

<u>OPUR : Observatoire des Polluants Urbains en Île de France</u> <u>Thème de recherche : Ouvrages des traitements centralisés : STEP et</u> <u>SDEP</u> <u>Action de recherche : 7.2 - ETUDE EXPLORATOIRE SUR LES</u> <u>VIRUS DANS LES EAUX URBAINES</u>

DYNAMIQUE DE LA CONTAMINATION VIRALE DANS UN ENVIRONNEMENT HYDRIQUE URBAIN

Rapport final Thèse de doctorat de Benoit Prévost Date 28 septembre 2015

• Informations complémentaires : Allocation doctorale DIM R2DS (Ile de France) ; Directeur de Thèse F. Lucas (LEESU) ; financement Eau de Paris et co-encadrement par L. Moulin et S. Wurtzer ; co-financement SIAAP et suivi par A. Goncalves et F. Richard (membres du comité de suivi de thèse)



UNIVERSITÉ PARIS-EST

École doctorale : Sciences, Ingénierie et Environnement

Thèse de doctorat

Mention Sciences et Techniques de l'environnement

Dynamique de la contamination virale dans un environnement hydrique urbain

Auteur : Benoit PREVOST

Directrice de thèse : Françoise LUCAS

Co-encadrants : Sébastien WURTZER et Laurent MOULIN

Date de soutenance : 28 septembre 2015

MEMBRES DU JURY

Président : Pr Jean-Marie MOUCHEL (METIS, UMR 7619, UPMC)

<u>Rapporteurs</u>: Pr Christophe GANTZER (LCPME, UMR 7564, Université de Lorraine-CNRS) Pr Jacques IZOPET (Laboratoire de Virologie, CHU de Toulouse)

<u>Examinateurs :</u> Dr Sylvie Perelle (Laboratoire Sécurité des Aliments, ANSES de Maison-Alfort) Pr Stéphan Jacquet (BioFEEL, UMR CARRTEL, INRA de Thonon-les-Bains)

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	
PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1 Les principaux virus entériques humains à transmission hydrique	
1.1 Généralités	
1.2 Les Adenoviridae	
1.2.1 Généralités	
1.2.2 Les Mastadenovirus	
1.2.2.1 Structure et classification	
1.2.2.2 Epidémiologie clinique	
1.2.2.3 Méthodes de détection	
1.3 Les Astroviridae	
1.3.1 Généralités	
1.3.2 Les Mamastrovirus	
1.3.2.1 Structure et classification	
1.3.2.2 Epidémiologie clinique	
1.3.2.3 Méthode de détection	
1.4 Les Caliciviridae	
1.4.1 Généralités	
1.4.2 Les Norovirus	
1.4.2.1 Structure et classification	
1.4.2.2 Epidémiologie clinique	
1.4.2.3 Méthodes de détection	
1.4.3 Les Sapovirus	
1.4.3.1 Structure et classification	
1.4.3.2 Epidémiologie clinique	
1.4.3.3 Méthodes de détection	
1.5 Les Hepeviridae	
1.5.1 Généralités	
1.5.2 Les Orthohepevirus	
1.5.2.1 Structure et classification	
1.5.2.2 Epidémiologie clinique	
1.5.2.3 Méthodes de détection	
1.6 Les Picornaviridae	
1.6.1 Généralités	
1.6.2 Les Enterovirus	
1.6.2.1 Structure et classification	
1.6.2.2 Epidémiologie clinique	
1.6.2.3 Méthodes de détection	
1.6.3 Les Kobuvirus	
1.6.3.1 Structure et classification	
1.6.3.2 Epidémiologie clinique	
1.6.3.3 Méthodes de détection	
1.6.4 Les Cosavirus	
1.6.4.1 Structure et classification	
1.6.4.2 Epidémiologie clinique	
· - ·	

1.6.4.3 Méthodes de détection	40
1.6.5 Les Salivirus	40
1.6.5.1 Structure et classification	40
1.6.5.2 Epidémiologie clinique	40
1.6.5.3 Méthodes de détection	41
1.6.6 Les Hepatovirus	41
1.6.6.1 Structure et classification	41
1.6.6.2 Epidémiologie clinique	41
1.6.6.3 Méthodes de détection	42
1.7 Les Reoviridae	42
1.7.1 Généralités	42
1.7.2 Les Rotavirus	43
1.7.2.1 Structure et classification	43
1.7.2.2 Epidémiologie clinique	44
1.7.2.3 Méthodes de détection	45
2 Les virus entériques dans l'environnement hydrique	45
2.1 Les eaux en station d'épuration	47
2.1.1 Généralités	47
2.1.2 Les eaux usées	48
2.1.3 Les eaux usées traitées	49
2.2 Les eaux environnementales	52
2.2.1 Les eaux douces de surface	52
2.2.2 Les eaux souterraines	52
2.2.3 Les eaux marines	54
2.3 Persistance virale dans l'environnement hydrique	54
2.3.1 Généralités	54
2.3.2 Eau souterraine	55
2.3.3 Eau de mer	55
2.3.4 Eau potable	56
2.4 Traitements de désinfection	56
2.4.1 Les rayons ultraviolets	56
2.4.2 Le chlore	58
2.4.3 L'ozone	59
2.4.4 La température	61
2.5 Les épidémies virales de gastroentérites d'origine hydrique	62
2.5.1 Généralités	62
2.5.2 Origines de la contamination	62
2.5.3 Principaux virus entériques impliqués	63
2.5.4 Conclusion	65
3 Les outils d'analyse utilisés dans l'environnement	65
3 1 Méthodes de concentration des virus entériques	
3.1.1 Méthodes de concentrations basées sur le poids moléculaire des virus entériques	66
3.1.1 Illtracentrifugation	66
3.1.1.2 Ultrafiltration tangentielle	 68
3 1 2 Méthodes de concentrations basées sur la charge électrique de la canside des virus entériques	60
3.1.2 Adsorption-élution	وں ۵۵
3.1.2.1 Ausorption creation and the précipitation	09 17
3 1 3 Méthodes de détection des virus entériques	/4 75
3 1 3 1 Méthodes de détection virale par culture cellulaire	75 76
3 1 3 1 1 Décontamination des échantillons environnementaux	70
3 1 3 1 2 Culture cellulaire	70

3.2.3.1.1 Phages de <i>Bacteroides</i>	
3.2.3.1.2 Coliphages somatiques	
3.2.3.1.3 Les coliphages ARN F-spécifique	
3.2.3.2 Les virus humains	
3.2.3.2.1 Les Adenovirus	
3.2.3.2.2 Les Polyomavirus	
3.2.3.3 Autres types de virus	
3.2.3.3.1 Les Torque teno virus	
3.2.3.3.2 Les Pepper mild mottle virus	
3.2.3.3.3 Les PICODIMAVILUS HUMains	
I ANTIE II - NESULTATS	
Chapitre 1: Analyse des facteurs influençant la circulation des virus entéri	
Chapitre 1: Analyse des facteurs influençant la circulation des virus entéri Article 1: Detection of Enterovirus in environmental waters: a new optim commercial real-time RT-qPCR kits Article 2: Large scale survey of enteric viruses in river and waste water un local population	ques dans un bassin versant urbain 94 nized method compared to 98 nderlines the health status of the 118
 Chapitre 1: Analyse des facteurs influençant la circulation des virus entéri Article 1: Detection of Enterovirus in environmental waters: a new optim commercial real-time RT-qPCR kits Article 2: Large scale survey of enteric viruses in river and waste water un local population Chapitre 2: Analyse de la diversité des astrovirus et norovirus humains circulation des virus et norovirus diversity in wastewate 	94 ques dans un bassin versant urbain 95 bized method compared to 98 biderlines the health status of the 118 culants dans l'environnement 140 er treatment plant effluents 141
 Chapitre 1: Analyse des facteurs influençant la circulation des virus entéri Article 1: Detection of Enterovirus in environmental waters: a new optim commercial real-time RT-qPCR kits Article 2: Large scale survey of enteric viruses in river and waste water un local population Chapitre 2: Analyse de la diversité des astrovirus et norovirus humains cirre Article 3: Deciphering the astrovirus and norovirus diversity in wastewate Chapitre 3: Persistance des virus entériques dans l'eau de surface et l'eau l'utilization d'aronts intercalants 	94 ques dans un bassin versant urbain 95 nized method compared to 98 nderlines the health status of the 118 culants dans l'environnement 140 er treatment plant effluents 141 potable : pertinence de 162
 Chapitre 1: Analyse des facteurs influençant la circulation des virus entéri Article 1: Detection of Enterovirus in environmental waters: a new optim commercial real-time RT-qPCR kits	94 ques dans un bassin versant urbain 95 nized method compared to 98 nderlines the health status of the 118 culants dans l'environnement 140 er treatment plant effluents 141 potable : pertinence de 163 sercalating dyes
 Chapitre 1: Analyse des facteurs influençant la circulation des virus entéri Article 1: Detection of Enterovirus in environmental waters: a new optim commercial real-time RT-qPCR kits Article 2: Large scale survey of enteric viruses in river and waste water un local population Chapitre 2: Analyse de la diversité des astrovirus et norovirus humains cir Article 3: Deciphering the astrovirus and norovirus diversity in wastewate Chapitre 3: Persistance des virus entériques dans l'eau de surface et l'eau l'utilisation d'agents intercalants Article 4: Viral persistence in surface and drinking water: suitability of int DISCUSSION GENERALE - CONCLUSIONS. 	94 ques dans un bassin versant urbain 95 nized method compared to 98 nderlines the health status of the 118 culants dans l'environnement 140 er treatment plant effluents 141 potable : pertinence de 163 cercalating dyes

Liste des abréviations

- ADN : acide désoxyribonucléique AiV : virus Aichi ARN : acide ribonucléique BAM : bioréacteur à membrane BSA : albumine de sérum bovin CsCl : chlorure de césium db : double brin ECP : effet cytopathogène EMA : éthidium monoazide EV : entérovirus FCV : calicivirus félin HAdV : adénovirus humain HAstV : astrovirus humain HCoSV : cosavirus humain ICC-PCR : integrated culture cell-PCR IRES : internal ribosomal entry site ITR : répétition inversée terminale MNV-1 : norovirus murin 1 MOI : multiplicité d'infection NoV : norovirus NPP : nombre le plus probable NTR : région non traduite OMS : organisation mondiale de la santé ORF : cadre ouvert de lecture pb : paire de bases PCR : polymerase chain reaction
- PEG : polyéthylèneglycol PMA : propidium monoazide PMMoV : Pepper mild mottle virus RdRp : ARN polymérase ARN-dépendante RT-qPCR : reverse transcriptionquantitativePCR SapoV : sapovirus sb : simple brin STEP : station d'épuration TCID : tissue culture infective dose TTV : Torque teno virus UV : ultraviolet VHA : virus de l'hépatite A VHE : virus de l'hépatite E VLP : pseudo particule virale

Liste des figures

Figure 1: Arbre phylogénétique représentant les 5 genres composant actuellement la famille des <i>Adenoviridae</i> dont l'analyse repose sur la séquence de l'hexon. Une couleur a été attribuée à chaque genre ainsi qu'aux espèces qui lui sont associées. Les virus appartenant à la même espèce sont placés dans un ovale vert et l'espèce à la droite de cet ovale. Les abréviations des noms de virus à l'extrémité de chaque branche sont B : bovin, C : canin, D :
capard E : équin E : volaille Er : gronouille H : humain M : murin O : ovin B : porcin Bo :
canard, E. equili, F. volanie, F. grenounie, H. numani, M. munn, O. ovin, F. porcin, Fo.
opossum, Sn : serpent, 1 : dinde, S : primate, TS : scandentien {Davison, 2003 #995}
Figure 2: Observation par microscopie electronique d'un adenovirus de type 41 (les fleches
indiquent les fibres composant la capside virale {El Bakkouri, 2008 #868}
Figure 3: Schématisation de la structure génomique d'HAdV avec les différentes régions
codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en
orange. I indiquent le sens de transcription
Figure 4: Arbre phylogénétique représentant les 2 genres composant actuellement la famille
des Astroviridae dont l'analyse repose sur la séquence de l'ORF2 {Jeong, 2012 #993}22
Figure 5: Astrovirus humains observés par microscopie électronique {Caul, 1982 #863} 23
Figure 6: Schématisation de la structure génomique d'HAstV avec les différentes régions
codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange
(nsP1a avec Hel : hélicase, Pro : protéase et VPg et nsP1b avec RdRp)23
Figure 7: Arbre phylogénétique des 5 genres composant actuellement la famille des
Caliciviridae dont l'analyse repose sur la région codant la protéine RdRp {Simmonds, 2008
#867}
Figure 10: Evolution des épidémies à NoV GII.4 en France entre 2000 et 2010 mettant en
évidence l'émergence et la prédominance de nouveaux variants {de Rougemont, 2012 #869}.
Figure 11: Sapovirus humains observés par microscopie électronique (F.P. Williams, U.S.
EPA)
Figure 12: Schématisation de la structure génomique de sapovirus avec les différentes
régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales
en orange
Figure 13: Virus de l'hépatite E humains observés par microscopie électronique {Xing, 2010
#1047}
Figure 14: Schématisation de la structure génomique de VHE (valable pour les génotypes
VHE1, VHE2, VHE3 et VHE4) avec les différentes régions codant la protéine structurale
colorée en vert et les protéines non structurales en orange. (MT : méthyltransférase, Y :
macrodomaine, Pro : cystéine protéase, PPR : région riche en proline, X : macro domaine,
Hel : hélicase, Pol : RdRp, CP : protéine de capside)33
Figure 15: Cartographie de la distribution des génotypes de VHE identifiés chez les animaux
et les humains. Les couleurs sont utilisées pour les pays et les cercles pour mettre en
évidence le génotype majoritaire du pays. 🛠 indiquent les zones fortement endémiques
{Aggarwal, 2011 #1031}

Figure 16 : Schématisation de la structure génomique des virus appartenant à la famille des <i>Picornaviridae</i> avec les différentes régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange
Figure 17: Représentation des principaux genres et espèces composant la famille des <i>Picornaviridae</i> avec une classification basée sur la région codant la protéine 3D (RdRp). (Abbréviations : HPeV : paréchovirus humains ; HEV : entérovirus humains ; HRV : rhinovirus humains ; ERAV : rhinovirus équins ; FMDV : virus lié aux maladies pieds-mains-bouche ;
EMCV : virus de l'encéphalomyocardite {Adams, 2013 #722}
Figure 19: Rotavirus humains observés par microscopie électronique (F.P. Williams, U.S. EPA)
Figure 20: Schématisation de la structure génomique de rotavirus de groupe A avec les différentes régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange (• représente la coiffe au niveau de l'extrémité 5')
Figure 23 : Types d'eau (A) et virus entériques (B) impliqués dans les épidémies de gastroentérites humaines répertoriés entre 2000 et 2012 provenant du Tableau 11
Figure 25: Schématisation des principes de la filtration tangentielle et de la filtration frontale
Figure 26 : Schématisation du principe de l'étape d'adsorption de particules virales sur des filtres électrochargés (positives sont représentées par un + et les charges négatives par un -)
Figure 27: Schématisation du principe de l'étape d'élution de particules virales adsorbées sur des filtres électrochargés (particule virale ; sens de la filtration ; les charges positives sont représentées par un + et les charges négatives par un -)
de particules virales dans des échantillons d'eau environnement aux {Hamza, 2011 #896}75 Figure 29 : Principe de la PCR digitale (d'après Life technologies)
afin de distinguer les particules virales intègres des particules virales dégradées et des génomes viraux libres
Figure 31 : Evaluation de la variabilité temporelle de la charge virale dans la Seine (prélèvement moyen sur 24h en vert et prélèvements ponctuels en bleu). Cette représentation graphique présente uniquement les 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. La comparaison de la charge virale propre à chaque virus et à chaque échantillon durant les 3 campagnes prélèvement n'a montré augune 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

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux virus entériques humains susceptibles d'être observés dans les eaux
environnementales (ARN : acide ribonucléique ; sb : simple brin)
Tableau 2: Signes cliniques associés aux différents sérotypes des HAdV {Ghebremedhin, 2014
#766}
Tableau 3: Ensemble des espèces susceptibles d'infecter l'Homme appartenant au genre
Enterovirus
Tableau 4: Estimation de la durée d'excrétion et du nombre de particules virales excrétées
en fonction du type de virus entériques
Tableau 5: Fréquences et charges virales des virus entériques observées dans les eaux usées
et les eaux usées traitées en fonction du ou des traitements mis en place dans la STEP
(BAM : bioréacteur à membrane)
Tableau 6: Fréquences de détection et charges virales dans les eaux de rivière
Tableau 7: Doses UV (en mJ/cm ²) nécessaires pour provoquer 1 log ₁₀ (90%) et 4 log ₁₀
(99,99%) d'abattement pour différents types de virus entériques et modèles
Tableau 8: Inactivation des virus entériques et modèles dans l'eau par chloration (le Ct
correspond à la concentration en désinfectant multipliée par le temps de contact)
Tableau 9: Abattements observés suite à un traitement d'ozonation réalisé sur des eaux
contenant différents types de virus entériques et modèles (le Ct correspond à la
concentration en désinfectant multipliée par le temps de contact)
Tableau 10: Inactivation des virus entériques et modèles par un traitement thermique 61
Tableau 11: Cas d'épidémies de gastroentérites d'origine virale répertoriés dans la littérature
scientifique récente (entre 2000 et 2012), d'après les données d'Hamza et al. (2011) et
Sinclair et al. (2009) complétées
Tableau 12: Points isoélectriques déterminés expérimentalement pour certains virus
entériques ou modèles d'après {Michen, 2010 #947}66
Tableau 13: Coefficients de Svedberg et densités dans du chlorure de césium pour plusieurs
types de virus
Tableau 14: Avantages et inconvénients des principaux filtres électronégatifs et
électropositifs (d'après Ikner et al. (2012))72
Tableau 15: Avantages et inconvénients des solutions d'élution les plus fréquemment
utilisées dans le cadre d'un protocole de concentration virale (d'après Ikner et al. (2012)).
Erreur ! Signet non défini.
Tableau 16: Virus entériques humains cultivables et modèles cellulaires disponibles
Tableau 17: Avantages et limites des approches visant à évaluer l'infectivité des particules
virales dans l'eau (d'après Hamza et al. (2011) et complété)82

Introduction générale

La gastroentérite est une inflammation des tissus du tube digestif entrainant divers symptômes tels que le vomissement, la diarrhée et des douleurs abdominales. Chaque année, cette maladie est responsable d'environ 2 milliards de cas à travers le monde et est à l'origine d'environ 2 millions de décès par déshydratation qui ont principalement lieu 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. 2004a), 243 millions d'euros en Australie (Hellard et al. 2003), 135 millions d'euros en Irlande (Rodrigues et al. 2008), 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 dont les principaux agents sont *Salmonella spp., Campylobacter jejuni, Shiggella 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 publiées se focalisent la plupart du temps sur un ou deux groupes viraux tels que les norovirus, les rotavirus ou les adénovirus.

L'importante excrétion de particules virales dans les fèces des individus infectés, jusqu'à 10¹¹ 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. 2011b). 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. La définition de la qualité microbiologique d'une eau de consommation repose actuellement sur le suivi d'indicateurs bactériens ne présentant pas les mêmes caractéristiques que les virus entériques qui sont considérés dans leur ensemble comme plus résistants dans l'environnement mais également face 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). 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 doctorat a donc été d'étudier la dynamique, la diversité et la persistance des virus entériques dans les eaux de surface d'un fleuve en milieu urbain dense, afin d'en identifier les sources principes et la dynamique temporelle. Ce manuscrit de thèse s'articule autour de 3 grandes parties. La première partie est tout d'abord consacrée à un travail bibliographique dont le principal objectif est d'établir un état des lieux sur les connaissances actuelles concernant ce domaine de recherche. Ainsi, cette partie bibliographique débute par un chapitre décrivant les principaux virus entériques responsables de gastroentérites chez l'Homme et donc susceptibles d'être retrouvés dans l'environnement hydrique. Le second chapitre s'intéresse quant à lui à la circulation et à la persistance de ces particules virales au sein des différents compartiments du cycle de l'eau et leur implication dans l'apparition d'épidémies liées à l'ingestion de ces différentes matrices d'eau. Cette partie s'achève par une description des méthodes de concentration et de détection pouvant être mises en œuvre ainsi que des potentiels indicateurs de la contamination d'environnements hydriques par les virus entériques.

La seconde partie est quant à elle dédiée aux résultats et à leurs interprétations. Cette partie est constituée de trois chapitres qui sont chacun présentés sous la forme d'articles scientifiques publiés ou soumis. L'ensemble de ces chapitres ont pour objectif commun d'apporter des éléments de réponses permettant une meilleure compréhension de la dynamique des virus entériques dans l'environnement hydrique urbain francilien. Chaque article est précédé d'un résumé visant à présenter le contexte de l'étude et suivi d'une conclusion reprenant les principaux résultats observés ainsi que les interprétations proposées. Le premier chapitre de cette seconde partie s'intéresse a pour objectif d'estimer les variations spatio-temporelles des densités de différents virus entériques au niveau des effluents de stations d'épuration (STEP) et leur impact sur le milieu récepteur. Cet objectif a nécessité la mise en place d'outils de concentration et de détection des particules virales afin de traiter les échantillons acquis lors d'une campagne de prélèvements d'une année sur la Seine au niveau de l'agglomération parisienne. Dans le deuxième chapitre est présenté un travail visant à évaluer par séquençage haut débit la diversité de virus entériques humains observée au sein des effluents de STEP. Dans ces deux premiers chapitres est également abordé 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. Du fait de l'importante circulation de virus entériques dans le cycle urbain de l'eau mise en évidence dans le chapitre un, l'objectif du troisième chapitre consiste à évaluer la persistance de ces particules virales soumises à différentes contraintes fréquemment rencontrées dans le contexte environnemental ou au sein d'usines de potabilisation.

La troisième et dernière partie de ce manuscrit consiste en une discussion générale sur l'ensemble des résultats observés et une mise en exergue des apports scientifiques liés à ce travail.

Partie I : Etude bibliographique

1 Les principaux virus entériques humains à transmission hydrique

1.1 Généralités

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 et 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 capside 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, qui vont être décrites par la suite, sont répertoriées dans le tableau 1.

1.2 Les Adenoviridae

1.2.1 Généralités

La famille des Adenoviridae est constituée de cinq genres (Harrach et al. 2012), les Mastadenovirus, les Aviadenovirus, les Atadenovirus, les Ichtadenovirus et les Siadenovirus (

Figure 1). Les virus appartenant à cette famille possèdent une capside dont le diamètre est compris entre 70 et 90 nm (Figure 2). Leur génome est un ADN linéaire (acide désoxyribonucléique) double brins (db) faisant entre 26 000 et 49 000 paires de bases (pb) et contenant à leurs extrémités 5' et 3' des séquences terminales répétées inversées (ITR, inverted terminal repetition) dont la longueur varie entre 36 et 371 pb (Davison et al. 2003). Au niveau de chacune des extrémités 5' de leur génome, une protéine terminale TP est liée de manière covalente. Un large spectre d'hôtes tels que les oiseaux, les poissons et les

mammifères sont susceptibles d'être infectés par les virus appartenant à cette famille. Cependant, seuls les virus du genre *Mastadenovirus* ont été identifiés comme infectieux pour l'Homme et capables d'engendrer des troubles gastro-intestinaux. Tableau 1: Principaux virus entériques humains susceptibles d'être observés dans les eaux environnementales (ARN : acide ribonucléique ; sb : simple brin).

Famille	Genre	Espèce	Nombre de génotypes humains	Taille capside (nm)	Taille génome (pb)	Type de génome	Maladie
Adenoviridae	Mastadenovirus	Adénovirus humains	68	70 à 90	30000 à 38000	ADN db	Conjonctivite, gastroentérites, respiratoire, urinaire
Astroviridae	Mamastrovirus	Astrovirus humains	8	28 à 30	6800 à 7900	ARN sb (+)	Gastroentérite
Caliciviridaa	Norovirus	Norovirus humains	GI (9), GII (19) et GIV (1)	27 à 35	7700	ARN sb (+)	Gastroentérite
Cullcivillude	Sapovirus	Sapovirus humains	GI (7), GII (7), GIV (1) et GV (2)	30 à 38	7700	ARN sb (+)	Gastroentérite
Hepeviridae	Orthohepevirus	Virus de l'hépatite E	> 4	26 à 34	7200	ARN sb (+)	Hépatite
	Cosavirus	Cosavirus	34	30	7600	ARN sb (+)	Gastroentérite suspectée
		EV-A	25				Paralysie flasque,
		EV-B	63				méningite, myocardite,
	Enterovirus (EV)	EV-C	23	22 à 30	7100 à 8900	ARN sb (+)	respiratoire,
Dicorpouiridao							conjonctivite,
PICOITIUVITIUUE		L A-D	5				gastroentérite
	Hepatovirus	Virus de l'hépatite A	3	27	7500	ARN sb (+)	Hépatite
	Kobuwirus		2	20	7000 à 8200	APN ch (+)	Gastroentérite
	KODUVIIUS	VILUS AICHI	3	50	7000 a 8200		suspectée
	Salivirus	Salivirus	1	30	8000	ABN ch (+)	Gastroentérite
	Sulivirus	Salivirus	1		8000		suspectée
Reoviridae	Rotavirus	Rotavirus	56 types G et 37 types P	60 à 80	18500	ARN db	Gastroentérite



Figure 1: Arbre phylogénétique représentant les 5 genres composant actuellement la famille des *Adenoviridae* dont l'analyse repose sur la séquence de l'hexon. Une couleur a été attribuée à chaque genre ainsi qu'aux espèces qui lui sont associées. Les virus appartenant à la même espèce sont placés dans un ovale vert et l'espèce à la droite de cet ovale. Les abréviations des noms de virus à l'extrémité de chaque branche sont B : bovin, C : canin, D : canard, E : équin, F : volaille, Fr : grenouille, H : humain, M : murin, O : ovin, P : porcin, Po : opossum, Sn : serpent, T : dinde, S : primate, TS : scandentien (Davison et al. 2003).

1.2.2 Les Mastadenovirus

1.2.2.1 Structure et classification

Les adénovirus humains (HAdV) appartiennent au genre *Mastadenovirus*. La taille de leur génome est comprise entre 30000 et 38000 pb (Figure 3). Leur génome est subdivisé en 6 unités de transcription précoces (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 et E4), 3 séquences intermédiaires (IVa2, IX, VA) et 5 séquences tardives (L1 à L5). Les phases précoces et intermédiaires concernent la réplication du génome viral tandis que la phase tardive intervient dans la production de protéines structurales et dans l'assemblage final de la particule virale. Le sérotypage des HAdV permet leur classement en 7 espèces, HAdV-A à HAdV-G (Huang and Xu 2013, Law and Davidson 2002). Actuellement 56 sérotypes ont été identifiés tandis que 68 génotypes peuvent être classés sur la base de la séquence nucléotidique L4 codant l'hexon (Ghebremedhin 2014). Lukashev et al. (2008) ont mis en évidence l'existence d'événements de recombinaison de souches appartenant à la même espèce tandis qu'à l'heure actuelle aucune étude n'a pu observer ce type d'événement entre des souches appartenant à des espèces différentes.



