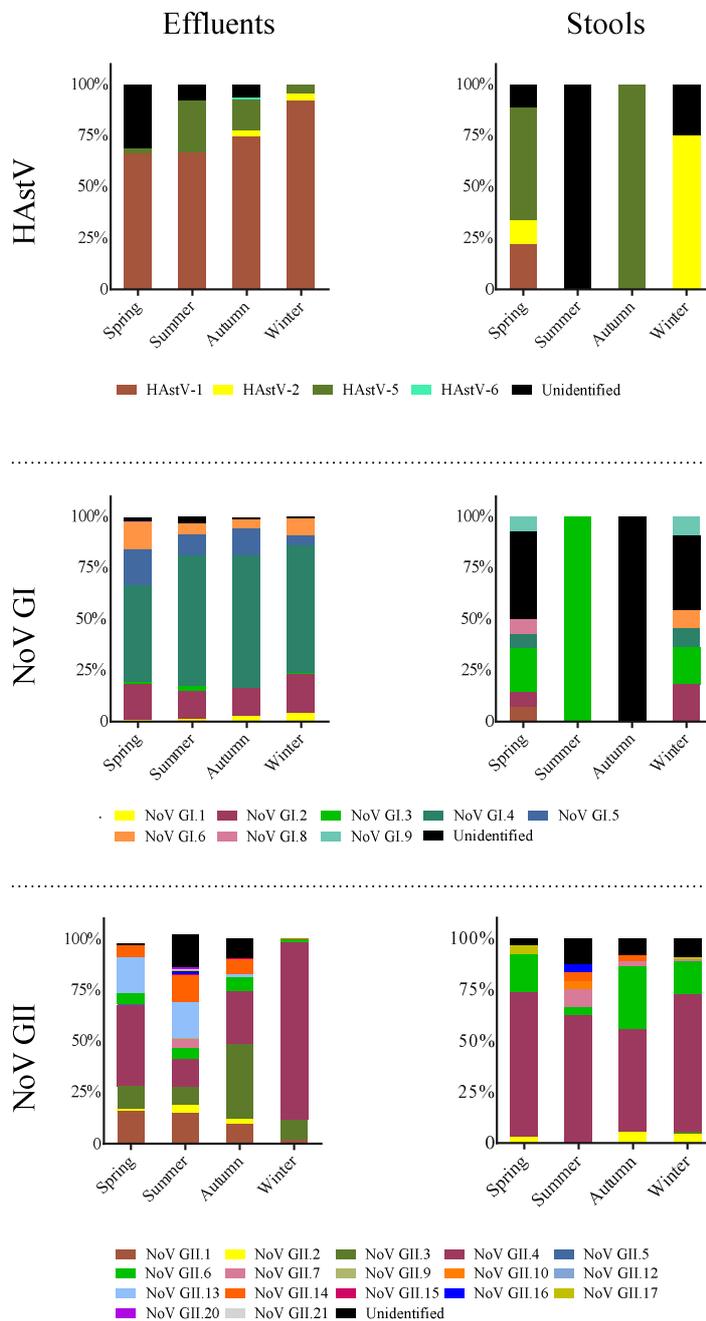
**Figure 6 (page suivante). Flux viraux mesurés pour les populations virales majoritaires sur différentes portions de la Seine. Pour chaque série de prélèvements, l'histogramme de gauche correspondait à la somme du flux viral amont , du flux viral des effluents de STEP  et du flux d'un affluent . L'histogramme de droite représente le flux viral mesuré en aval de la section de Seine . Le taux d'incidence de diarrhées aiguës au sein de la population en Ile de France était représenté par la courbe .**