Figure 2: Observation par microscopie électronique d'un adénovirus de type 41 (les flèches indiquent les fibres composant la capside virale (El Bakkouri et al. 2008)



Figure 3: Schématisation de la structure génomique d'HAdV avec les différentes régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange.) indiquent le sens de transcription.

1.2.2.2 Epidémiologie clinique

Les HAdV ont été isolés pour la première fois en 1953 dans un prélèvement de tissu adénoïde, à l'origine de leur nom. Le type d'infection engendrée par les HAdV est dépendant du sérotype impliqué (Tableau 1). La majeure partie des HAdV (espèces B, C, D et E) sont responsables d'infections respiratoires bénignes susceptibles de provoquer l'apparition de divers symptômes tels que de la fièvre, des congestions nasales mais également des irritations au niveau de la gorge. Les HAdV B, C et E sont considérés comme responsable de 5 à 10% des apparitions de maux respiratoires et de conjonctivites chez l'enfant de moins de 5 ans (Wold and Horwitz 2007). La période d'incubation pour les HAdV 40 et 41, principaux responsables de gastroentérites parmi l'ensemble des HAdV, dure en moyenne de 3 à 8 jours et est susceptible d'engendrer des symptômes tels que des épisodes diarrhéiques bien souvent accompagnés de fièvre et parfois de vomissements durant une période variant entre 5 et 15 jours avec une excrétion fécale de l'ordre de 10⁶ particules virales/g (Nicand et al. 1998). Leur infection sont généralement asymptomatiques chez l'adulte (Kaneko et al. 2008). Pour le moment aucune étude ne fournit de données concernant la dose infectieuse minimale des HAdV.

La séroprévalence de la population mondiale est estimée aux alentours de 90% pour au moins l'un des sérotypes d'HAdV (Fong et al. 2010). De nombreuses études renseignent les HAdV 40 et HAdV 41 comme les principaux vecteurs de gastroentérites chez les enfants de moins de 5 ans, derrière les rotavirus et les norovirus (Banyai et al. 2009, Haramoto et al. 2007, Haramoto et al. 2010, Rodriguez-Lazaro et al. 2012, Sdiri-Loulizi et al. 2009). Les HAdV 31 et HAdV 38 sont dans une moindre mesure également impliqués dans l'apparition d'épidémies de gastroentérites (Hammond et al. 1987). À titre d'exemples, les HAdV sont estimés comme responsables de 8% des cas de gastroentérites, tout agents confondus en Iran (Motamedifar et al. 2013, Rezaei et al. 2012), de 6% en Chine (Ren et al. 2013) et entre 7 et 9% au Japon (Dey et al. 2013). Les épidémies de gastroentérites à HAdV ont lieu tout au long de l'année avec un pic qui est généralement atteint en hiver et au printemps (Dey et al. 2013, Silva et al. 2011).

1.2.2.3 Méthodes de détection

Certains modèles cellulaires permettent leur mise en culture tels que les cellules A549, les cellules 293A, les cellules CaCo-2, les cellules Hep 2, les cellules Graham 293, les cellules PLC/PRF/5 ou encore les cellules HEK 293 (Graham 1987, Lee et al. 2004, Pinto et al. 1994). L'efficacité de culture sur modèle cellulaire est très variable en fonction du type d'HAdV. En effet, les HAdV 40 et 41 sont par exemple difficiles à mettre en culture et ne produisent que des effets cytopathogènes (ECP) difficiles à identifier. La détection directe d'antigènes par des techniques d'immunofluorescence, immuno-enzymatiques ou encore d'agglutination peuvent être utilisées pour le diagnostic clinique (Wood et al. 1997). Cependant, le manque de sensibilité de ces techniques rendent difficile leur utilisation dans l'environnement. C'est pourquoi, la plupart du temps, ce sont des techniques de biologie moléculaire, généralement basées sur la détection d'une région conservée au niveau de la séquence codant l'hexon, sont utilisées (Heim et al. 2003).

Espèces	Sérotypes	Types d'infection
А	12, 18, 31	Gastro-intestinale, respiratoire, urinaire
В	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 56	Conjonctivite, gastro-intestinale, respiratoire, urinaire
С	1, 2, 5, 6	Gastro-intestinale, urinaire
D	8 à 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 à 30, 32, 33, 36 à 39, 42 à 49, 51, 53, 54	Conjonctivite, gastro-intestinale
E	4	Conjonctivite, respiratoire
F	40, 41	Gastro-intestinale
G	52	Gastro-intestinale

Tableau 2: Signes cliniques associés aux différents sérotypes des HAdV (Ghebremedhin2014).

1.3 Les Astroviridae

1.3.1 Généralités

La famille des Astroviridae est actuellement composée de deux genres (Guix et al. 2013), les Mamastrovirus qui infectent les mammifères et les Avastrovirus qui infectent uniquement les oiseaux (Figure 4). Les virus appartenant à cette famille possèdent une capside d'environ 35 nm de diamètre. Leur observation en microscopie électronique a permis la mise en évidence d'un motif étoilé, caractéristique du centre de leur capside, qui est à l'origine de leur nom. Cette capside contient un génome à ARN de polarité positive simple brin et dont la taille est comprise entre 6100 et 7900 nucléotides (Lukashov and Goudsmit 2002). Une protéine VPg est associée à l'extrémité 5' de leur génome tandis que l'extrémité 3' se termine par une queue poly-A (Fuentes et al. 2012). Leur génome comporte des régions non traduites (NTR) au niveau de son extrémité 5' et de son extrémité 3' et il est composé de trois cadres ouverts de lecture (open reading frame, ORF), l'ORF1a, l'ORF1b et l'ORF2. L'ORF1a et l'ORF1b codent les protéines non structurales (nsP1a et nsP1b) qui sont impliquées dans la transcription et la réplication de l'ARN viral, telles que l'ARN polymérase ARN-dépendante (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), et l'ORF2 code les protéines structurales (VP90). La taille de ces ORFs peut être très variable d'une souche à une autre. L'ORF1a est celui qui présente la plus grande variabilité de taille du fait de nombreuses insertions et délétions au niveau de son extrémité 3' (Guix et al. 2005b). La taille de l'ORF1b est quant à elle relativement stable. Les virus appartenant au genre *Mamastrovirus* possèdent un autre ORF, appelé ORFX, dont la traduction n'a pas encore été mis en évidence expérimentalement. Par la suite, seuls les astrovirus humains (HAstV) appartenant donc au genre *Mamastrovirus* sont décrits.



Figure 4: Arbre phylogénétique représentant les 2 genres composant actuellement la famille des *Astroviridae* dont l'analyse repose sur la séquence de l'ORF2 (Jeong et al. 2012).

1.3.2 Les Mamastrovirus

1.3.2.1 Structure et classification

Les virus appartenant au genre *Mamastrovirus* sont capables d'infecter les mammifères et par conséquent l'Homme chez qui ils ont été identifiés pour la première fois en 1975 dans des selles par microscopie électronique (Appleton and Higgins 1975, Madeley and Cosgrove 1975). Leur capside mesure entre 28 et 30 nm de diamètre (Figure 5) et contient un génome à ARN d'une taille comprise entre 6800 et 7900 nucléotides (Figure 6). À l'heure actuelle, 8 sérotypes humains (HAstV-1 à HAstV-8) ont été déterminés (Herrmann et al. 1988, Mendez-Toss et al. 2000). Les HAstV sont également classés en fonction de leurs génotypes qui présentent une bonne corrélation avec les sérotypes préalablement identifiés (Guix et al. 2005a, Naficy et al. 2000, Noel et al. 1995). Le génotypage des HAstV est généralement réalisé sur l'ORF2 au niveau de l'extrémité 3' (Jonassen et al. 1995, Mitchell et al. 1995, Saito et al. 1995, Walter et al. 2001) ou de l'extrémité 5' (Noel et al. 1995), plus rarement sur l'ORF1a (Belliot et al. 1997) ou l'ORF1b (Atkins et al. 2009, Belliot et al. 1997, Chu et al. 2008). Quelques études répertorient des génotypes émergents capables d'infecter l'Homme et qui sont actuellement classés sous l'appellation AstV-MLB et AstV-VA1 (Finkbeiner et al. 2008, Kapoor

et al. 2009). Babkin et al. (2012) ont estimé, à travers l'ensemble des séquences disponibles sur la banque de données GenBank, que le génome des HAstV évoluait avec un taux de dérive génétique de 3,7 x 10⁻³ nucléotide substitué par site et par année. Ce fort taux d'évolution créé une certaine hétérogénéité au sein de leur génome qui permet un lignage intragénotypique sur la base de l'intégralité de la séquence de l'ORF2 (Medici et al. 2015). Ainsi, l'HAstV-1 peut être classé en 4 lignages (HAstV-1a à HAstV-1d), l'HAstV-2 également en 4 lignages (HAstV-2a à HAstV-2d), l'HAstV-3 en 2 lignages (HAstV-3a et HAstV-3b) et l'AstV-4 en 3 lignages (HAstV-4a à HAstV-4c). Martella et al. (2014) ont mis en évidence l'existence de recombinaisons intragénotypiques au niveau de l'ORF2. De plus, des études ont révélé la possibilité de recombinaisons au niveau de la jonction entre l'ORF1b et l'ORF2 (Martella et al. 2013, S et al. 2013, Wolfaardt et al. 2011).



Figure 5: Astrovirus humains observés par microscopie électronique (Caul and Appleton 1982).



Figure 6: Schématisation de la structure génomique d'HAstV avec les différentes régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange (nsP1a avec Hel : hélicase, Pro : protéase et VPg et nsP1b avec RdRp).

1.3.2.2 Epidémiologie clinique

Les symptômes engendrés par les HAstV sont ceux communément observés lors d'une gastroentérite. Néanmoins, l'apparition de vomissements est beaucoup plus rare que pour les infections à norovirus ou à rotavirus (Dennehy et al. 2001). La sévérité globale des symptômes est moindre par rapport à celle des rotavirus et entraine donc moins d'hospitalisations. Lee et al. (2013) ont évalué la durée moyenne d'incubation à environ 4 jours et que plus de 75% des

cas engendrent une gastroentérite apparaissant au bout de 5 jours. Leur excrétion dure environ 12 jours et est de l'ordre de 10⁶ particules virales/g de fèces (Nicand et al. 1998). Quelques études sur des volontaires sains adultes ont mis en évidence une relativement faible pathogénicité (Kurtz et al. 1979, Mitchell et al. 1993) qui pourrait être expliquée par l'acquisition d'une immunité persistante généralement acquise durant l'enfance (Kurtz and Lee 1978, Mitchell et al. 1999). Les HAstV constituent une cause majeure de gastro-entérites aiguës chez les sujets sensibles tels que les personnes âgées, les jeunes enfants et les immunodéprimés mais également chez les adultes. Ils sont répertoriés comme la seconde cause de gastroentérites d'origine virale chez les enfants en Amérique du Nord, en Amérique Latine et en Asie du sud-est (El-Mohammady et al. 2012, Guo et al. 2010, Nguyen et al. 2008, Pativada et al. 2012). Leur implication dans l'apparition de cas sporadiques varie entre 4 et 25% à travers le monde. L'HAstV-1 est généralement le génotype le plus identifié en clinique à travers le monde tandis que le second génotype majoritaire varie d'une région géographique à une autre (Bosch et al. 2014, Jeong et al. 2011). Les HAstV-6 et HAstV-7 sont quant à eux très rarement détectés. La période épidémique des HAstV se déroule durant la période hivernale dans les pays au climat tempéré tandis que dans les pays tropicaux cette période a généralement lieu durant la saison des pluies (Mustafa et al. 2001).

1.3.2.3 Méthode de détection

La détection des HAstV repose essentiellement sur la recherche d'antigènes viraux par des techniques immuno-enzymatiques ou sur la recherche de leur génome par des techniques de biologie moléculaire généralement basées sur la séquence nucléotidique de l'ORF1 (Grimm et al. 2004). Il est également possible de les mettre en culture sur des cellules Caco-2 (Willcocks et al. 1990) ou sur des cellules HEK afin de détecter par la suite certains antigènes par des techniques d'immunofluorescence (Kurtz and Lee 1978).

1.4 Les Caliciviridae

1.4.1 Généralités

Actuellement, la famille des *Caliciviridae* est composée de 5 genres (Figure 7) : *Lagovirus, Nebovirus, Norovirus, Sapovirus* et *Vesivirus* (Clarke et al. 2012) et 6 nouveaux genres (*Bavovirus, Nacovirus, Recovirus, Valovirus, Salovirus* et *Secalivirus*) ont été récemment proposés pour rejoindre cette famille (Farkas et al. 2008, L'Homme et al. 2009, Mikalsen et al. 2014, Ng et al. 2012, Wolf et al. 2012, Wolf et al. 2011). Le nom de cette famille provient d'observations en microscopie électronique ayant mis en évidence des motifs en forme de calice (ou d'étoile). Ils sont constitués d'un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7600 nucléotides contenu dans une capside dont le diamètre est compris entre 27 et 40 nm. L'extrémité 5' de leur génome est liée de manière covalente à une protéine VPg et une queue poly-A se trouve au niveau de l'extrémité 3' (Daughenbaugh et al. 2003).

Les virus appartenant à cette famille sont susceptibles d'infecter un large spectre d'hôtes tels que les oiseaux, les poissons et les mammifères. Cependant, seuls les genres *Norovirus* (NoV) et *Sapovirus* (SapoV) ont été identifiés comme infectieux pour l'Homme et susceptibles d'engendrer des troubles gastro-intestinaux.



Figure 7: Arbre phylogénétique des 5 genres composant actuellement la famille des Caliciviridae dont l'analyse repose sur la région codant la protéine RdRp (Simmonds et al. 2008).

1.4.2 Les Norovirus

1.4.2.1 Structure et classification

Les NoV possèdent une capside d'environ 27 nm de diamètre (Figure 8) contenant un génome d'environ 7700 nucléotides qui est organisé en 3 ORFs (Figure 9). L'ORF1 code une polyprotéine, dotée d'une activité autocatalytique, qui va être clivée par une protéase d'origine virale en 6 protéines non structurales dont l'une d'entre elles est la polymérase virale, RdRp. L'ORF2 et l'ORF3 codent respectivement la protéine structurale majeure VP1 (viral protein) et la protéine structurale mineure VP2 (Kroneman et al. 2013). L'absence de modèle cellulaire explique leur classification basée sur des critères exclusivement génétiques

(Duizer et al. 2004). Ainsi, le genre Norovirus est classé en 5 génogroupes dont seuls les génogroupes GI, GII et GIV sont capables d'infecter les êtres humains (Zheng et al. 2006). À l'heure actuelle, les NoV GI, NoV GII et NoV GIV sont respectivement composés de 9 génotypes, 22 génotypes (dont les NoV GII.11, NoV GII.18 et NoV GII.19 ont été uniquement retrouvés chez le porc) et seulement 1 génotype. Ces génogroupes ont été définis sur la base de la séquence codant la protéine VP1 et un nouveau génotype est considéré à partir du moment où il présente une divergence de séquence d'acides aminés d'au moins 20% comparé aux autres génotypes (Vinje et al. 2000). Une classification précise est essentielle dans le cas des NoV GII et plus particulièrement du NoV GII.4 qui présente énormément de variants à l'origine de pandémies (Chen et al. 2015, Lindesmith et al. 2008, Siebenga et al. 2007, van Beek et al. 2013, Zheng et al. 2010). En effet, il a été constaté qu'un nouveau variant fait son apparition tous les 2-3 ans, augmentant ainsi le nombre d'infections liées à NoV au sein de la population humaine (Fonager et al. 2013, Hasing et al. 2013, Lopman et al. 2004b) (Figure 10). Les variants de NoV GII.4 diffèrent d'environ 5% au niveau de la séquence protéique de VP1 (Bok et al. 2009, Zheng et al. 2010). Des événements de recombinaisons intra- et intergénotypiques ont été identifiés au niveau de la jonction entre l'ORF1 et l'ORF2 (Lu et al. 2015, Mans et al. 2014, Medici et al. 2014, Sang et al. 2014, White 2014).



Figure 8: Norovirus humains observés par microscopie électronique (F.P. Williams, U.S. EPA).

Figure 9: Schématisation de la structure génomique de NoV avec les différentes régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange.

VPg N-term	p22/p23/p26	NTPase	P30/p29	VPg	Protéase	RdRp	VP1	VP2

1.4.2.2 Epidémiologie clinique

En 1968, les NoV ont été identifiés et isolés pour la première fois suite à une épidémie de gastroentérites dans une école de la ville de Norwalk (Ohio, Etats-Unis), à l'origine de leur nom (anciennement Norwalk-like virus). Les infections à NoV sont généralement de courte durée (de l'ordre de quelques jours) mais elles peuvent devenir plus sévères voire mortelles chez les populations à risques (enfants de moins de 5 ans, personnes âgées et personnes immunodéprimées) (Bok and Green 2012, Koo and DuPont 2009). Plus rarement, les NoV sont associés à l'apparition de symptômes autres que ceux liés aux gastroentérites telles qu'une encéphalopathie, des convulsions ou encore l'apparition de nécrose intestinale (Chan et al. 2011, Chen et al. 2009, Ito et al. 2006, Obinata et al. 2010, Stuart et al. 2010). Leur excrétion a été étudiée au travers de la réalisation de challenges sur des volontaires humains qui ont mis en évidence une excrétion de particules virales seulement 8h après l'inoculation de NoV GI.1 et un pic d'excrétion observé généralement après la disparition des symptômes (Atmar et al. 2008). Cette excrétion dure entre 20 et 30 jours chez des sujets adultes sains mais varie très fortement en fonction de l'âge et de l'état de santé des individus (Lai et al. 2013, Murata et al. 2007, Phillips et al. 2009). (Atmar et al. 2014). Leur dose infectieuse est estimée à une moyenne de 1320 équivalents génomes (Atmar et al. 2014). Leur concentration peut atteindre les 10¹⁰ unités génomes/g de fécès et 41000 unités génomes/mL de vomissure. Des études relativement récentes ont mis en évidence l'importance de l'expression des antigènes tissulaires sanguins (HBGA) chez l'individu qui influence significativement la capacité de fixation des NoV au niveau des cellules épithéliales du système intestinal. Ainsi, des individus à phénotype non sécréteurs, c'est-à-dire n'exprimant pas ces antigènes HBGA, présentent une résistance à l'infection par NoV (Bucardo et al. 2009, Currier et al. 2015, Dai et al. 2015, Thorven et al. 2005). Les NoV sont considérés comme la principale cause de gastroentérites d'origine non bactérienne et sont estimés comme étant à l'origine de la moitié des gastroentérites tout âge confondu (Iturriza Gomara et al. 2008, Kroneman et al. 2013, Matthews et al. 2012, Patel et al. 2009, Phillips et al. 2009, Svraka et al. 2007, Trivedi et al. 2012). La majorité des épidémies liées à NoV surviennent à la suite d'une transmission de personne à personne. Ainsi de nombreuses épidémies ont été répertoriées au sein de structures telles que les hôpitaux, les maisons de retraites mais également durant des croisières où les NoV ont la possibilité de se transmettre très facilement de par la concentration de personnes en ces lieux, le type de populations (plutôt à risques), mais également leur importante résistance aux procédures standards de nettoyage (Friesema et al. 2009, Greig and Lee 2009, Kroneman et al. 2008). Les NoV sont aussi connus pour être à l'origine d'infections liées à la consommation d'aliments ou d'eau contaminés puisque des études européennes et américaines estiment leur implication dans environ 10% des cas (Verhoef et al. 2015). Une étude japonaise a même évalué ce type de transmission comme étant impliqué dans près de 35% des infections à NoV (Mathijs et al. 2012). Les pics d'infections à NoV sont généralement observés durant la période hivernale (Ahmed et al. 2013).



Figure 10: Evolution des épidémies à NoV GII.4 en France entre 2000 et 2010 mettant en évidence l'émergence et la prédominance de nouveaux variants (de Rougemont 2012).

1.4.2.3 Méthodes de détection

Jusqu'à dans les années 1980, la détection des NoV se faisait essentiellement par microscopie électronique (Parrino et al. 1977). Puis, dans les années 1990, la biologie moléculaire est devenue la méthode de référence. Leur détection et quantification par RTqPCR (reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction) est essentiellement réalisée au niveau de la jonction de l'ORF1 et de l'ORF2 qui est une région extrêmement bien conservée chez les NoV. Actuellement, mis à part quelques travaux qui nécessiteraient confirmation (Straub et al. 2011, Straub et al. 2007), aucun modèle de culture cellulaire ne permet la multiplication des NoV humains. Seul le norovirus murin 1 (MNV-1) peut être cultivé sur cellules ce qui explique son utilisation en tant qu'indicateur de persistance des NoV humains (Park et al. 2015). Cependant, il est possible de produire des pseudo-particules virales (virus like particles, VLP), en exprimant la protéine VP1 qui possède la caractéristique de s'auto-assembler en une particule possédant des propriétés antigéniques et morphologiques identiques aux NoV (Tome-Amat et al. 2014).

1.4.3 Les Sapovirus

1.4.3.1 Structure et classification

Les virus appartenant au genre Sapovirus sont des virus constitués d'une capside dont le diamètre est compris entre 30 et 38 nm (Figure 11) au sein de laquelle se trouve le génome viral dont la taille est comprise entre 7100 et 7700 nucléotides (Figure 12). Ce génome est constitué de 2 ORFs (Chang et al. 2005). L'ORF1 code une grande polyprotéine à l'origine de 7 protéines non structurales (NS1 à NS7) et de la protéine VP1 qui est le constituant majeur de leur capside, après l'action d'une protéase virale (Oka et al. 2011, Oka et al. 2009b, Yokoyama et al. 2012). L'expression de la protéine VP1 dans des cellules de mammifères permet l'assemblage spontané de VLP (Hansman et al. 2005, Hansman et al. 2008, Oka et al. 2009a) qui possèdent des propriétés antigéniques et morphologiques identiques au sapovirus retrouvés dans des selles (Jiang et al. 1999). L'ORF2 quant à lui code la protéine mineure de la capside virale, VP2. Certaines études ont mis en évidence l'existence d'un 3^{ème} ORF dont la fonction reste pour le moment inconnue (Farkas et al. 2004, Numata et al. 1997, Okada et al. 2006a). La région codant la protéine VP1 présente une hypervariabilité génétique à partir de laquelle ont été différenciés 5 génogroupes (Oka et al. 2012). Scheuer et al. (2013) proposent l'ajout de 9 génogroupes supplémentaires. À l'heure actuelle, les 4 génogroupes GI, GII, GIV et GV ont déjà été identifiés comme étant liés à des infections chez l'Homme. Ce constat souligne le rôle important de la protéine VP1 dans les propriétés antigéniques des sapovirus. Les sapovirus GI et GII sont constitués chacun par 7 génotypes différents, 1 seul génotype compose le GIV et 2 génotypes le GV, selon l'analyse de la séquence nucléotidique complète codant la protéine VP1 (Oka et al. 2012). L'analyse de la diversité des sapovirus au sein de la population mondiale est fréquemment réalisée afin d'identifier les souches émergentes et de mieux comprendre les phénomènes de variations génétiques intragénogroupes et même intragénotypes (Harada et al. 2012, Harada et al. 2013, Svraka et al. 2010). Contrairement aux NoV dont le génotype prédominant est le NoV GII.4, au sein des sapovirus, les souches prédominantes varient au cours du temps et sont issues de génogroupes et de génotypes différents. Ainsi en 2007, le génotype GIV.1 est identifié comme étant prédominant à travers le monde (Harada et al. 2012, Harada et al. 2013, Svraka et al. 2010). Au même titre que pour le NoV GII.4 (Lindesmith et al. 2012), des changements génétiques au niveau de la région codante de la protéine VP1 ont été observés chez les souches de sapovirus GI.2 (Svraka et al. 2010). De plus, des événements de recombinaisons inter- et intra-génogroupes ont pu être mis en évidence. Ces événements de recombinaisons sont liés à des échanges au niveau de l'ORF1, au niveau de la région codant les protéines non structurales et de la région codant la protéine VP1. L'ensemble des souches résultant de recombinaisons intergénogroupes ont été identifiées par une région codant la protéine VP1 propre au GIV et une région codant la protéine RdRp propre au GII (Chanit et al. 2009, Mikula et al. 2010). Concernant les recombinaisons intragénogroupes, des sapovirus recombinants ont pu être identifiés au sein

des GI (Chanit et al. 2009, Dey et al. 2011), GII (Hansman et al. 2006b, Katayama et al. 2004) et GIII (Wang et al. 2005).







Figure 12: Schématisation de la structure génomique de sapovirus avec les différentes régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange.

1.4.3.2 Epidémiologie clinique

Les symptômes faisant suite à une infection par des sapovirus sont ceux de la gastroentérite (vomissements et diarrhées) mais également des symptômes associés tels des nausées, des crampes abdominales et des maux de tête. (Johansson et al. 2005, Lee et al. 2012, Mikula et al. 2010). La sévérité des symptômes varient énormément d'une personne à une autre, la mortalité est cependant très rare (Monica et al. 2007, Park et al. 2012, Zintz et al. 2005). Les symptômes durent généralement moins d'une semaine même s'ils ont parfois pu être observés jusqu'à 20 jours (Sakai et al. 2001, Wu et al. 2008). Les données épidémiologiques indiquent que la période d'incubation peut être inférieure à 1 jour et aller jusqu' à 4 jours (lizuka et al. 2010, Kobayashi et al. 2012, Lee et al. 2013). Leur dose infectieuse a été estimée comme équivalente à celle des NoV c'est à dire entre 1000 et 3000 unités génome (Atmar et al. 2014). Bien que de nombreuses infections à sapovirus soient asymptomatiques (Bucardo et al. 2012, Chhabra et al. 2013, de Wit et al. 2001), elles induisent tout de même une excrétion virale similaire aux personnes présentant des symptômes de gastroentérites (Kobayashi et al. 2012, Yoshida et al. 2009). L'excrétion de sapovirus dans les

selles est susceptible de persister jusqu'à 4 semaines après la disparition des symptômes (Iwakiri et al. 2009, Rockx et al. 2002). Les selles peuvent contenir jusqu'à 10¹¹ unités génomes/g (Iwakiri et al. 2009, Miyoshi et al. 2010, Yamashita et al. 2010, Yoshida et al. 2009) et leur charge virale ne cessera de diminuer après le début de l'infection (Iwakiri et al. 2009). Plusieurs semaines après l'infection, lorsque l'excrétion virale persiste, des événements de substitutions ont pu être identifiés au niveau de la région codant la protéine VP1 ce qui pourrait être à l'origine de l'apparition de nouveaux variants (Iwakiri et al. 2009). Plusieurs études menées à travers le monde classent les sapovirus comme responsables de 2 à 13% des cas sporadiques de gastroentérite (Amar et al. 2007, Chan-it et al. 2010, Chhabra et al. 2013, Iturriza-Gomara et al. 2009, Tam et al. 2012). Contrairement aux NoV, aucune relation n'a été mise en évidence entre les types d'antigènes tissulaires sanguins et les infections à sapovirus (Shirato-Horikoshi et al. 2007). La période hivernale est le moment de l'année où globalement le plus grand nombre d'infections liées aux sapovirus sont observées (Dey et al. 2012, Harada et al. 2013, Phan et al. 2004).

1.4.3.3 Méthodes de détection

Plusieurs moyens de détection ont été mis en place dont la microscopie électronique qui a permis d'identifier la morphologie bien spécifique des sapovirus, une configuration en étoile (ou calice) (Roingeard 2008). Leur détection peut également se faire à l'aide de tests immuno-enzymatiques (Hansman et al. 2006a, Nakata et al. 1988, Nakata et al. 1998) mais la diversité antigénique des sapovirus est telle que leur utilisation n'est pas réellement appropriée et ces tests présentent de faibles sensibilités comparées à celles obtenues par des outils de biologie moléculaire (Hansman et al. 2007, Jiang et al. 1997). Comme pour l'ensemble des virus entériques, la détection par biologie moléculaire est la plus utilisée. Les régions généralement utilisées pour leur détection et leur quantification sont au niveau de la séquence codant la protéine RdRp (Monica et al. 2007, Rachakonda et al. 2008), de la séquence codant la protéine VP1 (Liu et al. 2012, Monica et al. 2007, Okada et al. 2002) ou de leur jonction (Khamrin et al. 2011, van Maarseveen et al. 2010). La détection par RT-qPCR cible le plus souvent la région codant la protéine VP1 car elle permet ensuite la réalisation d'un génotypage directement à partir des amplicons obtenus (Harada et al. 2012, Harada et al. 2013). Actuellement, il existe très peu de couples d'amorces permettant d'aller rechercher l'ensemble des génogroupes (Kitajima et al. 2010, Okada et al. 2006b, Sano et al. 2011). À l'heure actuelle, aucune lignée cellulaire de culture n'a permis leur multiplication bien que deux études mettent en évidence leur capacité à se multiplier au sein de cellules BGMK (Kjeldsberg 1977) et de cellules rénales d'embryon humain (Cubitt and Barrett 1984). Par la suite, aucune autre n'étude n'a montré de résultats comparables.

1.5 Les Hepeviridae

1.5.1 Généralités

La famille des *Hepeviridae* est actuellement composée de quatre genres qui sont *Avihepevirus* regroupant les souches aviaires, *Orthohepevirus* regroupant la majeure partie des souches de mammifères, *Chiropteranhepevirus* regroupant les souches de chauve-souris et *Piscihepevirus* contenant la souche de la truite (Johne et al. 2014). À l'heure actuelle, seules les souches appartenant au genre *Orthohepevirus* sont considérées comme capables d'infecter l'Homme.

1.5.2 Les Orthohepevirus

1.5.2.1 Structure et classification

Le virus de l'hépatite E (VHE) possède une capside entre 26 et 34 nm de diamètre (Figure 13) et d'un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7200 nucléotides (Figure 14). Ce génome est bordé par une coiffe méthyl-guanine au niveau de son extrémité 5' et par une queue poly-A au niveau de son extrémité 3'. Trois ORFs composent ce génome qui est flanqué par une région 5'-NTR et 3'-NTR (Chandra et al. 2008), l'ORF1 qui code une polyprotéine non structurale principalement formée par une méthyltransférase, une RdRp, une hélicase, une cystéine protéase ainsi qu'un macrodomaine. L'ORF2 code la protéine de capside qui comporte 3 domaines, S, M et P. L'ORF3 code quant à lui une protéine jouant un rôle dans la libération des virions par la cellule infectée. L'analyse de la séquence protéigue codée par l'ORF1/ORF2 a permis l'établissement de deux groupes au sein du genre Orthohepevirus tandis qu'un seul sérotype n'a pour le moment été identifié (Smith et al. 2013). Le premier groupe est composé par les quatre génotypes traditionnels, que sont VHE1, VHE2, VHE3 et VHE4, ainsi que par de nouveaux génotypes capables d'infecter l'Homme, le lapin, le porc et le sanglier. Pour chacun de ces quatre génotypes, plusieurs sous-types ont pu être mis en évidence. Ainsi, VHE1 est réparti en 5 sous-types (1a à 1e), VHE2 en deux soustypes (2a et 2b), VHE3 en dix sous-types (3a à 3j), VHE4 en sept sous-types (4a à 4g) (Lu et al. 2006). Le deuxième groupe quant à lui comporte uniquement des virus capables d'infecter le furet et le rat.



Figure 13: Virus de l'hépatite E humains observés par microscopie électronique (Xing et al. 2010).



Figure 14: Schématisation de la structure génomique de VHE (valable pour les génotypes VHE1, VHE2, VHE3 et VHE4) avec les différentes régions codant la protéine structurale colorée en vert et les protéines non structurales en orange. (MT : méthyltransférase, Y : macrodomaine, Pro : cystéine protéase, PPR : région riche en proline, X : macro domaine, Hel : hélicase, Pol : RdRp, CP : protéine de capside).

1.5.2.2 Epidémiologie clinique

La période d'incubation de VHE est relativement longue puisqu'elle dure de 2 à 10 semaines. Aucune étude n'a pour le moment déterminé la dose infectieuse de VHE. Au vu du nombre d'individus présentant des anticorps IgM anti-VHE déclarant ne pas avoir présenté d'atteintes hépatiques, il y a de fortes chances pour que plus de 50% des infections soient asymptomatiques (Aggarwal 2013). Les cas symptomatiques présentent généralement des symptômes similaires à l'ensemble des hépatites d'origine virale. Le VHE est reconnu comme un vecteur de maladie potentiellement zoonotique et qui est principalement transmis par la voie oro-fécale. Dans les pays en voie de développement, l'ingestion d'eau contaminée est considérée comme la principale cause des épidémies de VHE tandis que dans les pays industrialisés, la transmission zoonotique de VHE par l'intermédiaire de la consommation de viandes contaminées est proposée comme étant le principal vecteur de contamination à VHE (Said et al. 2009, Tei et al. 2004). La transmission de personne à personne est considérée comme peu fréquente aussi bien dans les cas épidémiques que sporadiques (Aggarwal and Naik 1994, Somani et al. 2003). Les génotypes VHE1 et VHE2 sont exclusivement infectieux pour l'Homme et sont endémiques dans les pays en voie de développement. Les autres génotypes humains peuvent quant à eux être à l'origine de zoonoses. Alors que le VHE3 est
détecté dans le monde entier, VHE4 est essentiellement identifié dans les pays d'Asie (Figure 15). Les épidémies de grandes ampleurs à VHE ont été exclusivement observées au sein des régions endémiques, l'Asie, l'Amérique centrale et l'Afrique, tandis que l'apparition de cas sporadiques est susceptible d'être observée à la fois dans les zones endémiques et nonendémiques (Figure 15). Une étude menée au Royaume-Uni a indiqué que le VHE est plus fréquemment à l'origine de complications chez les patients que le VHA (Dalton et al. 2008). Il a été constaté que la période épidémique de VHE se situait généralement durant le printemps et l'été (Dalton et al. 2008).



Figure 15: Cartographie de la distribution des génotypes de VHE identifiés chez les animaux et les humains. Les couleurs sont utilisées pour les pays et les cercles pour mettre en évidence le génotype majoritaire du pays. $\stackrel{\wedge}{\succ}$ indiquent les zones fortement endémiques (Aggarwal and Jameel 2011).

1.5.2.3 Méthodes de détection

Les diagnostics humains sont généralement basés sur la détection des anticorps IgM anti-VHE associée ou non à une détection de leur génome viral par biologie moléculaire, généralement au niveau de la jonction entre l'ORF2 et l'ORF3 (Martin-Latil et al. 2014). Cependant, leur recherche dans l'environnement est exclusivement réalisée par des techniques de biologie moléculaire. Certaines souches de VHE3 et VHE4 peuvent être cultivées sur des cellules A549 ou encore des cellules PLC/PRF/5 (Okamoto 2011).

1.6 Les Picornaviridae

1.6.1 Généralités

Les virus appartenant à la famille des Picornaviridae sont des particules virales composées d'un génome à ARN simple brin de polarité positive dont la taille oscille entre 7100 et 8900 nucléotides (Figure 17). Leur génome est contenu au sein d'une capside d'un diamètre compris entre 18 et 30 nm. Leur génome possède une extrémité 3' polyadénylée et une protéine VPg liée de manière covalente à l'extrémité 5'. De plus, l'extrémité 5' de leur génome débute par une longue région non traduite contenant une région IRES (internal ribosomal entry site) nécessaire à l'initiation de la traduction de leur génome. Cette région IRES est présente chez l'ensemble des Picornaviridae mais ses structures secondaires sont susceptibles de différer. Entre ces extrémités 5' et 3', il n'y a qu'un seul ORF d'environ 6500 nucléotides codant un précurseur polyprotéique composé de 3 régions, P1, P2 et P3. La région P1 code les protéines structurales (VP1, VP2, VP3 et VP4 ou VP0, VP1 et VP3) tandis les protéines non structurales sont codées par la région P2 (protéines 2A, 2B, 2C) et la région P3 (protéines 3A, 3B, 3C et 3D) (Fauquet et al. 2005). Certains genres ont une polyprotéine qui débute par un peptide Leader (L) dont les fonctions sont très variables. Les méthodes de sérotypage et de génotypage ont permis la caractérisation de 29 genres différents (Adams et al. 2013, Knowles et al. 2012) dont seuls les genres suivants ont été détectés chez l'Homme : Cardiovirus, Cosavirus, Enterovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Parechovirus, Salivirus (Figure 17).



Figure 16 : Schématisation de la structure génomique des virus appartenant à la famille des *Picornaviridae* avec les différentes régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange.



Figure 17: Représentation des principaux genres et espèces composant la famille des *Picornaviridae* avec une classification basée sur la région codant la protéine 3D (RdRp). (Abbréviations : HPeV : paréchovirus humains ; HEV : entérovirus humains ; HRV : rhinovirus humains ; ERAV : rhinovirus équins ; FMDV : virus lié aux maladies pieds-mains-bouche ; EMCV : virus de l'encéphalomyocardite (Adams et al. 2013).

1.6.2 Les Enterovirus

1.6.2.1 Structure et classification

Le genre *Enterovirus* (EV) est composé de 12 espèces dont seulement 7 sont capables d'infecter l'Homme, les Enterovirus A (EV-A), les EV-B, les EV-C, les EV-D, les Rhinovirus A (RV-A), les RV-B et les RV-C (Tableau 3). Cette classification est basée sur l'analyse de la séquence nucléotidique codant la protéine VP1. Les EV humains appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et sont des virus composés d'un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 7500 nucléotides protégé par une capside de 22 à 30 nm de diamètre (Ganesh and Lin 2013).

1.6.2.2 Epidémiologie clinique

EV 71 est un agent étiologique très fréquent des maladies pieds-mains-bouche. Il est susceptible de causer des troubles neurologiques et est l'EV le plus impliqué dans l'apparition de paralysie, depuis la mise en place du protocole d'éradication du poliovirus. Les EV 71 sont principalement identifiés en Asie (Wu et al. 2013, Zhang et al. 2009b) mais de plus en plus d'études indiquent leur présence dans une moindre mesure à travers le monde (Honkanen et al. 2013, Schuffenecker et al. 2011, Tan et al. 2012, van der Sanden et al. 2011). Les coxsackievirus de types A et B quant à eux sont susceptibles de provoquer des troubles respiratoires, des méningites et des paralysies. De plus, les coxsackievirus B peuvent être à l'origine de péricardite et de myocardite ainsi que d'herpangine (tout comme les coxsackievirus A) dont les principaux symptômes sont une intense fatigue accompagnée d'une fièvre brutale et d'une angine (Mirand et al. 2012, Oliveira et al. 2014). Les poliovirus sont les agents responsables de la poliomyélite. De nombreuses campagnes d'éradication des poliovirus ont été mises en place à travers le monde principalement basées sur des campagnes de vaccination avec une souche de poliovirus atténuée et une surveillance de toutes les paralysies flasques. À ce jour, il ne reste plus que 3 zones géographiques au sein desquelles les poliovirus circulent encore, l'Asie du sud-est, l'Afrique et l'est de la Méditerranée. Il existe 3 sérotypes de poliovirus (1, 2 et 3) sachant que le sérotype 2 n'a plus été détecté depuis 1999 (Odoom et al. 2012). Schiff et al. (1984) ont estimé la dose infectieuse aux alentours de 500 particules virales pour l'echovirus 12 mais globalement elle reste inconnue pour la majeure partie des EV. Les épidémies à EV ne sont pas saisonnières et ont donc lieu tout au long de l'année (Jubelt and Lipton 2014).

1.6.2.3 Méthodes de détection

Mis à part quelques sérotypes appartenant à l'espèce EV-C, la plupart de ces entérovirus humains sont cultivables sur un large nombre de modèles cellulaires tels que BGMK, Vero, MA 104, PLC/PRF/5, RD, PVK, KB, Hep 2, L20 B ou encore Hela. Leur détection et quantification par des outils de biologie moléculaire se fait essentiellement au niveau de leur région 5'-NTR qui est une région hautement conservée (Romero 1999). La région codant la protéine VP1 est parfois utilisée car elle présente l'avantage d'utiliser les amplicons afin d'effectuer directement une analyse génotypique. Cependant du fait d'une plus grande variabilité nucléotidique au niveau de cette région, l'amplification est susceptible d'être moins efficace nécessitant donc la mise en place d'une PCR nichée (Chiang et al. 2012).

Espèces infectant l'Homme	Nombre de sérotypes	Sérotypes	Références		
		Coxsackievirus A2 (CV-A2) à CV-A8, CV-A10, CV-			
		A12, CV-A14, CV-A16, EV-A71, EV-A76, EV-A89 à	(Nichimum and Chimimu		
EV-A	25	EV-A92, EV-A114, EV-A119 à EV-A121, entérovirus			
		simien 19 (SV19), SV43, SV46 et entérovirus de	2012)		
		babouin A13 (BA13)			
		CV-B1 à CVB6, CV-A9, échovirus 1 (E-1) à E9, E-11,			
		E-21, E-24 à E-27, E-29 et E-33, EV-B69, EV-B73 à			
EV-B	63	EV-B75, EV-B77 à EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98,	(Oberste et al. 2007)		
		EV-B 100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 à			
		EV-B113, SA5			
		Poliovirus 1 (PV-1) à PV-3, CV-A1, CVA11, CV-A13,			
	22	CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24,	(Drown at al. 2002)		
EV-C	23	EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-	(Brown et al. 2003)		
		C105, EV-C109, EV-113, EV-116 à EV-C118			
EV-D	5	EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111, EV-D120	(Blomqvist et al. 2002)		
		RV-A1, RV-2, RV-A7 à RV-A13, RV-A15, RV-A16, RV-			
		A18 à RV-A25, RV-A28 à RV-A34, RV-A36, RV-A38 à			
	80	RV-A41, RV-A43, RV-A45 à RV-A47, RV-49 à RV-A51,	(Malatura at al. 2012)		
KV-A	80	RV-A53 à RV-A68, RV-A71, RV-A73 à RV-A78, RV-	(MCINLYRE et al. 2013)		
		A80 à RV-A82, RV-A85, RV-A88, RV-A89, RV-A90,			
		RV-A94, RV-A96, RV-A100 à RV-A109			
		RV-B3 à RV-B6, RV-B14, RV-B17, RV-B26, RV-B27,			
	22	RV-B35, RV-B37, RV-B42, RV-B48, RV-B52, RV-B69,	(Malatura at al. 2012)		
RV-D	52	RV-B-70, RV-B72, RV-B79, RV-B83, RV-B83, RV-B86,	(MCINEYTE ET al. 2015)		
		RV-B91 à RV-B93, RV-B97, RV-B99 à RV-B106			
RV-C	55	RV-C1 à RV-C55	(McIntyre et al. 2013)		

Tableau 3: Ensemble des espèces susceptibles d'infecter l'Homme appartenant au genre *Enterovirus*.

1.6.3 Les Kobuvirus

1.6.3.1 Structure et classification

Les virus Aichi (AiV) appartiennent au genre *Kobuvirus*. Ils sont composés d'une capside d'environ 30 nm de diamètre contenant un génome dont la taille varie entre 7000 et 8200 nucléotides (Yamashita et al. 1998). Actuellement les AiV, capables d'infecter l'Homme, sont divisés en 3 génotypes (AiV-A, AiV-B et AiV-C) dont l'identification a été réalisée soit au niveau de la région de leur génome codant les protéines 3C et 3D, soit au niveau de la région codant la protéine VP1 (Ambert-Balay et al. 2008, Yamashita et al. 2000). Il existe une bonne corrélation entre les résultats issus de ces deux méthodes de génotypage.

1.6.3.2 Epidémiologie clinique

Le AiV a été isolé pour la première fois en 1989 au Japon (dans la préfecture d'Aichi, à l'origine de leur nom) dans une selle de patient atteint de gastroentérite suite à la consommation d'huîtres (Yamashita et al. 1991). L'AiV-A est fréquemment identifié en Europe et en Asie, l'AiV-B en Europe, Asie et Etats-Unis tandis que l'AiV-C essentiellement en Afrique (Ambert-Balay et al. 2008). De plus, leur séroprévalence est estimé entre 80 et 95% de la population adulte mondiale (Goyer et al. 2008, Oh et al. 2006, Ribes et al. 2010, Yamashita et al. 1993). Cependant, de nombreuses études indiquent que moins de 3% des cas de gastroentérites sont liés à la présence exclusive d'AiV, qui est généralement associés à un autre pathogène entérique (Ambert-Balay et al. 2008, Yamashita et al. 1995). Aucune étude ne propose une dose infectieuse minimale pour ce type de virus. Les infections à AiV ne seraient pas soumises à un effet saisonnier (Nielsen et al. 2013).

1.6.3.3 Méthodes de détection

Il est possible de mettre en culture les AiV sur des cellules BS-C-1 et des cellules Vero mais cela nécessite entre 3 et 4 semaines d'incubation (Yamashita et al. 1991). La microscopie électronique peut être utilisée mais il est difficile de les différencier d'un autre virus appartenant à la famille des *Picornaviridae*. Leur détection par biologie moléculaire s'effectue généralement au niveau la jonction 3C-3D (Yamashita et al. 2000).

1.6.4 Les Cosavirus

1.6.4.1 Structure et classification

Les cosavirus humains (HCoSV) sont actuellement composés de 6 groupes (référencés de A à F) qui ont été établis suite à des analyses menées sur l'intégralité de leur génome ou sur une partie de la région codant la protéine VP1. Leur génome a une taille d'environ 7600 nucléotides. De plus, des événements de recombinaison entre des souches de HCoSV-D et de HCoSV-E ont pu être constatés au niveau de la jonction P1-P2. Les HCoSV-A sont composés de 24 génotypes, les HCoSV-D de 5 génotypes, les HCoSV-E de 2 génotypes et seulement un génotype compose chacun des groupes suivant : HCoSV-B, -C et -F (Kapusinszky et al. 2012). Leur nom provient de l'acronyme, common stool associated picornavirus (Kapoor et al. 2008).

1.6.4.2 Epidémiologie clinique

Ils ont été observés pour la première fois en 2008 en Asie du sud dans les selles d'un enfant atteint de paralysie flasque dont l'origine n'était pas due au virus de la poliomyélite (Kapoor et al. 2008). Par la suite ils ont été répertoriés au sein de selles d'individus atteints ou non de gastroentérites en Australie (Holtz et al. 2008), en Chine (Dai et al. 2010), au Brésil (Stocker et al. 2012) en Thaïlande (Khamrin et al. 2012, Khamrin and Maneekarn 2014), en Tunisie (Rezig et al. 2015). Bien que ces virus soient suspectés d'être à l'origine de troubles gastro-intestinaux, pour le moment leur pathogénicité n'a pas encore été révélée.

1.6.4.3 Méthodes de détection

Les HCoSV peuvent être mis en culture sur des cellules MRC5 (Rezig et al. 2014). Leur détection et quantification par biologie moléculaire est réalisée au niveau de leur région 5'-NTR (Khamrin and Maneekarn 2014).

1.6.5 Les Salivirus

1.6.5.1 Structure et classification

Actuellement le genre *Salivirus* n'est composé que d'une seule et unique espèce qui est salivirus A. Leur nom leur provient de l'acronyme, stool Aichi-like virus. Ils possèdent une capside d'environ 30 nm de diamètre et un génome à ARN simple dont la taille est d'environ 6400 nucléotides.

1.6.5.2 Epidémiologie clinique

Pour le moment, les salivirus ont pu être détectés à la fois chez l'Homme et chez les chimpanzés. Greninger et al (2009) ont identifiés pour la première fois des salivirus dans des selles humaines à l'aide de technique de séquençage haut débit. Par la suite, d'autres études ont mis en évidence la présence de salivirus au sein de selles humaines de personnes présentant des symptômes de gastroentérite, voire même de paralysie flasque mais aussi de personnes asymptomatiques (Greninger et al. 2009, Li et al. 2009, Santos et al. 2015, Shan et al. 2010). Leur pathogénicité n'a pas encore été mise en évidence. Les salivirus ne semblent pas suivre un effet saisonnier au même titre que la plupart des virus appartenant à la famille des *Picornaviridae*.

1.6.5.3 Méthodes de détection

La détection des salivirus se fait généralement au niveau de la région 5'-NTR (Haramoto et al. 2013, Tongling et al. 2010).

1.6.6 Les Hepatovirus

1.6.6.1 Structure et classification

Le genre *Hepatovirus* est constitué d'une seule et unique espèce qui est le virus de l'hépatite A (VHA). Actuellement, à partir de la région codant la jonction entre les protéines VP1 et P2A, 6 génotypes de VHA (VHA I à VHA VI) ont pu être identifiés (Bowden 2010) dont seuls les génotypes I à III sont capables d'infecter l'Homme. Chacun de ces génotypes peut également être subdivisé en 2 sous-génotypes (a et b). Les VHA possèdent une capside d'environ 27 nm de diamètre.

1.6.6.2 Epidémiologie clinique

Les VHA traversent (par transcytose) les cellules de l'épithélium intestinal pour gagner leurs principaux sites de réplication qui sont les hépatocytes (Snooks et al. 2008). Les VHA I (Vaidya et al. 2002) et VHA III (Liu et al. 2006) sont les génotypes les plus fréquemment détectés en clinique. Les VHA sont responsables d'infections hépatiques généralement peu sévères qui peuvent être accompagnées d'autres symptômes tels des maux de têtes, des vomissements et des douleurs abdominales. Chez les jeunes enfants la plupart des infections à VHA sont asymptomatiques tandis que chez l'adulte elles sont essentiellement symptomatiques (Faber et al. 2009, Vogt et al. 2008). La durée d'incubation peut s'étendre jusqu'à 1 mois avant l'apparition des premiers symptômes. Par contre l'excrétion dans les selles peut débuter jusqu'à 14 jours avant l'apparition des premiers symptômes. Les individus infectés par VHA excrètent jusqu'à 10⁹ particules virale/g de fèces (Coursaget et al. 1980, Koopmans et al. 2002). Le nombre de personnes infectées par VHA à travers le monde est de l'ordre de 10 millions chaque année (Wasley et al. 2006). Les zones géographiques les plus touchées sont extrêmement bien corrélées avec les niveaux socioéconomiques les plus faibles (Jacobsen and Koopman 2004). La Figure 18 récapitule les zones les plus touchées par les infections à VHA.



Figure 18: Répartition de la prévalence de VHA au sein de la population mondiale en 2005 (Mohd Hanafiah et al. 2011).

1.6.6.3 Méthodes de détection

Les souches sauvages ne sont généralement pas cultivables, seule la souche adaptée HM175 peut être amplifiée sur des cellules FrP3, FRhK4, PLC/PRF/5, Caco-2 et HepG2. Leur détection et quantification est à l'heure actuelle réalisée essentiellement par biologie moléculaire au niveau de leur région 5'-NTR (Atmar et al. 1995).

1.7 Les Reoviridae

1.7.1 Généralités

La famille des *Reoviridae* est composée de 15 genres reconnus (Francki et al. 2012) qui sont séparés en 2 sous-familles, *Spinareoviridae* constituée de 9 genres (*Orthoreovirus, Aquareovirus, Oryzavirus, Fijivirus, Mycoreovirus, Cypovirus, Idnoreovirus, Dinovernavirus* et *Coltivirus*) et *Sedoreoviridae* constituée de 6 genres (*Orbivirus, Rotavirus, Seadornavirus, Phytoreovirus, Cardoreovirus, Mimoreovirus*). Les virus appartenant à cette famille possèdent un génome segmenté à ARN linéaire double brins comprenant entre 9 et 12 segments. Un large spectre d'hôte est susceptible d'être infecté par l'un des virus appartenant à cette famille mais seulement 4 genres (*Orthoreovirus, Coltivirus, Rotavirus*) sont susceptibles d'infecter l'Homme. Parmi ces 4 genres de virus infectieux pour l'Homme, seuls les *Rotavirus* et les *Orthoreovirus* sont susceptibles d'engendrer des troubles gastro-intestinaux.