#### 4.4. Diversité des virus dans l'environnement

À l'heure actuelle, l'essentiel des données épidémiologiques concernant les infections liées aux virus entériques repose sur des études réalisées sur des selles humaines généralement isolées en clinique. Pourtant de nombreuses études mettent en évidence que ce type d'infection n'engendre que très rarement des symptômes sévères nécessitant une hospitalisation ou une consultation spécialisée (Barrabeig i Fabregat et al. 2010, Meliopoulos and Schultz-Cherry 2013, Simpson et al. 2003). Par conséquent, les données épidémiologiques ne pourraient être qu'un reflet biaisé des souches virales circulant au sein de la population. Le chapitre précédent portant sur le suivi de la contamination virale d'une rivière réceptrice des effluents de STEP a mis en évidence une cohérence entre l'état sanitaire de la population raccordée à un système de traitement des eaux usées et les charges virales observées au niveau des effluents de STEP (Prevost et al. 2015). Ces résultats ont aussi montré qu'il y avait une grande variété de virus entériques présents dans les effluents de STEP et les eaux de surface, avec des prévalences différentes entre les groupes viraux, notamment les norovirus, les adénovirus et les rotavirus prédominaient dans les eaux usées et les eaux de surface. Les astrovirus étaient également présents à des concentrations et des fréquences de détection élevées dans l'ensemble des matrices d'eau analysées. Les rotavirus, les norovirus et les astrovirus sont considérés comme les principaux agents étiologiques de gastroentérites virales chez des individus de tout âge confondu au niveau mondial (Higgins et al. 2012). Alors que de nombreuses études portent sur la diversité des norovirus circulant dans l'environnement, peu d'études se sont intéressées à la diversité des astrovirus et des rotavirus dans l'environnement. Le fait que les rotavirus soient constitués d'un génome segmenté et que leur identification soit réalisée sur plusieurs segments rend les études de diversité très complexes dans l'environnement.

Nous avons donc analysé ici la diversité des souches d'HAstV, de NoV GI et de NoV GII détectées au sein des effluents de STEP sur une période d'un an. Les effluents de STEP sont issus des quatre principales STEP d'Ile-de-France, en charge du traitement des eaux usées d'environ 9 millions d'habitants (environ 15% de la population française). Cette approche a également permis d'évaluer la pertinence du séquençage haut débit ciblé dans le cadre d'une analyse de la diversité de virus humains issus d'un environnement où ils représentent une population largement minoritaire par rapport à l'ensemble des micro-organismes présents. Pour conclure, la cohérence de cette diversité virale identifiée dans les effluents de STEP a été évaluée par rapport à la diversité virale observée au sein des selles récoltées en routine par le centre national de référence français des virus entériques (CNR des virus entériques, CHU de Dijon). L'étude de la diversité virale est présentée figure 7.



**Figure 7: diversité des HAsTV (n= 5990), NoV GI (n= 7469) and NoV GII (n= 6299) des effluents de STEP. Prélèvement de mai 2013 ) mai 2014. La diversité des HAsTV (n = 15), NoV GI (n= 38) and NoV GII (n= 256) des données cliniques et représenté à droite.**

L'utilisation du séquençage haut débit a permis de pouvoir analyser un grand nombre d'échantillons en peu de temps mais également d'apporter une profondeur d'analyse bien plus importante qu'une approche basée sur la sélection et identification clonale par séquençage de type Sanger. En effet, au vu des résultats, de nombreux génotypes (HAsTV-2, NoV GI.1, NoV GI.4, NoV GII.2, NoV GII.5, NoV GII.6, , NoV GII.7, , NoV GII.9, , NoV GII.12, , NoV GII.15, NoV GII.20 et NoV GII.21) représentaient seulement quelques pourcents de l'ensemble des séquences analysées. La détection de ces génotypes aurait vraisemblablement nécessité l'analyse d'un grand nombre de séquences isolées clonalement, impliquant des contraintes chronophages et une augmentation des coûts d'analyse.

Une certaine cohérence a été observée entre la diversité des génotypes dans les effluents de STEP et celle observée en clinique par le CNR, même si l'échantillonnage régional des effluents de STEP a permis l'identification d'un plus grand nombre de génotypes qu'en clinique où l'échantillonnage était pourtant national.

Le NoV GII.4 est reconnu pour être le génotype viral le plus impliqué dans les cas d'épidémies de gastroentérites à travers le monde. Il présente un fort taux de mutations nucléotidiques au niveau de l'ORF1 qui code la protéine majeure de capsid (VP1), participant à l'émergence de nouveaux variants épidémiques tous les deux à trois ans. Dans l'optique d'une approche vaccinale, il pourrait être nécessaire de pouvoir identifier le variant majoritaire circulant au sein de la population. Cette étude met en évidence la possibilité d'identifier très rapidement l'émergence d'un nouveau variant NoV GII.4 au sein de la population sans pour autant devoir attendre les données cliniques.

Finalement, cette étude met en évidence que le suivi de la diversité des virus entériques humains dans l'environnement participerait à une meilleure compréhension de la circulation virale au sein de la population humaine. Ce type d'approche serait plus difficilement réalisable dans les eaux usées directement du fait de la nature fortement inhibante de la matrice hydrique et des restrictions d'accès à cette matrice. L'impact du transit à travers les STEP sur la diversité des populations virales devra toutefois être évalué.