Figure 19: Rotavirus humains observés par microscopie électronique (F.P. Williams, U.S. EPA)

1.7.2 Les Rotavirus

1.7.2.1 Structure et classification

Les virus appartenant au genre Rotavirus sont constitués d'une capside d'un diamètre compris entre 60 et 80 nm (Figure 19). Leur génome est composé de 11 segments d'ARN double brins dont chaque segment a une taille comprise entre 667 et 3302 pb (taille totale d'environ 18500 pb) (Estes and Kapikian 2007) qui codent en tout 6 protéines structurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 et VP7) et 6 protéines non structurales (NSP1, NSP 2, NSP3, NSP4, NSP5 et NSP6) (Figure 20). Leur capside est composée de trois couches protéiques concentriques, la couche externe, la couche intermédiaire et la couche interne. La couche protéique externe de leur capside est composée des protéines VP7 et VP4, la couche intermédiaire est quant à elle constituée de la protéine VP6 et la couche interne constituée de la protéine VP2 qui encadre deux autres protéines, VP1 et VP3. Sur la base de l'analyse sérologique et de l'analyse de la séquence nucléotidique de la protéine VP6, le genre Rotavirus peut être divisé en 8 groupes ou espèces (classifiés de A à H) (Matthijnssens et al. 2012). Seuls les groupes A, B et C ont été identifiés comme étant infectieux chez l'Homme. Les rotavirus de groupes A sont composés d'au moins de 27 génotypes G (glycoprotéine), dont l'identification est basée sur l'analyse de la séquence codant la protéine VP7 et de 37 génotypes P basés sur l'analyse de la séquence nucléotidique codant la protéine VP4 (Matthijnssens et al. 2011). Les techniques de sérotypage effectuées sur la protéine VP7 fournissent autant de sérotypes G que de génotypes G tandis que celles effectuées sur la protéine VP4 fournissent moins de sérotypes P que de génotypes P. Ainsi une double nomenclature a été mise en place afin de pouvoir désigner les sérotypes P et les génotypes P. En ce qui concerne les rotavirus de groupe B et C, seules de récentes études proposent 20 génotypes G pour les rotavirus B (Marthaler et al. 2012) et 9 génotypes G pour les rotavirus de groupe C (Marthaler et al. 2013).



Figure 20: Schématisation de la structure génomique de rotavirus de groupe A avec les différentes régions codant les protéines structurales colorées en vert et les protéines non structurales en orange (• représente la coiffe au niveau de l'extrémité 5').

1.7.2.2 Epidémiologie clinique

Les rotavirus sont considérés comme hautement contagieux du fait de leur faible dose infectieuse qui a été estimée comme étant comprise entre 10 et 100 particules virales infectieuses (Graham et al. 1987, Ward et al. 1986), du fait des guantités importantes excrétées dans les selles qui peuvent aller jusqu'à 10¹¹ particules virales/g durant la phase aigüe de l'infection (Blacklow and Greenberg 1991) et qui peut même se prolonger chez des individus immunodéprimés (Patel et al. 2010) et du fait qu'ils soient résistants dans l'environnement (Keswick et al. 1983). Leur transmission se fait par la voie oro-fécale et leur période d'incubation dure généralement entre 1 et 2 jours. Les infections à rotavirus sont responsables de plus 400 000 morts d'enfants de moins de 5 ans ce qui représente 37% du nombre de morts liés à une gastroentérite dans le monde. Plus de 50% de ces morts liés à une infection par rotavirus ont lieu dans seulement 5 pays : l'Inde, le Pakistan, l'Ethiopie, le Nigéria et la République démocratique du Congo (Tate et al. 2012). Au niveau mondial, jusqu'à 10% des cas de gastroentérites aigües chez les enfants peuvent être dû à une infection par rotavirus. Parmi ces cas, 30% vont engendrer une hospitalisation. Avant la mise en place de campagne de vaccination, le nombre annuel de morts liés à une infection à rotavirus était d'environ 200 en Europe (Giaquinto and van Damme 2010, Van Damme et al. 2007) et d'environ 40 aux Etats-Unis (Esposito et al. 2011, Fischer et al. 2007). Actuellement, les génotypes G1P1A[8], G2P1B[4], G3P1A[8], G4P1A[8], G9P1A[8] et G12P1A[8] sont associés à environ 90% des infections humaines à rotavirus en Europe, en Australie et en Amérique du nord (Iturriza-Gomara et al. 2011, Santos and Hoshino 2005) tandis qu'en Asie, en Afrique et en Amérique du sud ce sont les génotypes G5, G6 et G8 qui sont les plus impliqués (Kang et al. 2013, Luchs and Timenetsky Mdo 2014, Mwenda et al. 2010, Todd et al. 2010). L'ensemble des études épidémiologiques menées à travers le monde visant à déterminer les génotypes les plus impliqués ont permis la mise en place d'une approche vaccinale plus pertinente. Les infections humaines par des rotavirus de groupe B ont beaucoup plus rarement été détectées. Quelques études mettent en évidence le caractère majoritairement asymptomatique des infections à des rotavirus de groupe C même s'ils sont tout de même susceptibles d'engendrer des cas de gastroentérites chez l'adulte (O'Ryan et al. 2009, Phillips et al. 2010).

1.7.2.3 Méthodes de détection

Les diagnostics humains sont généralement basés sur la détection d'antigènes viraux par la réalisation de test ELISA et/ou sur la détection de leur génome viral par biologie moléculaire au niveau de la région codant les protéines VP7 ou VP4 (van Doorn et al. 2009). Par contre leur recherche dans l'environnement est exclusivement réalisée par biologie moléculaire. Globalement leur culture reste encore difficile bien que de nombreux modèles cellulaires (BGMK, BSC-1, CaCo-2, COS-7, CV-1, FRhL-2, HT-29, LLC-MK2, MA-104 et Vero) ont été mis en évidence (Gerna et al. 1984, Kutsuzawa et al. 1982). Ces méthodes de culture présentent des efficacités qui sont susceptibles de varier d'une souche de rotavirus à une autre (Arnold et al. 2009).

2 Les virus entériques dans l'environnement hydrique

Les individus infectés par des virus entériques vont être amenés à excréter jusqu'à 10¹¹ particules virales par gramme de fèces durant plusieurs jours, même après la disparition des symptômes (

Virus	Nombre de particules virales/g de fèces	Durée de l'excrétion	Référence
AdV	Environ 10 ⁶	Environ 15 jours	(Nicand et al. 1998)
HAstV	Environ 10 ⁶	Environ 12 jours	(Nicand et al. 1998)
EV	Jusqu'à 10 ⁶	3 à 11 semaines	(Chung et al. 2001)
NoV	Jusqu'à 10 ¹⁰	Entre 20 et 30 jours	(Atmar et al. 2014)
Rotavirus	Jusqu'à 10 ¹¹	10 jours	(Blacklow and Greenberg 1991, Patel et al. 2010)

Tableau 4). L'évacuation de ces selles s'effectue principalement au sein des eaux usées et c'est ainsi que la contamination du milieu hydrique par les virus entériques est initiée en

milieu urbain. Cette contamination virale est susceptible de s'étendre aux différents milieux

			(Iwakiri et al. 2009, Miyoshi et
Sapovirus	Jusqu'à 10 ¹⁰	Entre 20 et 30 jours	al. 2010, Yamashita et al.
			2010)
VHA		Do quolquos jours à	(Coursaget et al. 1980,
	Jusqu'à 10 ⁹	De queiques jours a	Koopmans et al. 2002,
		plusieurs mois	Yotsuvanagi et al. 1996)

récepteurs impactés par les effluents de STEP, quand des STEP ont été mises en place, tels que les eaux de mer, les eaux douces de surfaces (lacs et rivières) mais également les eaux souterraines. Par la suite, l'ensemble de ces eaux peuvent être utilisées à différentes fins : récréatives (baignade et pêche), irrigation de cultures maraichères, conchyliculture mais aussi comme sources de captage pour produire de l'eau potable (Figure 21). Par conséquent, la gestion de la contamination virale des ressources en eau est un réel enjeu de santé publique qui nécessite une bonne compréhension de la circulation de ces particules au sein du cycle de l'eau. Ce chapitre s'intéresse donc aux charges virales susceptibles d'être observées dans différentes matrices d'eau et aux facteurs pouvant expliquer l'observation de telles concentrations en particules virales. La persistance des particules virales dans l'environnement hydrique et face à certains types de traitements est un point qui est également abordé.





Figure 21: Schématisation de la circulation des virus entériques dans un environnement hydrique (d'après (Bosch et al. 2006)).

2.1 Les eaux en station d'épuration

2.1.1 Généralités

Dans les pays où l'assainissement est bien développé, les eaux usées d'une agglomération sont collectées par le réseau d'assainissement qui les achemine vers une STEP. Ces eaux collectées sont des eaux usées domestiques auxquelles viennent s'ajouter les eaux usées industrielles et parfois les eaux pluviales. En effet, il existe deux types de réseaux collecteurs, les réseaux unitaires et les réseaux séparatifs (Spellman 2013). Les réseaux unitaires permettent l'évacuation des eaux usées domestiques et des eaux pluviales au sein du même réseau de canalisation. Le principal avantage de ce type de réseau provient de sa facilité de gestion étant donné qu'il n'y a qu'un seul réseau de canalisation. Cependant, ce type de réseau doit être conçu de manière à pouvoir répondre à de fortes variations de débits liées aux épisodes pluvieux. L'autre type de réseau est connu sous le nom de réseau séparatif. Comme son nom l'indique, la collecte des eaux usées domestiques et des eaux pluviales n'est pas réalisée par le même réseau. Ces eaux usées vont être prises en charges par une STEP, tandis que les eaux pluviales seront redirigées directement dans l'environnement. L'enjeu de la prise en charge des eaux usées par les STEP est de traiter l'eau de manière à ne pas altérer la qualité de celle du milieu récepteur, en éliminant les pollutions liées à la présence de carbone, d'azote et de phosphore mais aussi des matières en suspension (MES).

Il existe principalement deux grands types de STEP, celles reposant sur un traitement biologique, généralement basé sur l'utilisation de boues activées, mises en place pour assainir les eaux usées domestiques et parfois industrielles, et celles reposant sur des traitements physico-chimiques qui sont essentiellement utilisées pour traiter les eaux usées industrielles. Une STEP à boues activées est constituée d'une succession de traitements (Grady Jr et al. 2011). Ces traitements commencent par un prétraitement durant lequel est effectué une étape de dégrillage, de dessablage et de déshuilage. L'objectif de ce prétraitement est d'éliminer les déchets solides, les sables et les graisses. Ce prétraitement est suivi par un traitement primaire qui n'est généralement qu'une simple étape de décantation des matières solides qui seraient encore présentes dans les eaux. Pour finir, un traitement biologique reposant sur l'utilisation de micro-organismes placés au contact des eaux usées. Ces microorganismes vont participer à l'élimination des polluants (matières carbonées, azotées et phosphatées) contenus dans les eaux usées et sont placés dans des conditions permettant une prolifération adaptée à la charge polluante devant être traitée. Des bactéries aérobies, de par leur extrême richesse en enzymes, dégradent rapidement par voie oxydative les composés organiques. Des bactéries permettent également la nitrification (transformation de l'azote ammoniacal (NH₄⁺) en nitrates (NO₃⁻), puis dénitrification des nitrates en azote gazeux relargué dans l'atmosphère. Enfin, d'autres bactéries permettent la déphosphatation par accumulation du phosphore dans les boues. La séparation de l'eau et des boues (contenant notamment la biomasse bactérienne) se fait généralement par un passage au sein d'un clarificateur. Dans certaines STEP sont mis en place des bioréacteurs à membranes (BAM) qui est un procédé combinant l'épuration biologique au travers des boues activées et la séparation des solides (bactéries et MES) et des liquides par filtration sur des membranes permettant d'obtenir une eau de rejet de meilleure qualité (Hai et al. 2013). Certaines STEP mettent également en place un traitement tertiaire qui est une étape de désinfection au chlore, aux rayons ultraviolets (UV) ou à l'ozone (Oller et al. 2011). La mise en place de BAM et de traitements tertiaires dans le processus de traitement des eaux usées s'explique par la volonté de réutiliser directement les eaux usées traitées pour diverses applications telles que l'irrigation de cultures maraîchères, l'arrosage municipal ou à des fins industriels (Feigin et al. 2012).

2.1.2 Les eaux usées

Les eaux usées font figures de portes d'entrée pour les particules virales excrétées via les fèces humaines. Au vu des charges virales excrétées par l'Homme (

Virus	Nombre de particules virales/g de fèces	Durée de l'excrétion	Référence
AdV	Environ 10 ⁶	Environ 15 jours	(Nicand et al. 1998)
HAstV	Environ 10 ⁶	Environ 12 jours	(Nicand et al. 1998)
EV	Jusqu'à 10 ⁶	3 à 11 semaines	(Chung et al. 2001)
NoV	Jusqu'à 10 ¹⁰	Entre 20 et 30 jours	(Atmar et al. 2014)
Rotavirus	Jusqu'à 10 ¹¹	10 jours	(Blacklow and Greenberg 1991, Patel et al. 2010)
Sapovirus	Jusqu'à 10 ¹⁰	Entre 20 et 30 jours	(Iwakiri et al. 2009, Miyoshi et al. 2010, Yamashita et al. 2010)
VHA	Jusqu'à 10 ⁹	De quelques jours à plusieurs mois	(Coursaget et al. 1980, Koopmans et al. 2002, Yotsuvanagi et al. 1996)

Tableau 4), jusqu'à 10¹¹ par gramme de fèces pendant des semaines voire des mois aussi bien chez les individus symptomatiques que les individus asymptomatiques, les eaux

usées sont susceptibles de contenir d'importantes quantités des virus entériques. À travers le monde, de nombreuses études ont évalué les fréquences de détection ainsi que les concentrations des virus entériques dans les eaux usées (Tableau 5). À titre d'exemple, en Norvège en moyenne 10⁵ 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 10⁷ 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. 2014b). Une autre étude, cette fois ci menée au Japon rapporte des charges virales qui oscillent au cours de l'année entre 10⁴ et 10⁷ copies/L pour les AdV, les NoV GI et GII et entre 10⁴ et 10⁵ pour les EV (Katayama et al. 2008). Les EV sont également très fréquemment identifiés dans les eaux usées (Afrique du Sud, Etats-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 l'été qui est comprise entre 10² et 10⁵ 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'entrainer 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.

2.1.3 Les eaux usées traitées

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 (Tableau 5) 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 10⁴ et 10⁷ copies/L tout au long de l'année de prélèvement tandis qu'en sortie un abattement entre 2 (99%) et 4 log₁₀ (99,99%) pouvait être observé. Une autre étude réalisée en Italie a révèlé pour les mêmes types de traitement que l'étude précédente, un abattement de la charge adénovirale compris entre 0,5 et 3 log₁₀ (68,38% et 99,9%) (Carducci et al. 2008). Simmons et Xagoraraki (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 log₁₀ (99%) pour les AdV et entre 2,5 et 4 log₁₀ (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 entrainant une réduction virale supplémentaire inférieure à 1 log₁₀ (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).

Etude bibliographique

	Eaux	usées	Eaux usé	es traitées				
Virus	% détection	Charge virale (copies/L)	% détection	Charge virale (copie/L)	Abattement moyen (log ₁₀)	Traitement	Pays	Référence
	100 (12/12)	10 ⁵ à 10 ⁶	100 (12/12)	10 ³ à 10 ⁴	<2	Boues activées + chloration	Japon	(Katayama et al. 2008)
VbA	100 (18/18)	10 ⁴ à 10 ⁷	100 (18/18)	10 ⁴ à 10 ⁵	<2	Boues activées	Suisse	(Masclaux et al. 2013)
	100 (8/8)	$10^{5} a 10^{7}$	100 (8/8)	10^{3} à 10^{5}	2,2 à 3,6	Boues activées + BAM	Etats-Unis	(Simmons and Xagoraraki 2011)
	100 (12/12)	10 ⁵ à 10 ⁷	91 (10/11)	10 ³ à 10 ⁴	<3	Boues activées + chloration	Japon	(Kitajima et al. 2013)
AICHIV	100 (12/12)	10 ⁵ à 10 ⁷	100 (12/12)	$10^4 \text{ à } 10^6$	<1	Boues activées + chloration	Etats-Unis	(Hata et al. 2014)
	100 (12/12)	10 ⁴ à 10 ⁵	100 (12/12)	10 ¹ à 10 ²	>2,5	Boues activées + chloration	Japon	(Katayama et al. 2008)
EV	100 (5/5)	$10^2 a 10^3$	100% (5/5)	Jusqu'à 10 ²	0,7 à 1,8	Boues activées	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)
	100 (8/8)	10 ⁵ à 10 ⁷	100 (8/8)	10 ¹ à 10 ²	>5	Boues activées + BAM	Etats-Unis	(Simmons and Xagoraraki 2011)
HAstV	16 (4/24)	Jusqu'à 10⁴	16 (4/24)	Jusqu'à 10²	>2	Boues activées	Brésil	(Machado et al. 2012)
	71 (10/14)	10⁴ à 106	29 (4/14)	10 ³ à 10 ⁴	1,8 à 2,66	Boues activées	Japon	(Haramoto and Otagiri 2014)
ΠΟΟΟΥ	25 (6/24)	Jusqu'à 10⁵	4 (1/24)	Jusqu'à 10 ³	<2	Boues activées	Etats-Unis	(Kitajima et al. 2015)

Etude bibliographique

	100 (12/12)	10 ⁴ à 10 ⁶	100 (12/12)	10 ² à 10 ³	1,9	Boues activées + chloration	Japon	(Katayama et al. 2008)
	100 (5/5)	$10^4 a 10^6$	100 (5/5)	Jusqu'à 10 ⁴	<2	Boues activées	Suisse	(Masclaux et al. 2013)
NoV	100 (5/5)	10 ² à 10 ⁷	100% (5/5)	10 ¹ à 10 ⁵	0,2 à 2,1	Boues activées	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)
	100 (8/8)	10 ⁵ à 10 ⁸	0 (0/8)	-	>8	Boues activées + BAM	Etats-Unis	(Simmons and Xagoraraki 2011)
Rotavirus	100 (5/5)	10² à 10⁵	100% (5/5)	10 ¹ à 10 ⁴	0,03 à 0,9	Boues activées	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)
	67 (8/12)	10 ¹ à 10 ⁶	83 (10/12)	10 ¹ à 10 ⁶	<1	Boues activées + chloration	Etats-Unis	(Kitajima et al. 2014b)
C-UN/	93 (13/14)	Jusqu'à 10 ⁷	29 (4/14)	Jusqu'à 10⁵	>3	Boues activées	Japon	(Haramoto et al. 2013)
Sallv	46 (11/24)	Jusqu'à 10⁵	46 (11/24)	Jusqu'à 104	<1	Boues activées	Etats-Unis	(Kitajima et al. 2014b)
Conordinus	91 (11/12)	10 ⁴ à 10 ⁷	75 (9/12)	10 ³ à 10 ⁶	<2	Boues activées + chloration	Etats-Unis	(Kitajima et al. 2014a)
Sapovirus	100 (16/16)	10 ³ à 10 ⁷	100 (16/16)	$10^{1} a 10^{3}$	1,7 à 4,1	Boues activées + BAM	France	(Sima et al. 2011)
VHA	0 (0/10)	-	0 (0/10)	-	-	Boues activées + BAM	Etats-Unis	(Simmons and Xagoraraki 2011)
VHE	24 (15/62)	Jusqu'à 10 ⁴	0 (0/62)	-	>2	Boues activées	Suisse	(Masclaux et al. 2013)

Tableau 5: Fréquences et charges virales des virus entériques observées dans les eaux usées et les eaux usées traitées en fonction du ou des traitements mis en place dans la STEP (BAM : bioréacteur à membrane).

2.2 Les eaux environnementales

2.2.1 Les eaux douces 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 des 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 (

				Rivière				
Virus	% détection	Charge virale (copie/L)	Débit (m³/s)	Longueur (km)	Nom	Pays	Référence	
	100 (6/6)	10 ³ à 10 ⁴	16,9	170	Llogregat	Espagne	(Calgua et al. 2013b)	
AdV	97 (40/41)	10 ² à 10 ⁴	79	217	Rhur	Allemagne	(Hamza et al. 2009)	
AichiV	100 (29/29)	10² à 10 ⁴	63	128	Fujikawa	Japon	(Hata et al. 2014)	
	2 (1/41)	Jusqu'à 10 ⁴	79	217	Rhur	Allemagne	(Hamza et al. 2009)	
EV	100 (8/8)	<101	230	925	Meuse	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)	
	10 (7/72)	10 ¹ à 10 ²	92	126	Buffalo	Afrique du sud	(Chigor and Okoh 2012)	

). 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 10⁴ 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 10⁴ copies/L. Cependant, très peu d'études mettent en évidence la présence

HCoSV	29 (4/14)	10 ² à 10 ⁴	63	128	Fujikawa	Japon	(Haramoto and Otagiri 2014)
	100 (8/8)	10 ¹ à 10 ³	230	925	Meuse	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)
NoV	83 (5/6)	10 ³ à 10 ⁵	16,9	170	Llogregat	Espagne	(Calgua et al. 2013b)
	32 (13/41)	$10^{1} a 10^{4}$	79	217	Rhur	Allemagne	(Hamza et al. 2009)
	100 (8/8)	10 ² à 10 ³	230	925	Meuse	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)
Rotavirus	90 (37/41)	$10^{1} a 10^{4}$	79	217	Rhur	Allemagne	(Hamza et al. 2009)
	14 (10/72)	10 ¹ à 10 ²	92	126	Buffalo	Afrique du sud	(Chigor and Okoh 2012)
VHA	35 (25/72)	10 ¹ à 10 ⁵	92	126	Buffalo	Afrique du sud	(Chigor and Okoh 2012)

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 (Figure 18). 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.

2.2.2 Les eaux souterraines

Les eaux souterraines sont très fréquemment utilisées comme source de captage afin de produire de l'eau potable. La contamination virale de ces ressources en eau proviendrait essentiellement de l'épandage des boues issues de STEP (Figure 21). En effet, plusieurs études ont clairement mis en évidence la circulation de virus entériques à travers le sol au point d'atteindre parfois des nappes d'eau souterraine (Collins and Kennedy 1992, Fu et al. 2007). La circulation de ces virus entériques dans les sols est dépendante de nombreux facteurs tels que le type de sol (les sols boueux sont moins absorbants, les sols riches en fer ont une forte absorption), le pH (en règle générale plus le pH diminue plus l'absorption augmente), le type de particules virales, la présence de composées solubles ou encore la vitesse d'écoulement de la matrice contenant les virus (une pluviométrie importante facilite le lessivage des boues) (Charles 1984). Borchardt et al. (2004) ont analysé les eaux souterraines issues de 50 puits situés dans le Wisconsin, en effectuant 4 prélèvements par puits et cela au cours d'une année. Les virus recherchés étaient les rotavirus, les VHA, les NoV ainsi que les EV. Les résultats de cette étude ont révélé que seulement 4 puits se sont avérés positifs pour au moins l'un de ces virus. Cette contamination était transitoire étant donné qu'aucun prélèvement successif sur un même puits n'était positif.

En Corée en Sud, Cheong et al. (2009) ont analysé 29 échantillons d'eau souterraines destinées à l'irrigation de cultures maraichères et 17% d'entre eux étaient positifs pour les AdV et/ou les EV.

Tableau 6: Fréquences de détection et charges virales dans les eaux de rivière.

			Rivière				
Virus	% détection	Charge virale (copie/L)	Débit (m³/s)	Longueur (km)	Nom	Pays	Référence
	100 (6/6)	10 ³ à 10 ⁴	16,9	170	Llogregat	Espagne	(Calgua et al. 2013b)
AdV	97 (40/41)	10 ² à 10 ⁴	79	217	Rhur	Allemagne	(Hamza et al. 2009)
AichiV	100 (29/29)	10² à 10⁴	63	128	Fujikawa	Japon	(Hata et al. 2014)
	2 (1/41)	Jusqu'à 10 ⁴	79	217	Rhur	Allemagne	(Hamza et al. 2009)
EV	100 (8/8)	<10 ¹	230	925	Meuse	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)
	10 (7/72)	$10^{1} a 10^{2}$	92	126	Buffalo	Afrique du sud	(Chigor and Okoh 2012)
HCoSV	29 (4/14)	10² à 10⁴	63	128	Fujikawa	Japon	(Haramoto and Otagiri 2014)
NoV	100 (8/8)	10 ¹ à 10 ³	230	925	Meuse	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)
	83 (5/6)	10 ³ à 10 ⁵	16,9	170	Llogregat	Espagne	(Calgua et al. 2013b)

2.2.3 Les eaux marines

La contamination virale des eaux marines s'effectue soit par les effluents de STEP soit par les fleuves qui viennent s'y jeter. Dans le second cas, un facteur de dilution supplémentaire vient s'ajouter par rapport aux effluents initiaux de STEP. Victoria et al. (2014) ont analysé 74 échantillons d'eau de mer au Brésil pendant 6 mois et ces échantillons étaient positifs dans 66% des cas pour HAdV, 37% pour RV-A et 14% pour NoV GII avec des charges virales médianes d'environ 10⁴ copies/L. Des eaux côtières de Chine ont été analysées pour les NoV GI et GII et les résultats indiquent leur présence dans 66% des cas pour les NoV GI et dans 100% des cas pour les NoV GII avec des charges virales qui d sont comprises entre 340 et 3800 copies/L. En Europe, des équipes se sont intéressées à estimer les fréquences de détection des EV dans des échantillons d'eau de mer. Ainsi, la fréquence de détection des EV était de 44% en

	32 (13/41)	$10^{1} a 10^{4}$	79	217	Rhur	Allemagne	(Hamza et al. 2009)	Espagne (Pianetti et al. 20 et al. 1998) et 84% en (000), 32% en Grèce (Vant:	Italie (Pina arakis and
	100 (8/8)	10 ² à 10 ³	230	925	Meuse	Pays-Bas	(Lodder and de Roda Husman 2005)	Papapetropoulou 1998).		
Rotavirus	90 (37/41)	10 ¹ à 10 ⁴	79	217	Rhur	Allemagne	(Hamza et al. 2009)			<u>.</u>
	14 (10/72)	10 ¹ à 10 ²	92	126	Buffalo	Afrique du sud	(Chigor and Okoh 2012)	2.3 Persistance l'environnement hyd	virale rique	dans
VHA	35 (25/72)	$10^{1} a 10^{5}$	92	126	Buffalo	Afrique du sud	(Chigor and Okoh 2012)			
								2.3.1 Generalites		

Les virus entériques ne possèdent pas la capacité de se multiplier en dehors de leur hôte. Par conséquent, aucune multiplication de ces particules virales ne peut avoir lieu dans un environnement hydrique. Cela signifie qu'une fois excrétées au travers de selles humaines, le nombre de particules virales ne fera que décroître plus ou moins rapidement en fonction de la matrice et des conditions environnantes dans lesquelles elles se trouvent. L'évaluation de leur persistance est donc un point essentiel dans la compréhension de la circulation des virus entériques humains dans l'environnement. En effet, ces particules virales ont pu être détectées au sein de nombreux types d'eau ce qui démontre bien leur capacité de dissémination au sein du milieu hydrique mais également leur capacité à résister à différents conditions environnementales. À l'heure actuelle, il n'existe que très peu de modèles cellulaires permettant de cultiver les virus entériques humains. Or, la culture cellulaire est la seule méthode in vitro pouvant indiguer si les particules virales sont infectieuses. Afin de pallier à cette absence, de nombreux modèles viraux de substitutions sont utilisés. Ainsi, l'utilisation de bactériophages tels que le phage MS2, présentant des caractéristiques communes (un génome à ARN simple brin de polarité positive et une capside virale icosaédrique présentant une charge électrique similaire dans la plupart des matrices d'eau environnementale) avec les virus entériques, mais aussi des virus de la même famille ayant pour hôte un animal et pour lesquels des modèles cellulaires sont disponibles, avec par exemple le norovirus murin 1 (MNV-1), le rotavirus simien SA11 ou encore le calicivirus félin (FCV). Malgré la possibilité d'utiliser des modèles cellulaires, les souches virales de laboratoire ne sont pas nécessairement représentatives de la persistance des souches circulant dans l'environnement et en fonction du modèle cellulaire utilisé il est possible de constater des variations. Par ailleurs, il existe une grande variabilité de persistance au sein des virus entériques mais également en fonction du type de traitement de désinfection appliqué ou encore de la matrice au sein de laquelle les particules virales se trouvent.

2.3.2 Eau souterraine

L'épandage de boues issues de STEP est couramment pratiqué dans l'agriculture et pose un problème quant à la contamination virale des eaux souterraines. Quelques études se sont intéressées à évaluer la capacité de persistance des virus entériques dans des eaux souterraines. Sobsey et al. (1989) ont dopé des échantillons d'eau souterraine avec des VHA, des poliovirus de type 1 et des echovirus 1 puis ont placé ces échantillons dopés à 5°C. L'ensemble de ces virus ont été capable de persister au moins 12 semaines dans ces conditions. En 2008, Bae et Schwab ont montré que l'abattement de l'infectivité virale à 25°C dans de l'eau souterraine était de l'ordre de 0,18 log₁₀ (33,93%) par jour pour les FCV, de 0,13 log₁₀ (25,87%) par jour pour les poliovirus de type 1, de 0,12 log₁₀ (24,14%) par jour pour les bactériophages MS2 et de 0,09 log₁₀ (18,72%) par jour pour les MNV-1. De plus, cette étude a révélé une persistance des génomes viraux plus importante que celle de l'infectivité virale. Des études ont démontré une remarquable persistance de la part des AdV 2 qui sont capables de rester infectieux après 120 jours passés dans des eaux souterraines à 20°C et dont le génome pouvait encore être détecté après 400 jours de présence (Ogorzaly et al. 2010). Une étude relativement récente réalisée sur des volontaires a révélé que des NoV GI.1 étaient encore capable d'infecter leur hôte après avoir passé 61 jours dans de l'eau souterraine et leurs génomes étaient encore détectables au bout de 3 ans (Seitz et al. 2011). Gordon et Toze (2003) ont indiqué que le facteur qui influence le plus la persistance virale était la présence d'autres micro-organismes sans pour autant pouvoir expliquer leur réelle implication.

2.3.3 Eau de mer

Slomka et al. (1998) ont dopé de l'eau de mer avec des calicivirus félins (FCV) et ont observé que le nombre de particules virales infectieuses avait diminué d'environ 1 log₁₀ (90%) après seulement 1,5 heure puis l'infectivité de ces virus restait stable jusqu'à 24 jours. Une autre étude a montré qu'après 40 jours dans de l'eau de mer, la quantité de FCV infectieux avaient diminué de 2 log₁₀ (99%) à 4°C, de 3 log₁₀ (99,9%) à 10°C et de plus de 7 log₁₀ (99,99999%) à 20°C (Kadoi and Kadoi 2001). Enriquez et al. (1995) ont comparé la persistance dans l'eau de mer du poliovirus de type 1 avec celles des AdV 40 et 41. Les poliovirus ont persisté moins longtemps que les AdV puisqu'à 15°C après 28 jours leur abattement était de 3 log₁₀ (99,9%) tandis qu'il était de 1,4 log₁₀ (96,02%) pour AdV 40 et de 1,6 log₁₀ pour AdV41.

2.3.4 Eau potable

Malgré les traitements de désinfection mis en place au sein des usines d'eau potable, plusieurs études ont détecté, généralement par des outils de biologie moléculaire, la présence de virus entériques dans les eaux de distribution. Il est donc nécessaire d'évaluer la persistance de ces particules virales contenues dans ce type de matrice d'eau. Plusieurs études ont révélé une capacité importante de persistance des virus entériques dans l'eau potable. Raphael et al. (1985) a observé que 64 jours après l'inoculation de rotavirus A dans des échantillons d'eau potable déchlorée placés à 4°C, des rotavirus A infectieux pouvaient encore être détectés. Les AdV 40 et 41 peuvent persister au-delà de 60 jours à des températures allant de 4°C à 23°C et se sont révélés plus stable que les VHA et les poliovirus de type 1. En effet pour observer un abattement de 2 log₁₀ (99%) à 4°C, il faut attendre 41 jours pour le poliovirus, 56 jours pour les VHA, 92 jours pour les AdV 40 et 304 jours pour les AdV 41 (Enriquez et al. 1995). Malgré l'importance des HAstV dans les cas de gastroentérites très peu d'études se sont intéressées à leur persistance dans l'environnement. Abad et al. (1997) a mis en évidence la capacité de persistance des HAstV via des analyses effectuées par ICC-PCR (Integrated culture cells-PCR). Ainsi dans de l'eau potable préalablement déchlorée, des abattements de la charge virale de 2log₁₀ (99%) à 4°C et de 3,2 log₁₀ (99,94%) à 20°C ont pu être observés au bout de 60 jours tandis qu'au bout de 90 jours, l'abattement était respectivement de 3,3 log₁₀ (99,95%) et de 5 log₁₀ (99,999%).

Les virus entériques ont également la capacité de persister dans de l'eau minérale embouteillée. Biziagos et al. (1988) ont montré qu'à 4°C la détection de VHA et de poliovirus de type 1, par des techniques de biologie moléculaire, était encore possible après une période d'incubation supérieure à 1 an tandis qu'à 20°C les poliovirus n'étaient plus détectés au-delà de 300 jours. Les VHA restaient détectables à 20°C même après 1 an. Par la suite, Fallahi et Mattison (2011) ont montré que le MNV-1 pouvait persister 42 jours à température ambiante avec une inactivation virale d'environ 1,5 log₁₀ (96,84%). Beuret et al. (2002) ont mis en évidence que les norovirus pouvaient persister au-delà de 12 mois dans de l'eau minérale embouteillée stockée à 20°C à l'obscurité.

2.4 Traitements de désinfection

2.4.1 Les rayons ultraviolets

Etude bibliographique

Les rayons ultraviolets (UV) sont une méthode de désinfection très fréquemment utilisée au sein des usines de production d'eau potable. La généralisation de leur mise en place s'expliquait initialement par leur efficacité contre Cryptosporium et Giardia (Einarsson et al. 2015, Monis et al. 2014) mais également parce que ce type de traitement de désinfection permettait d'apporter une alternative à la chloration qui est susceptible d'entrainer la formation de sous-produits néfastes pour la santé humaine tels que les chloramines (Richardson et al. 2007). Du fait de cette généralisation, de nombreuses études se sont intéressées à estimer leur efficacité sur un spectre de pathogènes pour l'Homme beaucoup plus large parmi lesquels figurent les virus entériques (Tableau 7). Hijnen et al. (2006) indiquent qu'une dose de 40mJ/cm² est recommandée pour observer un abattement de l'ordre de 4 log₁₀ (99,99%) chez la plupart des pathogènes humains susceptibles de se trouver dans le milieu hydrigue. Néanmoins, les AdV possèdent une résistance importante à ce type de traitement. Plusieurs études recommandent des doses UV comprise entre 120 et 200 mJ/cm² pour atteindre 4 log₁₀ (99,99%) d'abattement en utilisant des lampes UV à basse pression (longueur de 254 nm). La résistance des AdV aux traitements UV est étroitement liée à la nature ADN de leur génome et aux mécanismes cellulaires de réparation de l'ADN après libération dans le cytoplasme (Thurston-Enriquez et al. 2003b). L'inactivation virale à l'aide de lampes UV à basse pression repose essentiellement sur la dégradation des génomes viraux. Ces dégradations s'opèrent préférentiellement au niveau des bases de type pyrimidine (uracile, thymine et cytosine) successives sur un même brin entraînant la formation de dimères cyclobutanes de pyrimidines (CDP) (Bowman et al. 2000). Il est également possible d'utiliser des lampes UV à moyenne pression qui émettent un spectre de longueurs ondes beaucoup plus large, de 200 à 600 nm. Plusieurs études indiquent que les lampes UV à moyenne pression sont plus efficaces que les lampes UV à basse pression. Beck et al. (2014) démontrent que les longueurs UV supérieures à 240 nm, avec une efficacité maximale observée à 260 nm, sont essentiellement responsables de dommages au niveau du génome tandis que les longueurs d'onde inférieures à 240 nm induisent des dommages au niveau de la capside virale.

Tableau 7: Doses UV (en mJ/cm²) nécessaires pour provoquer 1 log₁₀ (90%) et 4 log₁₀ (99,99%) d'abattement pour différents types de virus entériques et modèles.

2.4.2 Le chlore

La chloration est le traitement de désinfection le plus fréquemment utilisée au sein des usines de production d'eau potable à travers le monde. Le chlore peut également être utilisé à des doses résiduaires dont l'objectif n'est pas de servir de traitement de désinfection mais plutôt

	Dose UV		
Virus	1 log10 (90%)	4 log10 (99,99%)	Référence
AdV 40	50	226	(Thurston-Enriquez et al. 2003b)
AdV 41	24	112	(Meng and Gerba 1996)
Bactériophage MS2	23	119	(Thurston-Enriquez et al. 2003b)
Coxsackievirus B3	10	27	(Gerba et al. 2002)
Poliovirus 1	7	30	(Hijnen et al. 2006)
Rotavirus simien SA11	10	39	(Hijnen et al. 2006)
Virus Aichi	10	50	(Fino and Kniel 2008)
VHA	6	22	(Hijnen et al. 2006)

d'empêcher la prolifération de micro-organismes durant la distribution de l'eau potable. L'efficacité d'un traitement de chloration est très variable d'un type de virus entérique à un autre. Le pH et la température de l'eau sont également deux facteurs influençant fortement l'efficacité de ce type de traitement. Ainsi, le pH de l'eau chlorée joue un rôle important dans l'efficacité de traitement au chlore puisque de la valeur du pH de l'eau dépend la proportion d'acide hypochloreux (HOCI) par rapport aux anions hypochlorites (OCI⁻) en solution. En effet, pour

des valeurs de pH supérieures à 8, la solution de chlore contient davantage d'OCI⁻ tandis qu'une solution ayant un pH inférieur à 6 contient essentiellement des HOCI. Plusieurs études ont observé que le chlore sous sa forme HOCI était beaucoup plus efficace avec des abattements de la charge virale pouvant être jusqu'à 10 fois supérieurs (Weidenkopf 1958). La température influence également l'efficacité de la chloration. Scarpino et al. (1972) ont mis en évidence que l'efficacité du traitement de chloration sur le poliovirus augmentait d'un facteur 2 quand la température de l'eau passait de 5 à 25°C. Cet effet de la température a été confirmé par Lukasik et al. (2003) qui ont observé que l'efficacité de la chloration sur des bactériophages et du poliovirus était deux fois plus importante dans une eau à 43°C plutôt qu'à 22°C. Les HAstV sont considérés comme plus résistants face à un traitement au chlore que la plupart des autres virus entériques étant donné que pour un traitement de 2 heures d'incubation dans des solutions de 0,5 mg et 1 mg de chlore libre, les abattements étaient respectivement de 2,4 log₁₀ (99,60%) et de 4 log₁₀ (99,99%) (Abad et al. 1997). Le Tableau 8 récapitule les conditions de traitements au chlore et l'abattement observé pour différents types de virus. Cependant, d'autres études seraient nécessaires pour confirmer ces résultats.

L'inactivation des virus entériques par chloration repose sur une dégradation à la fois de leur capside mais également de leur génome. Plusieurs études ont démontré que la capacité d'attachement des particules virales n'était que très peu affectée suite à une chloration mais que l'inactivation virale s'expliquait principalement à des détériorations au niveau du génome viral. Cependant, un traitement important au chlore, 20 mg/L pendant 1 heure, entrainait une incapacité d'attachement chez les VHA traités (Li et al. 2002a). Li et al. (2002) ont montré en comparant l'amplification de différentes régions du génome du VHA que ces régions n'ont pas toutes la même sensibilité au chlore. En effet, les régions 5'-NTR et 3'-NTR se sont avérées très sensibles à la chloration tandis que la région codante du génome semble quant à elle plus résistante. Une autre étude a réalisé le même constat pour le poliovirus de type 1 (Simonet and Gantzer 2006a). La partie 5'-NTR contient une structure secondaire IRES nécessaire à la réplication virale et dont la destruction par le chlore pourrait expliquer en grande partie l'inactivation virale par ce type de traitement.

Tableau 8: Inactivation des virus entériques et modèles dans l'eau par chloration (le Ct correspond à la concentration en désinfectant multipliée par le temps de contact).

Virus	Concentration de chlore (mg/L)	Temps de contact (min)	Ct (mg.min/L)	рН	Température (°C)	Abattement (log ₁₀)	Référence
AdV 40	0,5	0,5	0,25	6	5	2,5	(Thurston-Enriquez et al. 2003a)
Bactériophage MS2	1	0,5	0,5	6	5	5	(Shin and Sobsey 2008)
Calicivirus félin	0,5	0,5	0,25	6	5	4,3	(Thurston-Enriquez et al. 2003a)
HAstV	0,5 1	120	60 120	7	4	2,4 4	(Abad et al. 1997)
VHA	5	10	50	7	4	3,78	(Li et al. 2002a)
Poliovirus 1	2	1	2	7	20	4,3	(Leifels et al. 2015)
Rotavirus A	2	1	2	7	20	4,9	(Leifels et al. 2015)

2.4.3 L'ozone

L'ozone est une molécule exclusivement composée de trois atomes d'oxygène (O₃) qui possède la capacité de se solubiliser partiellement dans l'eau. L'utilisation de cette molécule comme traitement de désinfection est considérée comme étant plus efficace qu'un traitement basé sur une chloration. En effet, l'ozonation s'est avérée efficace contre un spectre de micro-organismes beaucoup plus large que la plupart des traitements de désinfection (Am Water Works Res et al. 1991). L'ozone en solution va avoir tendance à se décomposer pour former différents radicaux libres qui sont l'hydroperoxyl (-HO₂), le superoxyde (-O₂) et l'hydroxyl (-OH) qui possèdent des capacités d'oxydation plus ou moins importantes. En effet, l'hydroxyl est le radical libre responsable de la plus forte réactivité vis-à-vis de la matière organique tandis que les deux autres types de radicaux libres ont un effet moindre. De nombreuses études se sont intéressées à évaluer l'efficacité de l'ozonation sur plusieurs types de virus entériques ou modèles et ainsi d'évaluer leur variabilité de sensibilité à ce type de traitement (Tableau 9). Sobsey et al. (1989) a mis en évidence que globalement la sensibilité à l'ozonation des bactéries, naturellement présentes dans l'eau environnementale, était plus importante que celle de la plupart des virus entériques.

L'inactivation des virus entériques par ozonation s'explique à la fois par une dégradation de leur capside virale et de leur génome. De nombreuses études ont montré que l'ozonation entrainait des dommages au niveau de la capside virale (Vaughn et al. 1990). Cependant en fonction de l'intensité du traitement, ces dommages n'expliquent pas la totalité de l'inactivation des particules virales du fait d'une faible réduction de la capacité de pénétration des particules virales au sein des modèles cellulaires. Ce constat signifie que l'ozone provoque également des dégradations au niveau du génome viral. À titre d'exemple, après un traitement à l'ozone avec une concentration de 0,51 mg/L pendant 2 min sur des poliovirus de type 1, 75% de ces particules virales gardaient leur capacité d'attachement tandis que plus de 90% de ces virus avaient perdu leur caractère infectieux. Les protéines de capsides VP1 et VP2 étaient fortement dégradées par le traitement tandis que la protéine VP4 n'était que très peu affectée (Roy et al. 1981). Afin de démontrer la dégradation des génomes viraux par ozonation, Kim et al. (1980) ont réalisé un traitement à l'ozone sur des génomes encapsidés et sur des génomes libres. L'expérience a révélé une dégradation des génomes dans les deux configurations mais avec un abattement plus important au niveau des génomes encapsidés. Par la suite, il a été démontré que l'action de l'ozone sur les génomes viraux se faisait essentiellement quand l'ozone pénétrait au sein de capside (Roy et al. 1981). L'efficacité du traitement à l'ozone est étroitement liée à la température et au pH de l'eau mais également à la concentration de matières organiques contenues dans l'eau. Ainsi, il a été mis en évidence qu'une augmentation de la température permettait une meilleure efficacité de traitement (Kim et al. 1999). Kim et al. (1998) ont montré que le pH de l'eau influence l'efficacité de traitement et ce constat s'explique par le fait qu'une augmentation du pH de l'eau entraine une diminution de la stabilité de l'ozone. La stabilité optimale de l'ozone est observée à un pH de 5. De plus, la présence de matières organiques dans l'eau limite fortement l'efficacité de ce traitement et nécessite donc des doses supérieures pour un même résultat de désinfection (Emerson et al. 1982).

Tableau 9: Abattements observés suite à un traitement d'ozonation réalisé sur des eaux contenant différents types de virus entériques et modèles (le Ct correspond à la concentration en désinfectant multipliée par le temps de contact).

Virus	Ozone (mg/L)	Temps de contact (en min)	Ct (mg.min/L)	рН	Température (en °C)	Abattement (log ₁₀)	Référence
-------	-----------------	---------------------------------	------------------	----	------------------------	------------------------------------	-----------

AdV 40	0.49	0,25	0,12	7	5	2,63	
		2	0,98			3,28	(Thurston-Enriquez et
	0,30	0,5	0,15			3,04	al. 2005)
		10	3			3,55	
Bactárionhaga	0,37	0,17	0,06	7	5	3,50	(Shin and Sobsey 2003)
MS2	0,60	1	0,6	6,9	22	2,96	(Finch and Fairbairn 1991)
	1	0,25	0,25	7		4,28	
Calicivirus fálin		1,2	1,2		5	> 4,74	(Thurston-Enriquez et
Callervil us Tellin	0,06	0,25	0,02		5	1,85	al. 2005)
		5	0,3			2,77	
MNV-1	1	2	2	7	5	> 2,00	(Lim et al. 2010)
Poliovirus 1	0,37	0 17	0,06	7	5	3,00	(Shin and Sobsey 2003)
	0,28	0,17	0,05	/	20	4,65	(Emerson et al. 1982)
Rotavirus simien SA11	0,1	0,5	0,05	7	4	3	(Vaughn et al. 1987)

2.4.4 La température

L'utilisation de la température comme un traitement d'inactivation microbiologique s'effectue généralement, soit par la pasteurisation soit par la stérilisation (Ramesh 1999). La pasteurisation consiste à détruire l'ensemble des organismes pathogènes tandis que la stérilisation implique l'élimination de l'ensemble des organismes vivants. La congélation (ou surgélation) qui est un moyen fréquemment utilisés pour la conservation des denrées alimentaire ne semble avoir que très peu d'effet sur l'inactivation des particules virales. En effet, une étude a mis en évidence qu'une congélation à une température de 20°C pendant plus de 90 jours n'a quasiment pas affecté les rotavirus et VHA présents au sein des matrices alimentaires (Butot et al. 2008). L'inactivation des virus entériques par traitement thermique est très variable d'un virus entérique à un autre (Tableau 10). L'inactivation des virus entériques liée à la température repose essentiellement sur un mécanisme entrainant une déstructuration de la capside virale. Ainsi, Baert et al. (2008) ont montré qu'un traitement à une température supérieure ou égale à 60°C provoquait une inactivation des MNV-1 qui était essentiellement liée à des changements structuraux au niveau de leur capside. Par la suite, ces résultats ont été confirmés par des expériences menées sur des VLP de NoV qui ont mis en évidence leur résistance jusqu'à une température de 55°C puis au-delà de cette température une déstabilisation des capsides a été constatée avec notamment la perte de leur structure à symétrie icosaédrique. Cependant, une étude a très clairement démontré qu'après une étape d'autoclavage de 18 min à 121°C sur un échantillon de PBS 1x contenant environ 10⁵ AdV 2 ou 10⁶ NoV GII, leurs génomes étaient encore détectés par qPCR ou RT-qPCR avec des amplicons de 96 bp tandis qu'une amplification d'une séquence du génome virale d'environ 2500 bp ne permettait plus leur détection. Cela signifie qu'un traitement thermique est susceptible d'engendrer également des cassures au niveau des génomes viraux (Choi et al. 2014) même si la perte d'infectivité est tout d'abord liée à une désorganisation de la capside virale.

Virus	Température (en °C)	Temps de contact (en min)	Abattement (log ₁₀)	Référence
	45		1,1	
AdV 5	55	10	3	(Leifels et al. 2015)
	65		5,7	
VHA	70	4	> 6	(Parry and Mortimer 1984)
Calicivirus félin	50	15	1	(Buckow et al. 2008)
NANI\/ 1	70	1	1,34	(Loo at al. 2015)
	75	1	3,71	(Lee et al. 2015)
	45		2	
Poliovirus 1	55	10	2,9	(Leifels et al. 2015)
	65		6,9	
	45		0,7	
Rotavirus A	55	10	3	(Leifels et al. 2015)
	65		4,2	

Tableau 10: Inactivation des virus entériques et modèles par un traitement thermique.

2.5 Les épidémies virales de gastroentérites d'origine hydrique

2.5.1 Généralités

Les épidémies virales d'origine hydrique sont soit directement liées à l'eau, par contacts avec des eaux récréatives contaminées ou par la consommation d'eau potable ou d'eau issue de puits dont les sources étaient contaminées, soit indirectement liées à l'eau via l'irrigation de cultures maraîchères ou de sites de conchyliculture. Ces épidémies de gastroentérite d'origine virale liées à la consommation d'eau ne sont pas évidentes à mettre en évidence. En effet, le temps d'incubation peut prendre plusieurs jours voire plusieurs semaines avant l'apparition des premiers signes cliniques et l'épisode de contamination peut avoir lieu à distance de son domicile. Dans ce cas, l'identification de la source de contamination peut s'avérer difficile. De plus, les doses infectieuses sont relativement faibles et la détection de faibles quantités de particules virales à l'origine de la contamination n'est pas aisée. Par conséquent, il est très probable que le nombre d'épidémies répertoriées soient fortement sous-estimés, d'autant plus que les signes cliniques observés n'entraînent pas systématiquement de consultations médicales. Entre 1990 et 2004, au moins 86 cas d'épidémies de gastroentérites liées à la consommation d'eau potable ont pu être recensés au sein de l'Union européenne (Risebro and Hunter 2007). Aux Etats-Unis se sont plus de 780 cas qui ont été répertoriés entre 1971 et 2006 (Craun et al. 2010). Pour beaucoup de ces épidémies, l'identification du ou des agents pathogènes responsables n'a pas pu aboutir mais certaines études ont pu mettre en évidence le ou les virus entériques responsables (Tableau 11).

2.5.2 Origines de la contamination

Parmi l'ensemble des études scientifiques répertoriant les cas d'épidémies de gastroentérites virales d'origine hydrique, entre les années 2000 et 2004, la plupart étaient liées à des événements de baignade en piscine dont l'eau était contaminée. Il s'agit de la seconde cause de transmission hydrique répertoriée entre 2000 et 2012 expliquant l'apparition d'épidémies de gastroentérites chez l'Homme (Figure 22). Ces infections liées à la présence de virus entériques dans les eaux de piscines sont principalement expliquées par des manquements au niveau des contrôles d'hygiène traditionnels qui se traduisent généralement par un taux de chloration inadapté pour l'inactivation virale. Il existe également des cas d'épidémies de gastroentérites liés à une baignade dans des cours d'eau ou des lacs. Ainsi, en Italie plus de 300 cas de gastroentérites ont été répertoriés à la suite de baignades dans un lac artificiel alimenté par une rivière (Di Bartolo et al. 2015). À partir de 2005, les cas répertoriés de contamination par des virus entériques sont principalement liés à l'ingestion d'eau, destinée à la consommation humaine, contaminée à la fois dans les pays développés et en voie de développement. Ce type d'eau est considéré comme le principal vecteur d'épidémies de gastroentérites humaines d'origines hydriques (Figure 22). Plusieurs explications peuvent être trouvées pour ces cas de contamination par des virus entériques (Figure 22). Plusieurs explication avancée, est une défaillance au niveau des traitements de désinfection

appliqués au sein des usines de traitement des eaux. La seconde est quant à elle liée à des problèmes au niveau du réseau de distribution de l'eau potable qui se voit contaminé par l'environnement ou par le réseau d'évacuation des eaux usées du fait de défaut de raccordement ou d'interconnexion des réseaux. Une contamination virale importante mais ponctuelle de la source de captage peut être également une explication, exposant ainsi les usines de traitement des eaux à des charges virales qu'elles ne seraient pas en mesure d'abattre suffisamment.

2.5.3 Principaux virus entériques impliqués

Les NoV sont les virus entériques les plus impliqués dans des cas de gastroentérites liés à une transmission hydrique (Figure 22). Cela pourrait être dû à leur faible dose infectieuse, leur persistance importante dans différentes matrices hydriques mais aussi aux traitements de désinfection mis en place au sein des usines de potabilisation. Les VHA et VHE sont également à l'origine de nombreuses épidémies liées à l'ingestion d'eau destinée à la consommation humaine mais principalement dans les pays en voie de développement présentant une forte séroprévalence au sein de leur population (Figure 18 et Figure 15). Quelques cas d'épidémies liés à la présence de plusieurs virus entériques ont pu être identifiés tels que l'épidémie ayant eu lieu en 2008 dans la capitale du Monténégro où plus de 1699 cas ont été clairement identifiés sur une population globale d'environ 136000 habitants. L'analyse virale de l'eau potable desservie indiquait la présence de RV-A, d'AdV et de NoV. L'origine de cet incident est liée à une défaillance du traitement principal de désinfection, la chloration, au sein de l'usine de potabilisation.

Année	Localisation	Source	Virus impliqué	Référence
2000	Australie	Piscine	AdV	(Dick et al. 2001)
2000	Italie	Piscine	Echovirus	(Manzara et al. 2002)
2000	Italie	Eau potable	NoV	(Boccia et al. 2002)
2000	Albanie	Eau potable	Rotavirus, HAstV, AdV et NoV	(Villena et al. 2003)
2001	Afrique du sud	Piscine	Echovirus	(Yeats et al. 2005)
2001	Allemagne	Piscine	Echovirus	(Hauri et al. 2005)
2001	Finlande	Piscine	NoV et HAstV	(Maunula et al. 2004)
2001	Minnesota	Lac	NoV	(Yoder et al. 2004)

Tableau 11: Cas d'épidémies de gastroentérites d'origine virale répertoriés dans la littérature scientifique récente (entre 2000 et 2012), d'après les données d'Hamza et al. (2011) et Sinclair et al. (2009) complétées.