## 5. CONCLUSION

L'objectif global de ce travail était d'apporter des éléments de réponses concernant la circulation des virus entériques dans un bassin versant urbain et d'analyser l'impact de différents facteurs sur leur dynamique.

**Il a ainsi été mis en évidence que les STEP étaient les principaux contributeurs à la contamination virale du bassin versant étudié.** Cette conclusion a pu être établie par une approche basée sur le calcul de flux viraux permettant d'évaluer la contribution des effluents de STEP et des principaux affluents sur la contamination virale de la Seine. Les variations saisonnières des charges virales dans les effluents de STEP étaient cohérentes avec les données épidémiologiques, à savoir une charge virale plus importante durant la période hivernale pour la plupart des virus entériques recherchés. Globalement, ce travail a souligné le lien étroit entre les charges virales observées dans les effluents de STEP et l'état sanitaire de la population humaine raccordée au réseau d'assainissement. Ce travail a également permis de constater la présence de nombreuses populations de virus entériques circulants au sein des eaux environnementales.

Quelques éléments techniques sont à souligner, tout d'abord, la méthode de concentration développée ici permet l'analyse d'un large panel de virus entériques (adénovirus, astrovirus, cosavirus, entérovirus, norovirus de génogroupes I et II, rotavirus, salivirus, sapovirus, virus Aichi et les virus de l'hépatite A et E) dans différentes matrices hydriques telles que les eaux destinées à la consommation humaine, les effluents de STEP et les eaux douces de surface. Afin de s'assurer du bon déroulement des processus de concentration et de détection des virus entériques humains, un contrôle global d'origine adénovirale a été développé, auquel ont été associés deux autres contrôles mis en place au niveau d'étapes clés. Le premier contrôle permet, au travers de l'inoculation d'une quantité maîtrisée de bactériophage MS2 dans le concentrât de l'échantillon, de valider à la fois l'étape d'extraction et l'étape de transcription inverse. Le second contrôle est quant à lui un contrôle d'inhibition compétitif inoculé dans le mélange réactionnel de (RT)-PCR en temps réel afin de valider l'étape d'amplification et de quantification des génomes viraux. **Ces multiples points de contrôles permettent de fournir des informations indispensables à l'exploitation du résultat final et soulignent des adaptations de protocole qui seraient nécessaires pour répondre aux potentielles fluctuations des paramètres physico-chimiques des matrices hydriques pouvant impacter la fiabilité des résultats.** Cette partie essentielle est nécessaire à l'exploitation des résultats environnementaux et trop souvent négligée dans les campagnes de suivi (AESN 2009 par exemple). Cependant, même si ces trois contrôles permettent de fournir des valeurs de référence validant ou invalidant le processus d'analyse, ils ne peuvent pas non plus garantir le bon déroulement de ce processus d'analyse pour l'ensemble des virus entériques. En effet, il serait tout à fait envisageable d'avoir des effets perturbateurs liés à la matrice environnementale qui impacteraient uniquement certains types de virus, sans pour autant influencer sur les contrôles mis en place, ceux-ci ne possédant pas strictement les mêmes propriétés que les virus entériques recherchés. C'est notamment pour cette raison que nous avons privilégiée le choix de développer un contrôle de processus basé sur un adénovirus humain (de type 5), plutôt que d'utiliser un virus animal de substitution tel que le norovirus murin ou le calicivirus félin pourtant fréquemment rapportés dans la littérature.

D'autres résultats, non montrés ici, prouvent qu'un protocole de détection par des méthodes de biologie moléculaire précédé par un prétraitement basé sur l'emploi d'agents intercalant permet d'avoir des résultats proches de ceux de la culture cellulaire après que les virus aient subi un traitement au chlore, ou déstabilisant la capsid. Différentes applications de ces méthodes montrent que l'utilisation d'agents intercalant pour évaluer l'intégrité des virus entériques détectés par (RT)-qPCR était une approche pertinente à conditions que parmi les traitements mis en place, il y ait au moins un traitement capable de détériorer leur capsid virale. L'application de ces agents intercalant sur un certain nombre de prélèvements a démontré que les virus mesurés dans notre étude comportaient en grande majorité une capsid intègre.