2001	Wyoming	Eau potable	NoV	(Anderson et al. 2003)
2002	Pays-Bas	Eau potable	NoV	(Hoebe et al. 2004)
2002	Arizona	Rivière	NoV	(Jones et al. 2009)
2002	Minnesota	Piscine	NoV	(Yoder et al. 2004)
2002	Minnesota	Lac	NoV	(Yoder et al. 2004)
2002	Wisconsin	Piscine	NoV	(Yoder et al. 2004)
2002	Wisconsin	Lac	NoV	(Yoder et al. 2004)
2002	Albanie	Eau potable	Rotavirus, HAstV, AdV, NoV et VHA	(Divizia et al. 2004)
2003	Connecticut	Piscine	Echovirus	(Yoder et al. 2004)
2004	Mexico	Eau de mer	Coxsackievirus et Echovirus	(Begier et al. 2008)
2004	Vermont	Piscine	NoV	(Podewils et al. 2007)
2004	Suède	Lac	NoV	(Sartorius et al. 2007)
2004	Inde	Eau potable	VHE	(Swain et al. 2010)
2005	Minnesota	Lac	NoV	(Yoder et al. 2004)
2005	Inde	Eau potable	VHE	(Sarguna et al. 2007)
2005	Brésil	Eau potable	Rotavirus	(Siqueira et al. 2010)
2005	Iraq	Eau potable	VHE	(Al Nasrawi et al. 2010)
2005	Turquie	Eau potable	Rotavirus A	(Koroglu et al. 2011)
2006	Wisconsin	Piscine	NoV	(Yoder et al. 2004)
2006	Floride	Lac	NoV	(Yoder et al. 2004)
2006	Nouvelle-Zélande	Eau potable	NoV	(Tallon et al. 2008)
2006	Chine	Eau de puit	VHA	(Zhang et al. 2009a)
2006	Caroline du nord	Eau embouteillée	VHA	(Prinja et al. 2008)
2006	Inde	Eau potable	VHE	(Cao et al. 2009)
2006	Chine	Eau potable	VHA	(Cao et al. 2009)
2007	Corée	Eau potable	VHA	(Lee et al. 2008)
2007	Belgique	Eau potable	NoV	(ter Waarbeek et al. 2010)
2007	Finlande	Eau potable	NoV, HAstV, rotavirus, EV et AdV	(Maunula et al. 2009)
2007	Finlande	Eau potable	Rotavirus, NoV, virus Aichi, AdV	(Räsänen et al. 2010)
2008	Suède	Eau potable	Novovirus, sapovirus, rotavirus et AdV	(Nenonen et al. 2012)

2008	Monténégro	Eau potable	NoV, rotavirus et AdV	(Werber et al. 2009)
2008	Corée du sud	Eau de puit	NoV	(Koh et al. 2011)
2008	Suisse	Eau potable	NoV	(Breitenmoser et al. 2011)
2009	Chine	Eau de puit	NoV	(Zhou et al. 2012)
2009	Suède	Eau potable	NoV	(Riera-Montes et al. 2011)
2009	Italie	Eau potable	NoV, HAstV, EV et rotavirus	(Scarcella et al. 2009)
2009	Chine	Eau potable	NoV	(Li et al. 2013)
2010	Belgique	Eau potable	NoV et rotavirus	(Braeye et al. 2015)
2010	Bangladesh	Eau potable	VHE	(Haque et al. 2015)
2010	Chine	Eau embouteillée	NoV	(Shen et al. 2011)
2010	Slovénie	Eau potable	NoV et rotavirus	(Učakar et al. 2012)
2011	Italie	Eau potable	NoV	(Giammanco et al. 2014)
2011	Italie	Rivière	NoV	(Di Bartolo et al. 2015)
2012	Chine	Eau potable	Echovirus	(Lu et al. 2012)
2012	Turquie	Eau potable	NoV, HAstV et rotavirus	(Sezen et al. 2015)
2012	Nouvelle-Zélande	Eau potable	NoV	(Jack et al. 2013)
2012	France	Eau potable	NoV	(Mouly D 2013)
2012	Grèce	Eau potable	Rotavirus	(Mellou et al. 2014)
2012	Danemark	Eau potable	NoV	(van Alphen et al. 2014)



Figure 22 : Types d'eau (A) et virus entériques (B) impliqués dans les épidémies de gastroentérites humaines répertoriés entre 2000 et 2012 provenant du Tableau 11.

2.5.4 Conclusion

Les traitements de désinfection mais également les conditions environnementales ont des effets très différents d'un type de virus à un autre. En effet quand certains virus présentent une forte résistance à un traitement, d'autres y sont extrêmement sensibles. L'ensemble des conditions environnementales vont donc établir une pression de sélection qui pourrait faire émerger des types viraux préférentiellement transmis par la contamination d'aliments ou d'eaux contaminés, différents de ceux transmis par voie directe. L'absence de modèle cellulaire permettant la mise en culture des NoV limite fortement l'étude de leur persistance dans l'environnement. Cependant, le fait que les NoV soient les principaux responsables d'épidémies virales de gastroentérites d'origine hydrique, et notamment par le biais de la consommation d'eau potable, pourrait s'expliquer par une persistance de leur infectivité plus importante que la plupart des autres virus entériques dans l'environnement hydrique et face aux traitements de désinfection.

3 Les outils d'analyse utilisés dans l'environnement

3.1 Méthodes de concentration des virus entériques

Hormis pour certains types d'eaux tels que les eaux usées et les effluents de STEP, les charges virales relativement faibles des milieux hydriques limitent fortement la recherche directe des virus entériques. Il est donc tout d'abord nécessaire de passer par plusieurs étapes de concentration afin de permettre leur analyse. L'élaboration de ces méthodes de concentration virale repose principalement sur l'utilisation de deux caractéristiques des virus entériques à savoir leur poids moléculaire, en fonction duquel ils pourront sédimenter par centrifugation, mais aussi en fonction de la charge électrique de leur capside qui varie selon le pH des matrices analysées (Tableau 12). Le choix d'une méthode de concentration s'effectue en fonction de la charge virale attendue dans l'échantillon et donc par extension du volume d'eau nécessaire à filtrer pour rendre l'analyse pertinente, de la nature de la matrice à analyser mais aussi du type de virus recherché. De plus, cette méthode de
concentration doit pouvoir répondre aux contraintes liées au nombre d'échantillons à traiter signifiant ainsi que la durée du protocole mais aussi son coût doivent également être pris en compte.

Virus	Point isoélectrique	Référence
HAdV 5	4,5	(Trilisky and Lenhoff 2007)
Bactériophage MS2	3,9	(Nasser et al. 1992)
Coxsackievirus A21	4,8 et 6,1	(Murray and Parks 1980)
Coxsackievirus B5	4,75 et 6,75	(Butler et al. 1985)
Echovirus 1	5,1 et 5,6	(Murray and Parks 1980)
NoV GI	5,9	(Goodridge et al. 2004)
NoV GII	5,9	(Goodridge et al. 2004)
Poliovirus 1	4 et 7,4	(Nasser et al. 1992)
Poliovirus 2	4,5 et 6,5	(Murray and Parks 1980)
Rotavirus simien SA11	8	(Butler et al. 1985)
VHA	2,8	(Nasser et al. 1992)

Tableau 12: Points isoélectriques déterminés expérimentalement pour certains virus entériques ou modèles d'après (Michen and Graule 2010).

3.1.1 Méthodes de concentrations basées sur le poids moléculaire des virus entériques

3.1.1.1 Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation d'échantillons d'eau contenant des virus entériques doit être menée au moins à 100 000×g pendant 1 heure (Prata et al. 2012, Rueckert and Pallansch 1981) (). Il en résulte un culot contenant notamment les particules virales mais également de nombreux

autres composants qui étaient initialement présents au sein de l'échantillon. C'est pourquoi, il est en règle générale conseillé de procéder à des filtrations préalables (Ammersbach and Bienzle 2011, Schultz et al. 2011) ou une bien une étape de clarification par centrifugation (3000-12000×*g* pendant 10-15min) (Fumian et al. 2010, Nordgren et al. 2009) afin d'exclure le maximum de composants ne présentant aucun intérêt dans la poursuite de l'analyse voire même la perturberait. L'ajout d'un coussin de sucrose à 40% (Croxson and Bellamy 1981, Hurwitz et al. 2013) ou de chlorure de césium (CsCl) (Lindner et al. 2008, Matsui et al. 1991), pouvant être sous forme d'un gradient de différentes densités (Figure 23), vise à limiter l'altération des capsides virales durant ce processus (Han et al. 2005) mais également à purifier le concentrat de virus (Ammersbach and Bienzle 2011). L'ultracentrifugation présente les avantages d'engendrer peu de frais en consommables, de ne demander aucun ajustement de pH de l'échantillon (Prata et al. 2012) et de ne pas nécessiter d'étape d'élution (Fumian et al. 2010). De plus, l'ultracentrifugation requiert moins de temps qu'une étape de floculation organique et évite l'introduction de nouvel inhibiteur de PCR tel que l'extrait de bœuf (Prata et al. 2012). Le principal inconvénient de cette méthode réside dans le fait que seuls des échantillons de faible volume (d'environ 10mL à 50mL) peuvent être concentrés (Fumian et al. 2010, Prata et al. 2012). Par conséquent, cette méthode est soit utilisée pour concentrer des échantillons d'eau présentant une forte charge virale tels les effluents de STEP ou les eaux usées (Fumian et al. 2010, Nordgren et al. 2009, Prata et al. 2012), soit pour effectuer une concentration secondaire (Schultz et al. 2011).

Virus	Coefficient de sédimentation (S)	Densité dans CsCl (g/cm³)	Référence
Bactériophage ms2	81	1,38	(Möller 1964)
Calicivirus félin (FCV)	204	1,36 à 1,39	(Saif and Thiel 1989)
Coronavirus	300 à 500	1,23 à 1,24	(Sobsey and Meschke 2003)
Echovirus 6	150 à 160	1,32 à 1,35	(Sobsey and Meschke 2003)
Parvovirus	110 à 125	1,39 à 1,42	(Saif and Thiel 1989)

Rotavirus simien (SA-11) 520 à 530





3.1.1.2 Ultrafiltration tangentielle

Le principe de l'ultrafiltration tangentielle est basé sur l'utilisation d'une membrane au niveau de laquelle circule un flux tangentiel limitant ainsi le colmatage de la membrane (Figure 24). Cette membrane présente des pores retenant l'ensemble des particules supérieures à leur diamètre dans ce qui est appelé le rétentat (pouvant être aussi appelé concentrat) tandis que les particules plus petites sont entrainées dans le perméat (pouvant être aussi appelé filtrat). Cependant, la durée de filtration peut être relativement longue et l'apparition d'un « gâteau » de colmatage peut se faire rapidement en fonction de la nature de l'eau analysée (Olszewski et al. 2005) ce qui est susceptible de rendre difficile la récupération des virus qui y sont piégés. L'utilisation de membrane présentant une plus grande surface de filtration peut permettre de limiter ces deux contraintes (Fernandez et al. 2012, Grassi et al. 2010, Rajal et al. 2007). Il existe deux grands types de systèmes permettant la filtration tangentielle qui sont les filtres en cassette (également appelé en feuilles parallèles) et les filtres en fibres creuses. Les fibres creuses présentent l'avantage de proposer une surface de filtration plus importante pour un système de taille équivalente mais également la possibilité d'obtenir un flux uniforme au niveau de la surface filtrante contrairement aux filtres en cassette qui présentent des espaces morts. Les membranes filtrantes de ces systèmes peuvent généralement être régénérées par un traitement à l'aide d'une solution d'acide phosporique (H₃PO₄), nitrique (HNO₃) ou chlorydrique (HCl) à 0,1 M suivi d'une étape de lavage puis de conservation dans une solution de soude (NaOH) à 0,1 M. Avant et pendant l'utilisation du système, la perméabilité de la membrane filtrante doit être évaluée afin de valider la bonne réalisation du processus de filtration.



Figure 24: Schématisation des principes de la filtration tangentielle et de la filtration frontale.

3.1.2 Méthodes de concentrations basées sur la charge électrique de la capside des virus entériques

3.1.2.1 Adsorption-élution

Les méthodes d'absorption-élution sont basées selon le principe suivant : la charge électrique de la capside virale confère aux virus la capacité de s'accrocher à différents types de supports duquel ils pourront être décrochés par une étape d'élution. Il existe une multitude de

supports permettant cet accrochage mais à l'heure actuelle deux types sont principalement utilisés : les filtres électronégatifs et les filtres électropositifs. Les principaux types de filtres utilisés sont référencés dans le Tableau 14.

Les filtres chargés négativement sont pertinents à conditions que les virus soient chargés positivement. Pour générer de telles conditions, le pH de l'eau doit être acide (Figure 25). Quand le pH de l'eau est inférieur au pHi des protéines composant la capside virale, les virus ont une charge électrique globale positive. C'est pourquoi une acidification de l'échantillon à un pH compris entre 3 et 3,5 (Sobsey et al. 1973, Wallis and Melnick 1967) ainsi qu'un ajout de sels cationiques (MgCl₂ ou AlCl₃) doivent être réalisés avant l'étape de filtration (Haramoto et al. 2004, Katayama et al. 2002, Lukasik et al. 2000). La nécessité d'acidifier l'échantillon devient très contraignante pour des échantillons de grands volumes. Ce moyen de concentration est encore actuellement utilisé pour concentrer des échantillons d'eau de mer ou des eaux contenant beaucoup de matières organiques telles que les eaux usées ou effluents de STEP (Gerba et al. 1978, Katayama et al. 2008, Katayama et al. 2002). Par la suite, l'élution sera réalisée avec une solution d'élution basique (Figure 26).

Le développement de filtres électropositifs à des pH neutres, plus proche des pH environnementaux, a permis de mettre fin à cette contrainte de prétraitement de l'échantillon d'eau (Figure 25). Cela permet ainsi l'adsorption directe des virus dans la plupart des types d'eau rencontrés : eau potable (Ikner et al. 2011, Karim et al. 2009, Sobsey and Jones 1979), eau de mer (Gibbons et al. 2010) eau de rivière (Karim et al. 2009), eaux usées (Grøndahl-Rosado et al. 2014). L'élution des virus se fait ensuite à l'aide d'une solution basique. Cependant la plupart des types de filtres électropositifs ne sont pas adaptés à l'analyse de l'eau de mer et de l'eau ayant un pH supérieur à 9. En effet, pour des valeurs de pH allant au-delà de 9, la plupart des membranes électropositives perdent leur capacité d'adsorption du fait d'un changement de charge ne permettant plus l'adhésion des particules virales (Figure 26). Parmi l'ensemble des filtres électropositifs présents sur le marché, le Virosorb 1MDS reste celui le plus largement utilisé suivi par les filtres Nanoceram proposés dans la méthode 1615 de l'USEPA (United states environmental protection agency) qui est un des rares filtres chargés électropositivement à permettre une concentration efficace des échantillons d'eau de mer (Gibbons 2008, Gibbons et al. 2010).

Une multitude de solutions d'élution ont été développées depuis l'utilisation de filtres absorbants dans le but de rompre les interactions électrostatiques, les forces de van der Waals et les interactions hydrophobes qui se sont formées lors de l'étape d'absorption que ce soit sur un filtre électropositif ou un filtre électronégatif. Les solutions d'élutions les plus communément utilisées dans le cadre d'un protocole de concentration virale d'un échantillon d'eau environnementale sont répertoriées dans le **Tableau 14:** Avantages et inconvénients des principaux filtres électronégatifs et électropositifs (d'après Ikner et al. (2012)). Tableau 15: Avantages et inconvénients des solutions d'élution les plus fréquemment utilisées dans le cadre d'un protocole de concentration virale (d'après Ikner et al. (2012)).

Solutions d'élution	Concentrations	Avantages	Inconvénients	Références
Extrait de bœuf	≤ 1%			(Sobsey and Glass 1980, 1984, Sobsey et al. 1981)
	1,5%	Fonctionne avec divers micro-organismes	Inhibition de PCR	(Karim et al. 2009, Ma et al. 1994a)
	3%	Pas d'effet cytotoxique		(Gibbons et al. 2010, Ikner et al. 2011, Ma et al. 1994a)
		Peu coûteux	Inactivation des virus liée au pH alcalin	(Ikner et al. 2011, Jakubowski et al. 1975, Logan et al. 1980, Sarrette et
Glycine	0,05M		extrême	al. 1977, Sobsey and Glass 1980, Sobsey and Jones 1979, Wallis et al.
		Efficace à faible concentration		1972, Winona et al. 2001)
Extrait de bœuf + Glycine	1,5% + 0,05M	Méthode standardisée		(Bennett et al. 2010, Karim et al. 2009)
	3% + 0,05M	Pas d'effet cytotoxique	Inhibition de PCR	(Gibbons et al. 2010, Ikner et al. 2011, Lambertini et al. 2008)
Agents chaotropiques	-	Réduction des interactions hydrophobes	Effets cytotoxiques sur culture cellulaire	(Rajal et al. 2007, Smith and Hill 2009)
Polyphosphate de - Casse les agrégats de virus organismes forte concentration toxique pour bactéries	(Hill et al. 2005, Ikner et al. 2011, Polaczyk et al. 2008)			
Hydroxyde de sodium	-	Pas d'inhibition de PCR Utilisable avec les filtres électronégatifs	Peu d'études sur la validité avec des filtres électropositifs	(Futch et al. 2010, Haramoto et al. 2004, Haramoto et al. 2009, Hsu et al. 2007, Katayama et al. 2002, Kitajima et al. 2009, Victoria et al. 2014a)



Figure 25 : Schématisation du principe de l'étape d'adsorption de particules virales sur des filtres électrochargés (
particule virale ;
positives sont représentées par un + et les charges négatives par un -).



Figure 26: Schématisation du principe de l'étape d'élution de particules virales adsorbées sur des filtres électrochargés (particule virale ; ______ sens de la filtration ; les charges positives sont représentées par un + et les charges négatives par un -).

Etude bibliographique

	Avantages	Inconvénients	Principaux filtres utilisés (composition)	Références
.y.	Peu coûteux	Prétraitement de l'échantillon :	Membrane Millipore HA (nitrate de cellulose)	(Hsu et al. 2007, Jakubowski et al. 1975, Katayama et al. 2002, Metcalf 1961, Rao and Labzoffsky 1969, Wallis and Melnick 1967)
négatil		-acidification (pH à 3,5)	Filtre Cox-disk (fibre de verre-amiante époxy)	(Jakubowski et al. 1975, Sobsey et al. 1980)
es électro	Grande variété de supports (disque, cartouche, bobine)	-ajout de sels multivalents (MgCl₂ ou AlCL₃)	Cartouche filtrante à plis (fibre de verre époxy)	(Farrah et al. 1976, Jakubowski et al. 1975, Lukasik et al. 2000, Payment et al. 1976)
Filt	Adaptés pour les échantillons d'eau de mer	Efficacité très variable en fonction de l'évolution saisonnière de la qualité de l'eau (exemples : variation des concentrations d'acides burgiques et fubliques)	Filtre en bobine de fibres de verre	(Payment and Trudel 1979, 1988)
		numiques et fuiviques)	Colonne de poudre de verre	(Menut et al. 1993, Payment and Trudel 1979, Sarrette et al. 1977)
		La plupart ne sont pas adaptés aux échantillons d'eau de mer	Disque filtrant Seitz de rang S (amiante- cellulose)	(Sobsey and Jones 1979)
ositifs	Pas de prétraitement de l'échantillon nécessaire	Certains systèmes peuvent être coûteux	Laine de verre sodocalcique	(Albinana-Gimenez et al. 2009a, Gantzer et al. 1997, Gassilloud et al. 2003, Lambertini et al. 2008, van Zyl et al. 2004, Vilaginès et al. 1993)
es électrop	Méthode standardisée (USEPA)	Efficacité très variable en fonction de l'évolution saisonnière de la qualité de l'eau mais moins qu'avec les filtres électronégatifs	Virosorb 1MDS (verre-cellulose)	(Melnick et al. 1984, Rose et al. 1984, Sobsey and Glass 1980, Sobsey et al. 1981)
iltre		Globalement une faible durée de conservation		
-	Absorption des virus dans des échantillons avec un spectre plus large de pH (6,5-8) filtres électropositifs	Spectre de pH d'absorption variable d'une marque de filtre à une autre	Argonide Nanoceram Virus sampler (nano fibres d'alumine)	(Bennett et al. 2010, Ikner et al. 2011, Karim et al. 2009, Lee et al. 2011a, Lee et al. 2011b)

Tableau 14: Avantages et inconvénients des principaux filtres électronégatifs et électropositifs (d'après Ikner et al. (2012)).

Solutions d'élution	Concentrations	Avantages	Inconvénients	Références
Extrait de bœuf	≤ 1%			(Sobsey and Glass 1980, 1984, Sobsey et al. 1981)
	1,5%	Fonctionne avec divers micro-organismes	Inhibition de PCR	(Karim et al. 2009, Ma et al. 1994a)
	3%	Pas d'effet cytotoxique		(Gibbons et al. 2010, Ikner et al. 2011, Ma et al. 1994a)
		Peu coûteux	Inactivation des virus liée au pH alcalin	(Ikner et al. 2011, Jakubowski et al. 1975, Logan et al. 1980, Sarrette et
Glycine	0,05M		extrême	al. 1977, Sobsey and Glass 1980, Sobsey and Jones 1979, Wallis et al.
		Efficace à faible concentration		1972, Winona et al. 2001)
1,5% + 0,05MMéthode standardiséeExtrait de bœuf +GlycineInhibition de3% + 0,05MPas d'effet cytotoxique		(Bennett et al. 2010, Karim et al. 2009)		
	3% + 0,05M	Pas d'effet cytotoxique	Inhibition de PCR	(Gibbons et al. 2010, Ikner et al. 2011, Lambertini et al. 2008)
Agents chaotropiques	-	Réduction des interactions hydrophobes	Effets cytotoxiques sur culture cellulaire	(Rajal et al. 2007, Smith and Hill 2009)
Polyphosphate de			Pour une concentration de divers micro-	
sodium	-	Casse les agrégats de virus	organismes forte concentration toxique	(Hill et al. 2005, Ikner et al. 2011, Polaczyk et al. 2008)
			pour bactéries	
		Pas d'inhibition de PCR	Peu d'átudes sur la validitá avec des filtres	(Futch et al. 2010, Haramoto et al. 2004, Haramoto et al. 2009, Hsu et
Hydroxyde de sodium	-	Litilicable avec les filtres électronégatifs	électropositifs	al. 2007, Katayama et al. 2002, Kitajima et al. 2009, Victoria et al.
		othisable avec les filles electrollegatils	electropositils	2014a)

Tableau 15: Avantages et inconvénients des solutions d'élution les plus fréquemment utilisées dans le cadre d'un protocole de concentration virale (d'après Ikner et al. (2012)).

3.1.2.2 Floculation organique et précipitation

La concentration virale par floculation organique est une méthode basée sur la capacité des protéines d'une solution à floculer (formation de flocs) à pH acide. Interagissant en solution avec les particules virales, celles-ci se retrouvent associées aux flocs, facilitant ainsi leur sédimentation à basse vitesse. L'acidification à un pH de 3,5 d'une solution contenant 3% extrait de bœuf (source protéique) permet la floculation organique en 30 à 45 min sous agitation lente à l'aide d'un barreau aimanté. La nature de la solution d'extrait de bœuf peut avoir un réel impact sur l'efficacité de cette méthode, d'autant qu'il existe aujourd'hui des solutions non floculantes (Hurst et al. 1984). Calgua et al. (2008) ont proposé une alternative à l'extrait de bœuf consistant en une réaction de floculation organique de 8h basée sur l'utilisation d'une solution contenant de la poudre de lait écrémé à une concentration finale de 0,01% dans l'échantillon d'eau qui a été préalablement ajusté à un pH de 3,5. Plusieurs études ont utilisé le principe de floculation organique avec de la poudre de lait écrémé pour l'analyse virale de différents types d'eau (Bofill-Mas et al. 2011, Calgua et al. 2013a, Victoria et al. 2014a). Il existe également une méthode de précipitation protéique basée sur l'utilisation de polyéthylèneglycol (PEG) qui permet de précipiter les virus à pH neutre. En effet, le PEG possède des propriétés entrainant une diminution de la solubilité des protéines dans l'eau. Cette précipitation est généralement effectuée à l'aide de PEG 6000 (Lewis and Metcalf 1988) ou de PEG 8000 (Dong et al. 2010, Karamoko et al. 2005). El-Senousy et al. (2014) ont mis en évidence le fait que la précipitation au PEG permet une meilleure récupération que la floculation organique avec de l'extrait de bœuf quel que soit le type d'eau dans leurs conditions expérimentales.

Quelle que soit la méthode de floculation organique ou de précipitation utilisée, elle est suivie par une étape de centrifugation ($3000 \times g$ pendant 15-20 min) permettant la sédimentation des flocs. Le culot obtenu est ensuite resuspendu à l'aide d'une solution saline à pH 7,5.

Le principal problème de ces méthodes de concentration, basée sur l'ajout d'une solution, réside dans le fait que certains composants de ces solutions, tels que l'extrait de bœuf, vont être susceptibles d'inhiber les étapes d'extraction et d'amplification génomique (Arbeli and Fuentes 2007, Schrader et al. 2012). Ces étapes de concentration sont généralement combinées aboutissant à des protocoles de concentration de particules virales appliquant deux voire trois étapes de concentration successives (Cashdollar et al. 2013, McMinn and Korajkic 2015).

3.1.3 Méthodes de détection des virus entériques

Une fois les échantillons environnementaux concentrés, la détection des virus entériques repose principalement sur deux principes : la détection des virus infectieux par inoculation sur des cellules en culture ou la détection des génomes viraux par biologie moléculaire (Figure 27). La détection des antigènes par des techniques d'immunofluorescence ou immunoenzymatiques, très fréquemment utilisées pour des diagnostics cliniques, le sont très peu dans l'environnement. Cela s'explique essentiellement par leur manque de sensibilité analytique ().



Figure 27: Approches techniques les plus communément utilisées pour évaluer la quantité de particules virales dans des échantillons d'eau environnementaux (Hamza et al. 2011b).

84

3.1.3.3 Méthodes de détection virale par culture cellulaire

L'infectivité virale peut être définie comme la capacité d'une particule virale à pouvoir entrer dans une cellule hôte afin d'utiliser sa machinerie cellulaire pour produire de nouvelles particules virales. Les méthodes de référence (exemple de la norme entérovirus XP T90-451 Mars 1996) de détection de particules reposent sur l'utilisation de la culture cellulaire. En effet, il s'agit actuellement du seul moyen technique, hormis l'infection de l'hôte naturel luimême, permettant d'obtenir une information concernant le caractère infectieux des virus présents dans l'échantillon analysé.

3.1.3.3.1 Décontamination des échantillons environnementaux

Les échantillons issus de l'environnement sont susceptibles de contenir de multiples autres composés, tels que des micro-organismes (champignons et bactéries) ou des métaux lourds, pouvant être toxiques en culture cellulaire. C'est pourquoi différentes étapes de détoxification sont donc généralement mises en place. La décontamination des microorganismes est généralement réalisée par filtration sur des membranes de porosités 0,22 μm. En fonction de la nature de l'eau analysée et pour éviter les phénomènes de colmatage, il peut être nécessaire au préalable de passer par des filtrations avec des membranes à porosités plus importantes dans un premier temps ou par une étape de clarification par centrifugation à $8500 \times g$ pendant 15 min. Il est essentiel d'utiliser des membranes sur lesquelles les particules virales ne peuvent pas s'adsorber. Cette étape de filtration peut être compléter par un traitement aux antibiotiques et aux antifongiques (Bozkurt et al. 2014, Flynn and Saif 1988). Néanmoins, l'antibiorésistance développée par certaines souches bactériennes rend cette étape de décontamination moins pertinente, c'est pourquoi un traitement au chloroforme peut aussi être envisagé (Aw et al. 2014). Ce traitement s'effectue par ajout de chloroforme à concentration finale de 30% dans l'échantillon suivi d'une agitation magnétique pour finalement se terminer par une étape de centrifugation à $1500 \times q$ pendant 20 min. La phase aqueuse est ensuite récupérée puis placée à barboter pendant 30 min afin d'en éliminer toutes traces de résidus de chloroforme. Une mauvaise décontamination de l'échantillon conduit généralement vers l'apparition d'effets cytotoxiques invalidant le résultat obtenu étant donné que la dégradation de la culture cellulaire n'est pas liée à la présence de virus infectieux mais à la présence de contaminants.

3.1.3.3.2 Culture cellulaire

La méthode de détection par culture cellulaire va varier en fonction du type de virus analysé. L'inoculation de virus sur des cellules pouvant permettre leur multiplication peut engendrer des changements morphologiques et biochimiques au niveau des cellules infectées. Ces modifications morphologiques sont nommées effets cytopathogènes (ECP). La nature de ces ECP et le temps de leur apparition vont notamment varier en fonction du type de virus analysé, du type de modèle cellulaire utilisé mais aussi de la multiplicité d'infection (MOI). Ainsi, certains virus provoquent de très légers voire aucun ECP.

Pour la plupart des virus entériques, l'incubation peut s'effectuer en milieu liquide ou en milieu gélosé. En milieu gélosé, les nouvelles particules virales produites ne pourront infecter que les cellules adjacentes formant ainsi des plages de lyse circulaires visualisables à l'œil nu au bout d'un certain temps (Dahling and Wright 1986). La quantification des virus s'effectue par un comptage du nombre de plages de lyse dans le tapis cellulaire.

En milieu liquide, les virus nouvellement produits vont pouvoir réinfecter des cellules plus distantes, entrainant donc une dégradation importante voire totale du nombre de cellules en culture. Deux méthodes de quantification peuvent être utilisées pour les virus entrainant des ECP. La première est basée sur la réalisation de dilutions limites permettant de déterminer la TCID₅₀ (Tissue culture infective dose) (Hierholzer and Killington 1996). Il s'agit de réaliser des dilutions en cascade de l'échantillon qui vont ensuite être inoculées sur des cultures cellulaires et d'observer l'apparition d'ECP dans le temps. Ainsi la TCID₅₀ correspond à la dilution la plus importante permettant d'observer 50% des puits de cultures cellulaires qui présentent un ECP. La seconde méthode de quantification est par détermination du nombre de virus le plus probable (NPP) en réalisant également des dilutions en cascade et en rentrant le nombre de puits positifs pour chaque dilution dans un tableau de NPP afin de déterminer statistiquement le nombre de virus (Suttle 1993). On peut toutefois noter que certains virus, pouvant engendrer un ECP en culture cellulaire, peuvent perdre cette caractéristique après un passage dans un environnement hydrique tout en gardant leur capacité à se multiplier en culture cellulaire (SHIEH et al., 1997 ; GRABOW et al., 1993).

La détection de cette réplication virale peut également se faire par des techniques immunoenzymatiques ou de biologie moléculaire. Les techniques d'immunologie sont basées sur la synthèse d'antigènes viraux qui peuvent être détectés à l'aide d'anticorps marqués. La mise en évidence de la réplication virale peut également être menée à l'aide d'outils de biologie moléculaire. Cette technique repose sur le suivi de la multiplication des génomes viraux et porte le nom d'ICC-PCR (Integrated culture cell-PCR) (Reynolds 2004). L'ICC-PCR 86 apporte la sensibilité et la rapidité d'analyse de la biologie moléculaire et permet de mettre en évidence le caractère infectieux des particules virales présentes dans un échantillon. De plus, le passage par une étape de culture virale permet d'augmenter la sensibilité analytique des outils de biologie moléculaire (Reynolds et al. 1996). L'ICC-PCR permet aussi de réduire la durée de culture nécessaire pour mettre en évidence un événement infectieux (Blackmer et al. 2000). Actuellement, l'ICC-PCR a pu être mise en place pour des EV (Reynolds et al. 1996), le VHA (Jiang et al. 2004), des AdV (Lee and Kim 2002) et les HAstV (Grimm et al. 2004). Les outils de biologie moléculaire seront développés dans le paragraphe suivant.

Il existe également des méthodes de co-culture de cellules qui sont basées sur l'utilisation de différents types de cellules permettant la détection de plusieurs genres ou espèces de virus en une seule expérimentation, l'identification des virus incriminés étant réalisé par marquage immunologique (Brumback and Wade 1994). Le principal avantage de travailler avec des cellules en co-culture réside dans le temps d'expérimentation gagné mais cela exige plus de compétences dans la préparation des systèmes de culture cellulaire.

L'une des contraintes majeures est le temps que peut prendre l'infection des cellules en culture, notamment dans le cadre de contrôles sanitaires de denrées alimentaires telles que l'eau potable. Actuellement, aucune lignée cellulaire ne peut permettre la culture de l'ensemble des virus entériques et même de l'ensemble des virus d'une même famille. De plus, l'absence de modèle cellulaire pour la majorité des virus entériques (

Tableau 16) a conduit à développer des méthodes alternatives de détection telles que la détection virale par biologie moléculaire.

Virus	Modèle cellulaire	Référence
AdV	A549, HEK 293, Hep 2, CaCo-2, Graham 293 et PLC/PRF/5, 293A	(Baxter et al. 2007, Grabow et al. 1992, Pinto et al. 1994, Wyn-Jones et al. 2011)
HAstV	CaCo-2 et HEK 293 (+techniques immunologiques)	(Chapron et al. 2000, Herrmann et al. 1988)
EV	BGMK, Vero MA 104, MRC5, PLC/PRF/5, RD, PVK, KB, Hep 2, L20 B, Hela	(Agbalika et al. 1984, Chonmaitree et al. 1988, Grabow et al. 1999, Ni et al. 2015, Tsao et al. 2010, Wood and Hull 1999)
Rotavirus	MA 104 et CaCo-2 (+ techniques immunologiques)	(Pinto et al. 1994, Urasawa et al. 1981)
VHA	FrP3, FRhK4, PLC/PRF/5, Caco-2 et HepG2 (+techniques immunologiques)	(Blank et al. 2000, Croci et al. 1999, Grabow et al. 1983)
		70

Tableau 16: Vi	rus entériques	humains cult	tivables et m	odèles cellu	laires disponibles.
1001000 201 11					

(Okamoto 2011)

3.1.3.4 Méthodes de détection virale par biologie moléculaire

3.1.3.4.1 Décontamination des échantillons environnementaux

Les outils de biologie moléculaire sont très sensibles aux inhibiteurs naturellement présents au sein des échantillons d'eau environnementaux (tels les acides humiques et fulviques, les métaux lourds, ...) (Farrah et al. 1976, Hamza et al. 2009, Hata et al. 2011, Sobsey and Glass 1984) mais également aux inhibiteurs susceptibles d'être apportés par le protocole de concentration tels que l'extrait de bœuf, c'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser une méthode de concentration de l'échantillon favorisant leur élimination de la fraction analysée. L'ajout d'albumine de sérum bovin (BSA) ou/et de la protéine 32 du gène T4 (gp32) permet de fortement limiter l'inhibition (Kreader 1996, Villalva et al. 2001). Un suivi de l'inhibition au travers de la mise en place d'un contrôle d'amplification par PCR doit être réalisé afin de pouvoir convenablement exploiter les résultats obtenus (Gibson and Schwab 2011, Gregory et al. 2006, Hata et al. 2011, Honjo et al. 2010, Zakhour et al. 2010). À l'heure actuelle, quelques études proposent l'utilisation de la PCR digitale (Figure 28) qui pourrait être moins sensible aux inhibiteurs que la qPCR du fait que l'amplification soit fragmentée en plusieurs milliers de nanoréactions indépendantes et la détection réalisée en point final. La quantification se fait par la suite selon le principe du NPP (Dingle et al. 2013).



Figure 28 : Principe de la PCR digitale (d'après Life technologies).

3.1.3.4.2 PCR/RT-PCR

Genre	Espèce	Nombre de génotypes humains	Taille capside (nm)	Taille génome (pb)	Type de génome	
stadenovirus	Adénovirus humains	68	70 à 90	30000 à 38000	ADN db	r
mastrovirus	Astrovirus humains	8	28 à 30	6800 à 7900	ARN sb (+)	
Vorovirus	Norovirus humains	GI (9), GII (19) et GIV (1)	27 à 35	7700	ARN sb (+)	
Sapovirus	Sapovirus humains	GI (7), GII (7), GIV (1) et GV (2)	30 à 38	7700	ARN sb (+)	
hohepevirus	Virus de l'hépatite E	> 4	26 à 34	7200	ARN sb (+)	
Cosavirus	Cosavirus	34	30	7600	ARN sb (+)	
	EV-A	25				
	EV-B	63				m
erovirus (EV)	EV-C	23	22 à 30	7100 à 8900	ARN sb (+)	
	EV-D	5				
epatovirus	Virus de l'hépatite A	3	27	7500	ARN sb (+)	
Kobuvirus	Virus Aichi	3	30	7000 à 8200	ARN sb (+)	
Salivirus	Salivirus	1	30	8000	ARN sb (+)	
Rotavirus	Rotavirus	56 types G et 37 types P	60 à 80	18500	ARN db	

La détection des virus entériques par des techniques de biologie moléculaire est à l'heure actuelle la plus utilisée. En effet, il s'agit de méthodes rapides de détection, d'une haute sensibilité, reproductibles et qui proposent une haute spécificité. Malgré la sensibilité de ces méthodes, il est tout de même nécessaire de passer par des étapes de concentration virale pour la plupart des échantillons d'eau (Richards 1999). Les outils de biologie moléculaire permettent le suivi d'un large spectre de virus entériques quelle que soit la nature de l'eau analysée (Abbaszadegan et al. 1999, Beuret et al. 2002, Choi and Jiang 2005, Grondahl-Rosado et al. 2014, Perez-Mendez et al. 2014, Steyer et al. 2015). La plupart des virus entériques sont des virus à ARN (

Tableau 1), il est donc nécessaire de passer par une étape de transcription inverse au préalable des étapes d'amplification des génomes. La qPCR (quantitative polymerase chain reaction) est un type de PCR permettant de quantifier le nombre de génomes viraux initialement présents dans l'échantillon (Gibson et al. 1996). Cette quantification est

89

généralement basée sur l'utilisation d'un agent intercalant non spécifique appelé SYBR Green (Mukhopadhya et al. 2013, Ye et al. 2012) ou bien des sondes oligonucléotidiques fluorescentes permettant une hybridation spécifique (Calgua et al. 2013c, Miura et al. 2013). Le développement de qPCR multiplex a permis de réduire les temps de manipulation mais également le coût en réactifs (Brittain-Long et al. 2008, Fout et al. 2003).

3.1.3.4.3 Outils de biologie moléculaire alternatifs

Les outils de biologie moléculaire ne fournissent pas d'informations quant au caractère infectieux des particules virales détectées (Richards 1999). Deux stratégies basées sur les outils de biologie moléculaire ont été proposées pour estimer le potentiel infectieux des particules virales : la première repose sur l'évaluation de l'intégrité du génome viral (Li et al. 2004, Ma et al. 1994b, Simonet and Gantzer 2006a) et la seconde repose sur l'évaluation de l'intégrité de la capside virale (Nuanualsuwan and Cliver 2002, 2003).

Un génome viral intact est une condition nécessaire, mais non suffisante, pour que la particule virale puisse être infectieuse. Des travaux ont montré que la région 5'-NTR de certains virus appartenant à la famille des *Picornaviridae* présentait une grande sensibilité à la chloration. Les auteurs proposaient en ce sens que l'amplification spécifique de cette portion pourrait renseigner sur l'intégrité du génome dans le cadre d'une désinfection par chloration (Bhattacharya et al. 2004, Li et al. 2002b, Simonet and Gantzer 2006b). D'une manière générale, la dégradation des acides nucléiques s'illustre par une fragmentation des génomes. Ainsi d'autres études proposent d'amplifier de plus longues séquences génomique ce qui serait plus représentatif des dommages subis au niveau du génome viral qu'une amplification d'un petit fragment (Molenkamp et al. 2007, Rodríguez et al. 2013, Simonet and Gantzer 2006a, b).

Nuanualsuwan et Cliver (2003) ont proposé d'estimer l'infectivité de particules virales par la mise en place d'un protocole visant à déterminer la capacité d'attachement de ces virus à des cellules hôtes à la suite de différents traitements de désinfection. En effet, ils ont démontré que des virus ayant perdu leur capacité d'attachement ne sont plus infectieux. Cette méthode présente une limite identique à celle de la culture cellulaire si ce n'est que l'on dispose de modèles cellulaires permettant l'attachement sans réplication virale, notamment pour les NoV (Nuanualsuwan and Cliver 2003, Straub et al. 2007). Nuanualsuwan et Cliver (2002) ont proposé d'effectuer un prétraitement reposant sur deux réactions enzymatiques successives de protéases et ensuite de nucléases. Cette approche repose sur l'hypothèse

qu'un virus dont la capside est intacte serait moins sensible aux protéases et donc ne permettrait pas l'accès des nucléases à leur génome. D'autres études proposent l'emploi d'agents intercalants tels que l'éthidium monoazide (EMA) ou le propidium monoazide (PMA) afin de discriminer les particules virales dont la capside est intègre de ceux présentant une capside dégradée (Figure 29: Principe d'un traitement à l'aide d'agents intercalants tels que l'EMA ou le PMA afin de distinguer les particules virales intègres des particules virales dégradées et des génomes viraux libres.). Le terme de PCR de viabilité (viability PCR, vPCR) décrivant cette approche est parfois employé dans la littérature, mais beaucoup de précautions doivent être prises quant à l'interprétation de leurs résultats (Coudray-Meunier et al. 2013, Karim et al. 2015, Leifels et al. 2015, Moreno et al. 2015). Ces agents intercalants ont la capacité de s'intercaler au sein des génomes. Leur interaction avec les acides nucléiques est stabilisée par une photoactivation, rendant par la suite impossible leur amplification par PCR. Leur utilisation dans le cadre de l'analyse des virus entériques repose sur l'hypothèse qu'un virus non infectieux possède une capside endommagée rendant ainsi possible l'insertion de l'agent intercalant. Cependant certaines études ont montré qu'en fonction du type de traitement de désinfection employé, les dommages viraux ne sont pas les mêmes. Ainsi des traitements tels que les traitements par l'ozone, le chlore et à haute température affectent directement la capside virale (Karim et al. 2015, Leifels et al. 2015). Par conséquent, l'utilisation d'un prétraitement à l'aide d'agents intercalants pourraient s'avérer pertinents pour l'évaluation des effets de ces traitements spécifiquement. Par contre l'ensemble de ces méthodes reposant sur l'évaluation de l'intégrité de la capside virale se sont avérées peu pertinentes après des traitements aux rayons ultraviolets (UV) ou bien à basse température (inférieure à 37°C) appliqués aux virus. (Karim et al. 2015, Leifels et al. 2015, Nuanualsuwan and Cliver 2003, Wang et al. 1995). L'applicabilité pour l'analyse des virus entériques de ce type de méthodes n'a pour le moment pas été démontrée pour des échantillons environnementaux.

Méthodes	Avantages	Limites	Références
PCR long-template	Facile à mettre en place, révèle la présence de dommages du génome viral	Sensibilité des fragments amplifiés diffère en fonction du traitement de désinfection, infectivité virale pas uniquement liée à l'intégrité du génome viral	(Allain et al. 2006, Li et al. 2002b, Simonet and Gantzer 2006a, b, Wolf et al. 2009)

Tableau 17: Avantages et limites des approches visant à évaluer l'infectivité des particules virales dans l'eau (d'après Hamza et al. (2011) et complété).

ICC-PCR	Plus sensible et rapide que la culture cellulaire seule, moins sujette aux inhibiteurs de PCR	Coûteux, uniquement valable pour les virus cultivables	(Reynolds et al. 1996)
Traitement aux nucléases et protéases	Rapide, peut confirmer la dégradation de la capside virale, ne nécessite pas la mise en culture	Pas utilisable pour des traitements à des températures < 37°C, évaluation de l'intégrité de la capside pour évaluer l'infectivité	(Nuanualsuwan and Cliver 2002, 2003)
Traitement EMA ou PMA	Rapide, pas besoin de culture cellulaire, informe sur l'intégrité de la capside virale	Inhibition de la PCR, évaluation de l'intégrité de la capside pour évaluer l'infectivité	(Graiver et al. 2010, Kim et al. 2011, Parshionikar et al. 2010)
Cytométrie en flux	Rapide, sensible, haut débit, automatisée	Coûteux, uniquement valable pour les virus cultivables	(Abad et al. 1998, Barardi et al. 1998)
Microscopie à fluorescence	Rapide, sensible, permet de suivre en temps réel la réplication	Coûteux, uniquement valable pour les virus cultivables	(Calgua et al. 2011, Hwang et al. 2006, Ridinger et al. 1982, Smith and Gerba 1982, Yeh et al. 2008a, Yeh et al. 2008b)
Séparation des particules virales avec des billes immunomagnétiques	Spécificité, limites les inhibiteurs de PCR	Dépend des caractéristiques antigéniques des virus et donc ne cible pas toutes les souches virales, coûteux	(Casas and Suñén 2002, Gilpatrick et al. 2000, Grinde et al. 1995, Haramoto et al. 2010, Jothikumar et al. 1998, Monceyron and Grinde 1994, Myrmel et al. 2000)
Mesure des groupements carbonés de la capside virale	Sensible, évalue l'infectivité des virus non cultivables	Ne permet pas de révéler la présence de virus infectieux	(Sano et al. 2009)



Figure 29: Principe d'un traitement à l'aide d'agents intercalants tels que l'EMA ou le PMA afin de distinguer les particules virales intègres des particules virales dégradées et des génomes viraux libres.

3.2 Indicateurs de la contamination hydrique par des virus entériques

3.2.1 Généralités

La qualité microbiologique de l'eau est susceptible d'être affectée par la présence de micro-organismes entériques pathogènes pour l'Homme. Le meilleur moyen de suivre la contamination de l'eau par des virus entériques est d'effectuer directement leur recherche et non celle d'un ou plusieurs indicateurs. Pourtant, l'absence de modèle cellulaire pour la plupart des virus entériques et par conséquent l'absence d'information quant au caractère infectieux des particules virales détectées a fortement contribué à la volonté de mettre en place un indicateur. Il existe également les contraintes des méthodes de détection liées à la faible charge de la plupart des virus nécessitant donc une concentration à partir d'importants volumes d'eau. Le coût de la recherche de l'ensemble des cibles virales y contribue également.

Cependant, cet indicateur doit être pertinent et doit donc répondre à plusieurs critères : une excrétion dans les selles d'une majeure partie de la population ; une présence dans tous les types d'eau susceptibles d'être impactés par la contamination fécale (ubiquitaire) ; une persistance dans l'environnement mais également à différents types de traitements qui doit être au moins égale à celle des virus entériques les plus résistants ; une incapacité à se multiplier dans l'eau (en dehors de son hôte) ; une bonne corrélation avec les virus entériques ; une facilité de détection liée à la fois à la quantité présente mais également à la praticité en laboratoire (Armon et Kott, 1996).

3.2.2 Indicateurs bactériens

À l'heure actuelle, la qualité microbiologique de l'eau est essentiellement définie à travers le suivi d'indicateurs bactériens d'origine fécale. Généralement, les principaux indicateurs bactériens fécaux utilisés sont les entérocoques et *Escherichia coli*. Cependant de nombreuses études ont mis en évidence une discordance entre la présence de ces indicateurs fécaux et la présence de différents types de pathogènes humains et plus particulièrement des virus entériques. En effet, aucune corrélation n'a réellement été observée entre la présence de ces indicateurs bactériens et les virus entériques (Horman et al. 2004, Locas et al. 2008). De plus, les virus entériques sont globalement reconnus pour être plus résistants aux contraintes environnementales, qu'elles soient d'origine naturelle ou bien liées à des traitements de désinfection, que ces bactéries d'origine fécale (Payment *et al.*, 1985a; Payment *et al.*, 1985b; Wait et Sobsey, 2001; Fujioka et Yoneyama, 2002). Ces constats ont donc conduit la communauté scientifique à considérer de nouveaux indicateurs susceptibles d'être plus adaptés au suivi de la contamination virale.

3.2.3 Indicateurs viraux

3.2.3.1 Bactériophages

Dès les années 1950, les bactériophages ont été proposés comme indicateurs de la contamination virale de l'eau (Guelin et Gozda Wa-Le Bris, 1952). Ces virus sont des parasites obligatoires de bactéries. Il existe certains groupes de bactériophages dont les hôtes font partie intégrante de la flore intestinale humaine. Par conséquent ils sont excrétés dans les fèces humaines et sont détectables au sein des eaux usées et dans les eaux de surfaces. Trois

groupes de bactériophages sont considérés comme potentiel indicateurs des virus entériques : les phages infectant *Bacteroides*, les coliphages somatiques et les coliphage ARN F spécifique.

3.2.3.1.1 Phages de Bacteroides

Les bactéries appartenant au genre Bacteroides font partie intégrante du microbiote intestinal humain mais aussi animal. Une grande partie des bactéries anaérobies identifiées au sein du tube digestif appartiennent à l'espèce Bacteroides fragilis (Versalovic et al. 2011) suivie de l'espèce Bacteroides thetaiotaomicron. Bien que toutes les bactéries appartenant à ce genre bactérien ne soient pas retrouvées exclusivement chez l'Homme (Puig et al. 1999), certaines ont été identifiées comme étant spécifique à l'Homme (Payan et al. 2005) et d'autres à l'animal (Gómez-Doñate et al. 2011). Ces spécificités d'hôte permettent ainsi de distinguer une contamination d'origine animale de celle d'origine humaine. Ces phages sont fréquemment détectés dans les selles humaines et par extension dans les eaux usées (McMinn et al. 2014, Puig et al. 1999, Sirikanchana et al. 2014). De plus, de nombreuses études mettent en évidence leur détection dans l'eau de mer et de rivières. Ils semblent être plus résistants que la plupart des virus entériques suite à différents traitements de désinfection couramment appliqués au sein des usines de potabilisation (Tartera et al. 1988) (Diston et al. 2014). Néanmoins, tout comme les virus entériques, il est nécessaire de concentrer les échantillons tant leur charge virale est faible dans les eaux de surfaces (Gantzer et al. 2002, Gantzer et al. 1998).

3.2.3.1.2 Coliphages somatiques

Les coliphages somatiques sont des bactériophages capables d'infecter *Escherichia coli*. Ils sont décomposés en 4 familles : les *Myoviridae*, les *Podoviridae* et les *Siphoviridae* qui sont des phages possédant trois queues et un ADN double brin et les *Microviridae* qui ne possèdent qu'une seule queue et un génome à ARN simple brin (Ackermann 2006, Ackermann 2001). Entre 1970 et 1980, des travaux scientifiques suggèrent les coliphages somatiques comme indicateurs des virus entériques au sein des eaux usées et des eaux impactés par les effluents de STEP (Kott 1981, Longley 1978). En effet, les charges virales observées étaient au moins du même ordre de grandeur que celles observées pour les virus entériques et ces virus présentaient des propriétés de persistance dans l'environnement bien plus importantes que celles des virus entériques (Gantzer et al. 1998). Cependant, des études ont fini par mettre en

évidence deux limites majeures quant à leur utilisation. La première provient de leur capacité à se multiplier au sein de nombreux hôtes pouvant être retrouvés dans les environnements hydriques. Cependant, une étude estime cette capacité à se multiplier dans l'environnement comme étant négligeable du fait d'un environnement ne permettant pas réellement une multiplication de leurs hôtes (Jofre 2009). La seconde s'appuie sur des fréquences de détection au sein des eaux usées qui sont très fluctuantes et qui ne corrèlent pas nécessairement avec celles des virus entériques (Nieuwstad et al. 1991, Wommack et al. 1996).

3.2.3.1.3 Les coliphages ARN F-spécifique

Contrairement aux phages précédemment décrits, ils présentent des caractéristiques très proches de la plupart des virus entériques, à savoir un génome à ARN positif simple brin contenu dans une capside icosaédrique de 20 à 30 nm de diamètre. Ils appartiennent à la famille des Leviviridae et sont classés en 4 génogroupes (Bollback and Huelsenbeck 2001). Les génogroupes II and III sont susceptibles d'être retrouvées dans les fèces humaines et donc dans les eaux contaminées par une pollution humaine tandis que les génogroupes I et IV sont généralement liés à une pollution d'origine animale (Cole et al. 2003, Hsu et al. 1995). L'origine de la contamination fécale peut ainsi être évaluée par ce moyen (Haramoto et al. 2015, Yahya et al. 2015). Cependant leur détection par culture est délicate car les récepteurs permettant l'infection de leur hôte (Escherichia coli contenant le plasmide F et exprimant le facteur F) sont exprimés uniquement durant la phase de croissance exponentielle. Pour pallier à cette difficulté, des souches bactériennes modifiées ont été développées mais elles ne sont pas sensibles à l'ensemble des coliphages ARN F-spécifiques. Une fois détecté, une identification des 4 groupes de coliphages ARN F-spécifiques peut être réalisée par sérotypage (Hsu et al. 1995) ou bien par genotypage (Rahman et al. 2009). Plusieurs études ont évalué la charge virale en coliphages ARN F-spécifiques dans les eaux comme étant supérieure à celle des virus entériques (Liang et al. 2015, Ogorzaly and Gantzer 2006, Rezaeinejad et al. 2014). De plus, leur résistance aux traitements de désinfection mais aussi leur persistance dans l'environnement ont été estimées comme proches voire supérieures à celles des virus entériques (Bitton 2010, Gerba et al. 2015, Ogorzaly et al. 2010, Olivieri et al. 1999).