## 6. BIBLIOGRAPHIE

- Acheson, D., Bresee, J.S., Widdowson, M.-A., Monroe, S.S. and Glass, R.I. (2002) Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities. *Clinical Infectious Diseases* 35(6), 748-753.
- Aw, T.G. and Gin, K.H. (2011) Prevalence and genetic diversity of waterborne pathogenic viruses in surface waters of tropical urban catchments. *J Appl Microbiol* 110(4), 903-914.
- Barrabeig i Fabregat, I., Rovira, A., Buesa, J., Bartolomé, R., Pintó Solé, R.M., Prellezo, H. and Domínguez García, À. (2010) Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler. *BMC Infectious Diseases*, 2010, 10: 269.
- Blacklow, N.R. and Greenberg, H.B. (1991) Viral gastroenteritis. *New England Journal of Medicine* 325(4), 252-264.
- Carducci, A., Morici, P., Pizzi, F., Battistini, R., Rovini, E. and Verani, M. (2008) Study of the viral removal efficiency in a urban wastewater treatment plant. *Water Science and Technology* 58(4), 893.
- De Paula, V.S., Diniz-Mendes, L., Villar, L.M., Luz, S.L., Silva, L.A., Jesus, M.S., da Silva, N.M. and Gaspar, A.M. (2007) Hepatitis A virus in environmental water samples from the Amazon Basin. *Water Res* 41(6), 1169-1176.
- Farthing, M., Salam, M.A., Lindberg, G., Dite, P., Khalif, I., Salazar-Lindo, E., Ramakrishna, B.S., Goh, K.-L., Thomson, A. and Khan, A.G. (2013) Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. *Journal of clinical gastroenterology* 47(1), 12-20.
- Friesema, I.H.M., Lugné, A.K. and van Duynhoven, Y.T.H.P. (2012) Costs of gastroenteritis in the Netherlands, with special attention for severe cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31(8), 1895-1900.
- Grøndahl-Rosado, R., Yarovitsyna, E., Trettenes, E., Myrmed, M. and Robertson, L. (2014) A One Year Study on the Concentrations of Norovirus and Enteric Adenoviruses in Wastewater and A Surface Drinking Water Source in Norway. *Food Environ Virol* 6(4), 232-245.
- Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K. and Wilhelm, M. (2011) Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *Int J Hyg Environ Health* 214(6), 424-436.
- Hellard, M.E., Sinclair, M., Harris, A.H., Kirk, M. and Fairley, C.K. (2003) Cost of community gastroenteritis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 18(3), 322-328.
- Higgins, G., Schepetiuk, S. and Ratcliff, R. (2012) Aetiological importance of viruses causing acute gastroenteritis in humans. *Microbiology Australia* 33(2), 49-52.
- Katayama, H., Haramoto, E., Oguma, K., Yamashita, H., Tajima, A., Nakajima, H. and Ohgaki, S. (2008) One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res* 42(6-7), 1441-1448.
- Kohn, T., Grandbois, M., McNeill, K. and Nelson, K.L. (2007) Association with Natural Organic Matter Enhances the Sunlight-Mediated Inactivation of MS2 Coliphage by Singlet Oxygen. *Environ Sci Technol* 41(13), 4626-4632.
- Lopman, B.A., Reacher, M.H., Vipond, I.B., Hill, D., Perry, C., Halladay, T., Brown, D.W., Edmunds, W.J. and Sarangi, J. (2004) Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002-2003. *Emerg Infect Dis* 10(10), 1827.
- Meliopoulos, V. and Schultz-Cherry, S. (2013) *Astrovirus Research*, pp. 65-77, Springer.
- Patel, M.M., Widdowson, M.-A., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinjé, J. and Parashar, U.D. (2008) Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 14(8), 1224.
- Prevost, B., Lucas, F.S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L. and Wurtzer, S. (2015) Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environ Int* 79, 42-50.
- Rodrigues, L.C., Lordan, G., Roberts, J., Normand, C., Higgins, C.D., Chady, S. and Tam, C.C. (2008) The economic impact of Gastroenteritis on the island of Ireland: Report to safefood (The Food Safety Promotion Board).
- Sair, A.I., D'Souza, D.H. and Jaykus, L.A. (2002) Human enteric viruses as causes of foodborne disease. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 1(2), 73-89.
- Simpson, R., Aliyu, S., Iturriza-Gómara, M., Desselberger, U. and Gray, J. (2003) Infantile viral gastroenteritis: On the way to closing the diagnostic gap. *J Med Virol* 70(2), 258-262.
- Steyer, A., Torkar, K.G., Gutiérrez-Aguirre, I. and Poljšak-Prijatelj, M. (2011) High prevalence of enteric viruses in untreated individual drinking water sources and surface water in Slovenia. *Int J Hyg Environ Health* 214(5), 392-398.
- Victoria, M., Tort, L.F.L., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Cristina, J. and Colina, R. (2014) Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay. *Food Environ Virol* 6(2), 116-124.
- Wigginton, K.R. and Kohn, T. (2012) Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. *Current Opinion in Virology* 2(1), 84-89.

## 7. Activités scientifiques

### 7.1. Activités de formation

- B. Prevost a effectué 64 h eq. TD d'enseignement pendant 2 ans, F. Lucas est enseignant-chercheur et effectue donc un service d'environ 220 h eq. TD chaque année, L. Moulin intervient à l'UPEC dans les formations du Master SGE.
- cours dans des formations existantes : M1 SGE et M2 SAGE (microbiologie, cours d'introduction à la diversité microbienne, cours sur les pathogènes dans les milieux aquatiques, écologie aquatique,), cours, TD et TP en licence (Biochimie, biotechnologie, outils statistiques), cours en M2 TES (ecotoxicologie).
- création de nouvelles formations universitaires : F. Lucas est co-responsable d'un nouveau parcours du master STA2E à l'UPEC. Ce nouveau parcours intitulé « Biologie intégrative (OMICs) est en création pour une rentrée en 2016 en M1 et M2. Cette formation a reçu une labélisation par le pôle de compétitivité MEDICEN
- séminaires de doctorants / post-doctorants Séminaires annuels du Leesu, Ecole thématique Viro2omique organisée par le CNRS à Clermont-Ferrand en octobre 2014

### 7.2. Résultat de thèse

Benoit Prévost a soutenu avec succès sa thèse de doctorat de l'Université Paris Est le 28/09/2015. Il est présenté pour un prix de thèse à l'ENPC.

### 7.3. Publications du projet :

- 1 - Prevost B, Goulet M, Lucas FS, Joyeux M, Moulin L, Wurtzer S. *Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes.* **Water Res.** 2015 Dec 31; 91:68-76.
- 2 - Prevost B, Lucas FS, Ambert-Balay K, Pothier P, Moulin L., Wurtzer S. *Deciphering the Diversities of Astroviruses and Noroviruses in Wastewater Treatment Plant Effluents by a High-Throughput Sequencing Method.* **Appl Environ Microbiol.** 2015 Oct; 81(20):7215-22.
- 3 - Prevost B, Lucas FS, Goncalves A, Richard F, Moulin L, Wurtzer S. *Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population.* **Environ Int.** 2015 Jun; 79:42-50.
- 4 - Wurtzer S, Prevost B, & Moulin L. *Detection of enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits.* **J Virol Methods.** 2014 Dec; 209:47-54.

### 7.4. Communications du projet :

- 1 - Premières Journées Franco-Maghrébines de Virologie 2013 Marrakech, Maroc : Développement d'une méthode de détection des adénovirus dans les cours d'eau franciliens
- 2 - Premières Journées Franco-Maghrébines de Virologie 2013 Marrakech, Maroc : Dynamique de la contamination virale de la Seine.
- 3 - Young Europeans' Seminar 2013: Viral dynamic in the rivers of Île-de-France region : analysis elements of climatic impact.
- 4 - 4th Food and Environmental Virology Conference 2014 Corfu, **Grèce** : Dynamic of viral contamination of the river Seine.
- 5 - 18th International Symposium on Health-Related 2015 Lisbon, **Portugal** : Untangling the enteric virus diversity circulating in a population linked to a sewerage network
- 6 - Journée Information Eaux, 2016 Poitiers, France : Persistance virale dans des eaux de surface et de consommation : Pertinence de l'utilisation des agents intercalants pour une détection moléculaire.

## 8. Retombés scientifiques

Benoit Prévost est actuellement Ingénieur de recherche et développement en virologie alimentaire et environnementale à Abioloab-Asposan et au CHU de Grenoble

### 8.1. Visibilité internationale :

- Accueil de chercheurs étrangers : M. Sassi, stage de fin d'étude de l'école d'ingénieur INSAT de Tunis (Tunisie) au Leesu et au SIAAP
- Nouveaux doctorants/post-doctorants accueillis: 0
- Nombre de chercheurs du projet/réseau invités à des manifestations internationales
- 1 chercheur et 1 doctorant : 2 communications aux Premières Journées Franco-Maghrébines de Virologie, 23-24-25 octobre 2013, Marrakech

- 1 doctorant : 1 communication orale à Food and Environmental Virology conference (FEV), 2-5 septembre 2014, Corfu (Grèce)

## **8.2. Diffusion vers le grand public**

- activités vers la société civile
- colloque annuel du PIREN-Seine en 2013, 2014, 2015 avec environ 200 personnes dans l'assistance.