3.2.3.2 Les virus humains

96

Etude bibliographique

3.2.3.2.1 Les Adenovirus

De nombreuses études à travers le monde indiquent les AdV comme l'un des virus entériques les plus abondants et occurrents au sein des effluents de STEP (Grondahl-Rosado et al. 2014, Puig et al. 1994), d'eau de surface (Grondahl-Rosado et al. 2014, Jurzik et al. 2010) mais également d'eau potable(Jacob et al. 2015, Kluge et al. 2014). De plus, les AdV sont connus pour présenter une forte stabilité dans l'environnement (Bofill-Mas et al. 2006, Carratala et al. 2013, Ogorzaly et al. 2010, Rigotto et al. 2011) et une importante résistance aux traitements de désinfection par UV (Beck et al. 2014, Calgua et al. 2014, Leifels et al. 2015, Thompson et al. 2003). Cependant, leur sensibilité aux traitements par chloration est inférieure à celle de nombreux autres virus entériques (Kahler et al. 2010, Leifels et al. 2015). Bofill-Mas et al. (2006) proposent le suivi des AdV associés à celui des polyomavirus comme étant une approche pertinente du suivi de la contamination fécale des eaux (Albinana-Gimenez et al. 2006, Albinana-Gimenez et al. 2009a, Albinana-Gimenez et al. 2009b, Bofill-Mas et al. 2009b, Bofill-Mas et al. 2006, Carducci et al. 2009, Hamza et al. 2011a, Hewitt et al. 2013).

3.2.3.2.2 Les Polyomavirus

La famille des Polyomaviridae comprend 5 polyomavirus humains : BKV (Gardner et al. 1971), JCV (Padgett et al. 1971), KIV (Allander et al. 2007), WUV (Gaynor et al. 2007), et plus récemment, Merkel Cell Polyomavirus (MCV) (Feng et al. 2008). Ce sont des virus à ADN double brin, non-enveloppés et pourvus d'une capside icosaédrique d'un diamètre compris entre 45 et 50 nm. Les BKV et JCV sont reconnus pour leur importante séroprévalence, proche de 80%, au sein de la population mondiale adulte (Flaegstad et al. 1989, Gardner 1973, Kean et al. 2009, Knowles 2006, Padgett and Walker 1973 (Polesel, 2012 #13) }. La primo-infection par BKV et JCV, qui a généralement lieu durant l'enfance, est bien souvent asymptomatique. Par la suite, l'infection devient latente et le virus peut donc persister indéfiniment au sein de l'organisme, principalement au niveau des reins. Les polyomavirus sont alors excrétés en grandes quantités au travers de l'urine et des fèces de façon continue ou occasionnelle en fonction de l'hôte. Leur exclusivité d'hôte associée aux fortes charges virales ayant pu être détectées au sein des effluents de STEP (Di Bonito et al. 2015, Hewitt et al. 2013, Korajkic et al. 2011, McQuaig et al. 2006). Ces virus ont été suggérés par plusieurs études comme étant des indicateurs pertinents de la contamination de l'eau par des virus entériques. Les BKV et JCV ont pu être détectés par biologie moléculaire dans de nombreux échantillons d'eaux usées dans le monde entier (Bofill-Mas et al. 2000, 2001; McQuaig et al. 2009; Kokkinos et al. 2011). Leur détection par biologie moléculaire est aujourd'hui encore considérée comme un 97 indicateur de la contamination fécale dans les STEP, les rivières mais également l'eau potable (Albinana-Gimenez et al. 2006, Albinana-Gimenez et al. 2009a, Albinana-Gimenez et al. 2009b, Bofill-Mas et al. 2006).

3.2.3.3 Autres types de virus

D'autres types de virus tels que le Torque teno virus (TTV)(Griffin et al. 2008), le Pepper mild mottle virus (PMMoV)(Rosario et al. 2009a) mais aussi les *Picobirnavirus* humains (hPBV)(Symonds et al. 2009) ont été observés au sein des fèces humains en quantités non négligeables et donc considérés comme d'éventuels indicateurs de contamination par des virus entériques.

3.2.3.3.1 Les Torque teno virus

Les TTV appartiennent à la famille des *Circocviridae* et sont composés d'un ADN circulaire simple brin de polarité négative contenu dans une capside icosaédrique (Miyata et al. 1999, Okamoto et al. 2002). L'un des principaux problèmes quant à l'utilisation de virus entériques humains comme indicateurs de contamination provient de la fluctuation importante des charges virales excrétées, du fait du degré de l'infection, qui sont donc plus ou moins abondantes au sein des eaux usées. En revanche, une infection par TTV a tendance a persisté dans le temps et engendre une excrétion relativement stable (Vasilyev et al. 2009). Verani et al. (2006) ont observé une capacité à pouvoir persister dans l'environnement. La détection des TTV a toujours été associée à la détection de virus entériques (De Paula et al. 2007, Vaidya et al. 2002). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence une sensibilité relativement importante aux traitements appliqués dans les STEP (Diniz-Mendes et al. 2008, Haramoto et al. 2005, Verani et al. 2006). (Desai et al. 1999; Haramoto et al. 2005;Diniz-Mendes et al. 2008). De ce fait, les études récentes portant sur la détermination d'indicateurs potentiels se détournent de cet indicateur au profit des AdV associés au polyomavirus mais également du suivi des PMMoV (Carducci et al. 2009, Hamza et al. 2011a).

3.2.3.3.2 Les Pepper mild mottle virus

Les PMMoV sont des pathogènes de poivrons (de l'espèce *Capsicum*) à ARN simple brin contenu dans une capside de forme cylindrique ayant un diamètre d'environ 18 nm (Colson

et al. 2010, Zhang et al. 2006). Des études indiquent leur présence en abondance au sein des selles humaines (entre 10⁵ et 10¹⁰ copies/g) du fait de leur présence au sein de nombreux produits issus de l'agroalimentaire (Hamza et al. 2011a, Zhang et al. 2006). Leur présence dans des selles de certains animaux (chez le poulet, la vache, l'oie et la mouette) a été constatée mais avec des charges virales bien moindres que dans les selles humaines (Hamza et al. 2011a, Rosario et al. 2009b). Ils ont été détectés dans les eaux usées de divers pays à des charges virales comprises entre 10⁶ et 10¹⁰ copies/L (Hamza et al. 2011a, Kitajima et al. 2014a, Rosario et al. 2009b, Symonds et al. 2014). De plus, ils étaient plus fréquemment détectés, et en plus grande quantité, que l'ensemble des virus entériques (et donc que les AdV) et des polyomavirus humains dans des eaux usées, des eaux de surface et aussi de l'eau de mer. Leur persistance dans l'eau de surface et l'eau de mer a été estimée comme étant supérieure à celle des virus entériques (Hamza et al. 2011a, Rosario et al. 2009b). Cependant, aucune corrélation entre la détection de génomes de PMMoV et l'infectivité des virus entériques n'a été vérifiée. Il semble donc nécessaire de poursuivre les études afin d'avoir davantage de données concernant ce potentiel indicateur de contamination.

3.2.3.3.3 Les Picobirnavirus humains

Les picobirnavirus humains appartiennent à la famille des *Picobirnaviridae* et sont composés d'un ARN double brins bi-segmenté d'environ 4100 pb au total (environ 2500 pb pour le segment 1 et environ 1600 pb pour le segment 2) et d'une capside icosaédrique de 35 à 40 nm (Bhattacharya et al. 2007). A l'heure actuelle, leur pathogénicité reste méconnue mais l'on sait qu'ils ont été détectés à la fois chez des personnes atteintes de gastroentérites et des personnes saines (Banyai et al. 2008, Masachessi et al. 2007). Ils ont été identifiés au sein des eaux usées aux Etats-Unis (Symonds et al. 2009) et en Allemagne (Hamza et al. 2011a).

3.2.4 Conclusion

Malgré ces nombreuses propositions d'indicateurs de contamination de l'eau par des virus entériques, il reste encore beaucoup de travail à fournir avant de pouvoir les utiliser en suivi de routine. En effet pour l'ensemble de ces indicateurs proposés, il manque encore des données concernant leur répartition géographique, sur leur occurrence dans diverses ressources mais aussi leur corrélation avec l'infectivité des particules virales présentes. Des travaux devront être menés afin d'établir une méthode standardisée, sur le modèle de qui se fait actuellement sur les indicateurs fécaux bactériens. Cela signifie passer par des étapes de

validation inter et intra laboratoire à l'échelle internationale. Par conséquent, l'absence actuelle d'indicateurs pertinents pour suivre la contamination d'une eau par des virus entériques d'intérêt souligne la nécessité d'aller rechercher directement les virus entériques par culture, pour ceux disposant d'un modèle cellulaire, ainsi que par biologie moléculaire pour la très grande majorité d'entre eux.

Objectifs de la thèse

À l'heure actuelle, de nombreuses épidémies de gastroentérites sont répertoriées chez l'Homme comme étant liées à l'ingestion d'eau contaminée. La circulation des virus entériques au sein du cycle urbain de l'eau représente donc un risque de santé publique. C'est la raison pour laquelle, il est nécessaire de connaître davantage les paramètres susceptibles d'influencer leur diversité et leur dynamique dans l'environnement.

Mon travail de thèse a donc porté sur l'étude des virus entériques dans le bassin versant de la Seine au niveau d'une grande agglomération, Paris. L'objectif général était d'identifier les sources de variations spatio-temporelles de ces virus humains.

Le premier objectif de ce travail était de proposer une méthode de détection virale permettant l'analyse d'une grande diversité de virus entériques humains au sein de différentes matrices d'eaux environnementales. En effet, les charges de particules virales d'origine humaine observées dans l'environnement hydrique sont généralement trop faibles pour pouvoir être détectées directement. L'étude des virus entériques humains dans l'environnement requiert donc l'emploi de méthodes de concentration des échantillons d'eau préalables à la détection de ces particules virales. Certaines études ont mis en évidence des inhibitions liées à l'analyse des échantillons environnementaux, notamment au niveau des étapes d'extraction et de détection par amplification génomique. C'est pourquoi, cette méthode devait être en mesure de limiter voire d'exclure au maximum les inhibiteurs naturellement contenus dans les échantillons d'eaux environnementales mais également ceux potentiellement apportés par la méthode de concentration. Cette méthode a donc nécessité le développement de contrôles pertinents permettant la validation des résultats obtenus à l'issue de l'ensemble des étapes de concentration et de détection.

Dans un second temps, ces outils de concentration et de détection ont servi à analyser l'évolution spatio-temporelle de la charge virale dans les effluents de STEP, dans les eaux de Seine et ses affluents lors d'une campagne d'échantillonnage d'une année au niveau de la Seine en Ile-de-France. Les résultats obtenus ont été confrontés aux données du réseau Sentinelles afin d'estimer la cohérence qui pouvait exister entre l'état sanitaire de la population raccordée au réseau d'assainissement des eaux usées et l'évolution de la charge virale dans les eaux de surfaces et les eaux usées. La troisième partie de ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité de l'étude des variations spatio-temporelles des charges virales, puisqu'il s'est intéressé à l'étude de la diversité de certains virus entériques humains, à savoir les HAstV, les NoV GI et les NoV GII, au niveau des effluents de STEP afin d'estimer la diversité virale circulant dans l'environnement. La mise en place d'une méthode de séquençage haut débit a été effectuée afin d'apprécier la diversité de ces particules virales. Cette approche novatrice a également permis d'estimer l'évolution temporelle des génotypes circulant dans l'environnement et de confronter cette diversité virale environnementale avec les données épidémiologiques recueillies auprès du centre national de références des virus entériques.

Au vu des charges virales susceptibles d'être observées dans les eaux environnementales, ce quatrième et dernier axe de la thèse s'est intéressé à évaluer la persistance des virus entériques humains face à différentes conditions environnementales auxquelles ces particules virales sont susceptibles d'être confrontées à la fois dans les eaux de surface et lors des traitements de désinfection en usine de potabilisation. Parmi ces traitements de désinfection figurent la chloration et les rayonnements ultraviolets qui sont fréquemment utilisés. Cette étude a également été l'occasion d'estimer l'intérêt dans le suivi de la persistance virale des outils de détection traditionnels basés sur la culture cellulaire ou l'amplification génomique mais également de l'utilisation d'agents intercalants couplée à l'amplification génomique permettant d'évaluer l'intégrité des particules virales. La pertinence de l'utilisation d'agents intercalants a été évaluée dans le cadre d'une campagne de surveillance du danger sanitaire associé à la présence de virus dans des eaux arrivant en entrée d'usine de potabilisation, ainsi que dans le réseau de distribution.

Résultats

Partie II : Résultats

104

Chapitre 1: Analyse des facteurs influençant la circulation des virus entériques dans un bassin versant urbain

Introduction

Les eaux usées sont le principal réceptacle de la contamination fécale d'origine humaine. Ainsi, les virus entériques humains, essentiellement excrétés via les fèces, se retrouvent dans les eaux usées qui sont donc le point d'entrée de la contamination virale humaine dans le milieu hydrique. De nombreuses études se sont donc intéressées à évaluer les charges virales en entrée et en sortie de STEP (Masclaux et al. 2013, Simmons and Xagoraraki 2011). La plupart de ces travaux mettent en évidence des abattements de particules virales peu conséquents par rapport à la charge virale présente initialement (Tableau 5 de l'étude bibliographique). Par conséquent, les effluents de STEP bien que traités, sont susceptibles de contenir de fortes quantités de virus entériques. Ces effluents sont très fréquemment évacués dans des rivières dont l'eau peut être utilisée à différentes fins (source de captage pour produire de l'eau potable et pour irriguer des cultures maraîchères mais aussi à des fins récréatives). Malgré ces travaux, la dynamique des virus entériques humains dans un environnement hydrique soumis à une forte pression anthropique reste encore très peu étudiée. En effet, peu d'études se sont intéressées à quantifier l'impact que pouvaient avoir les effluents de STEP sur la contamination virale des rivières réceptrices et surtout comment variait dans le temps la contamination virale. De plus ces études sont souvent restreintes à deux ou trois types de virus, principalement les norovirus, les rotavirus ou les adénovirus. Il manque donc des informations pour décrire la dynamique de nombreux groupes de virus entériques dans un cycle de l'eau urbain.

Les objectifs de ce chapitre sont d'une part de proposer des outils permettant de suivre la contamination virale d'une rivière en milieu urbain dense pour un large spectre de virus entériques humains et d'autre part de voir s'il existe un lien entre l'état sanitaire de la population raccordées à un réseau d'assainissement et l'évolution de la charge virale au niveau des effluents de STEP au cours du temps.

L'ensemble de ces résultats sont présentés sous la forme de deux articles scientifiques. Le premier article porte principalement sur la comparaison de kits commerciaux de détection de virus entériques par RT-qPCR sur des échantillons environnementaux et a été publié dans la revue « Journal of Virological Methods ». Le second article a quant à lui été publié dans la revue « Environment International » et porte essentiellement sur la dynamique de la contamination virale d'un bassin versant urbain.

Résultats

Etudes préliminaires

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.

L'évaluation de la variabilité temporelle de la charge virale a été réalisée par 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 31).

L'étude de la variabilité spatiale a 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 32). L'ensemble des expérimentations concernant l'étude de la variabilité temporelle et spatiale ont chacune été réalisées en triplicat.

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.


Figure 30 : Evaluation de la variabilité temporelle de la charge virale dans la Seine (prélèvement moyen sur 24h en vert et prélèvements ponctuels en bleu). Cette représentation graphique présente uniquement les 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. 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.



Figure 31 : 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). Cette représentation graphique présente uniquement les 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. 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.

Article 1: Detection of Enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits

Sebastien Wurtzer^{*1}, Benoit Prevost², Francoise S. Lucas², Laurent Moulin¹

¹ Eau de Paris, DRDQE, R&D biologie 33 Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry

² LEESU (UMR MA 102, Université Paris-Est, Agro ParisTech),

Université Paris-Est Créteil, 61, avenue du Général-de-Gaulle,

94010 Créteil cedex, France

*Corresponding author : sebastien.wurtzer@eaudeparis.fr

Abstract

Despite the progress in water and wastewater treatment technologies, waterborne diseases are still a major concern of public health. In the reported water-related outbreaks, viruses constitute one of the main causal agents. Enteroviruses are one of the most viruses monitored in water and are often used as an indicator of viral pollution. Isolation and identification of this virus are now regularly based on molecular tools. However published or commercial protocols for detection of these viruses in water are frequently lacking of validation processes and performances evaluation in such complex samples. A method for enterovirus detection in environmental water has been developed, its performance has been evaluated and compared with several commercial kits.

The sensitivity of commercial methods in clinical samples, ranged between 89% and 100%, while the sensitivity in seeded environmental matrices fell between 16% and 91%. This method showed the best performance in environmental samples and was subsequently applied on surface and treated wastewater. The results showed the large dissemination of enteroviruses in an urbanized river. The results also emphasized the importance of good knowledge of the method's limits for its utilization in environmental samples in order to minimize false negatives and to avoid underestimating viral concentration.

Keywords : enterovirus; real time RT-qPCR; surface water; inhibition; virus detection; wastewater

Résultats

1. Introduction

Notwithstanding progress in water and wastewater management and treatment technologies, waterborne diseases are still a major concern of public health and have important socioeconomic implications. Millions of cases of gastrointestinal illness occur annually worldwide. Although they are often less analyzed, viruses are one of the major causes of water-related outbreaks in developed and emerging countries (European Food Safety Authority, 2010). Nowadays, the regulatory monitoring of water quality is only based on the survey of bacterial indicators from faecal contamination (*Escherichia coli* and intestinal enterococci), despite available studies showing that such indicators do not always correlate with the presence of viruses (He and Jiang, 2005; Jofre, 2007; Moulin et al., 2010; Gibson and Schwab, 2011; Wu et al., 2011). The difference in size, physical properties, resistance to environmental conditions between bacterial indicators and viruses imply a different fate in water bodies for these two types of microorganisms.

As a consequence of an historical concern for poliovirus and a lack of permissive cell lines supporting replicative infection for each enteric virus types, enteroviruses are enteric viruses frequently monitored in drinking water and water resources (surface and ground sources). Enterovirus (EV) are associated with various pathologies such as conjunctivitis, respiratory infections, hand-foot and mouth disease, myocarditis, diabetes, aseptic meningitis, encephalitis, paralysis and self-limiting gastroenteritis (Grabow, 2007).

In France, classic method for enterovirus detection in water samples is based on two standards (French NF XPT90-451 and European EN 14486), both implicating viral concentration on glass wool and detection by cell culture. These conventional methods for enterovirus isolation from water are laborious, time-consuming, and the visualization of cytopathic effects is very subjective (Teunis et al., 2005). In this context, virus detection in water is only performed in a few laboratories which have specific equipment and skills for its realization.

The growing need to improve enterovirus detection and to monitor other pathogenic enteric viruses in water leads to use molecular biology-based technologies even if the major limitation of this molecular approach is the inability to evaluate the infectivity of viral particles. This last characteristic can only be identified by propagating the virus in a cellular model, to discriminate between infectious and non-infectious particles. Some studies have shown that evaluation of the integrity of viral capsid, by pre-treatment of water samples with DNA intercalating dyes (Fittipaldi et al., 2010; Parshionikar, Laseke, and Fout, 2010; Bae and Wuertz, 2012) or by nuclease pre-digestion (Nuanualsuwan and Cliver, 2002; Seitz et al., 2011), can overcome the drawbacks (Hamza et al., 2011). Another limitation of molecular methods is the presence of naturally-occurring inhibitory compounds that are problematic during genome amplification-based analysis of environmental samples, particularly for large volumes of water samples (Hata et al., 2011). Indeed inhibitors are often concentrated or extracted together with targeted pathogens. Several controls can be considered to identify inhibitions at the different steps of the quantification method. Among the methods used most

frequently, integration of internal (competitive or non-competitive, endogenous or exogenous) controls permits monitoring the efficiency of target amplification (Hoorfar et al., 2004). The need to specifically control the extraction process leads to use extraction controls, which may be a pathogen related to the targeted microorganism. Recently, statistical approaches, based on analysis of shift in quantification threshold, have been proposed to evaluate such inhibition (Rajal et al., 2007; Guescini et al., 2008; Gibson et al., 2012).

In order to monitor the level of viral contamination, several commercial molecular diagnostic kits for enterovirus detection are available. Most of them are initially developed for human clinical diagnostic. Despite a lack of published data about the performance of such commercial kits in environmental samples, particularly regarding limits of detection, susceptibility to inhibition or detected species, many industrial or governmental laboratories use usually such kits for the monitoring of water quality.

The aim of this study was to propose a newly developed method to evaluate the viral contamination in environmental water samples and to compare its performance with four commercial real-time reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) kits for the detection of enterovirus. Firstly, the ability to detect different enterovirus species was evaluated on the European external quality control panels in order to validate the relevance to include these methods of enterovirus detection in this study. Then, their susceptibility to inhibitors was assessed in various environmental water matrices seeded with poliovirus or Coxsackievirus B3.

This new method showed relevant results and was routinely applied to environmental water (several treated wastewater and surface water) in order to monitor the viral load and to observe the applicability of this method.

2. Materials and methods

2.1. Virus preparation

Coxsackievirus B3, strain Nancy (ATCC VR-30) and poliovirus 1, strain Sabin (ATCC VR-192) were propagated in Buffalo Green Monkey cell line (Sigma Aldrich, St Louis, MO) in DMEM medium (Life Technologies, Carlsbad, CA). Culture flasks (25 cm²) were covered by 70-80 % confluence; viruses were inoculated at multiplicity of infection (MOI) of 1 and adsorbed at 37°C for 2 h. The inoculums were then removed and cell-layers were washed twice with phosphate saline buffer. Then, 10-mL of medium supplemented with 5 % foetal bovine serum (Life Technologies, Carlsbad, CA) and penicillin/streptomycin were added. The viruses were cultured at 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere. Viral surpernatants were harvested every day post infection and substituted by fresh medium until complete lysis of the cell-layer. Viral supernatants were clarified from cellular debris using centrifugation at 2000xg for 10 minutes at room temperature. The viral titer was then calculated by both plate assay according to EN 14486 standard and genome amplification by the described in-house real-time RT-PCR. Only

the collected supernatants corresponding to the peak of infection were conserved and stored at -80°C.

2.2. Preparation and collection of various samples

2.2.1. Evaluation of the detection sensitivity of various enteroviral species

Two Enterovirus External Quality Assessment (EQA) panels, from Quality Control for Molecular Diagnostics organization (QCMD, Glasgow, Scotland), were used to evaluate the clinical sensitivity of each method. These panels, QCMD EV-2010 and EV-2011, contained a range of samples, designed to evaluate different aspects of assay performance. Each sample contained one species of the following viruses diluted at various concentrations, ranging from 2.10⁻¹ to 5.10³ TCID₅₀/mL, in virus transport medium : Coxsackievirus-A9, -A16, -A21, -A24, -B3, Echovirus-11 and -30, Enterovirus-D68 and -A71, and two non-enteroviral species (Human Paraechovirus-3 and Rhinovirus-A16). The samples of the Enterovirus EQA panels were anonymized before processing.

2.2.2. Evaluation of the performance of each detection method in environmental water spiked samples

Eight water samples were collected at different field sites, most of them in the river Seine (Paris, France), and stored at 4°C. Within 24 hours, the presence of enterovirus genomes was evaluated by processing 1 mL with the in-house method. These water samples presented various properties reported in table 1 and all were negative for enterovirus genome. The samples were grouped as 3 matrices: low-, medium- or high-charged water regarding the concentration of matter in suspension. The dry weight was measured after filtration and desiccation of a sample part. 48 hours post-collection, each water sample was seeded with supernatant of Coxsackievirus B3 or poliovirus 1 cultures, in order to present a final concentration of 100 or 1000 genome units.mL⁻¹. One mL of each sample (M1 to M8), spiked with each enterovirus at various concentrations (n=32) was analyzed and unseeded water samples (n=8) were used as negative controls. All samples were anonymized before processing.

Sample	Turbidity FNU [*]	Matter in suspension mg.L ⁻¹	Matrices	Endogenous enterovirus	
M1	<0.10	non measurable	Low-charged	Not detected	
M3	0.21	non measurable	Low-charged	Not detected	
M4	1.8	non measurable	Low-charged	Not detected	
M2	22	2.0	Medium-charged	Not detected	
M8	17	1.9	Medium-charged	Not detected	
M5	833	24.0	High-charged	Not detected	
M6	1054	100.0	High-charged	Not detected	
M7	420	12.0	High-charged	Not detected	

Table 1. Description of water matrices used for seeding samples

*FNU, Formazin Nephelometric Unit

2.2.3. Analysis of enterovirus contamination in river Seine samples

From May 2013 to January 2014, surface water samples of 10 L (n=80) and treated wastewater samples (n=40), from a wastewater treatment plant devoid of any disinfection process, were collected twice a month. Each environmental water sample was stored at 4°C for 24h maximum before the viral concentration.

2.3. Viral concentration from water samples

The viral concentration method is derived from US-EPA method 1615 (Gibson et al., 2012; Cashdollar et al., 2013). Briefly, all environmental water samples were concentrated using three successive steps. Firstly a filtration step based on the use of electropositive filters (NanoCeram[®] Virus Samplers, Argonide, Sanford, FL). Filters were then sonicated at 4°C for 1 hour in an elution buffer composed of 1% beef extract (Bacto[®] Beef Extract Dessicated, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ), 0.05 M glycine (Merck[®], Darmstadt, Germany), 0.1% Tween 80 (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 0.1% sodium polyphosphate (Sigma Aldrich, St Louis, MO), adjusted at pH 9.5. Then samples were eluted in inverted flow. Secondly, the pH was adjusted to 3.5, allowing virus flocculation under slow magnetic agitation for 1h and followed by a centrifugation at 4000×g at 4°C for 2h. Thirdly, the pellet was resuspended in PBS 1x pH 9 and was finally ultracentrifugated on 1 mL of 40 % sucrose at 150 000×g at 4°C for 2 h. The supernatant was removed and the pellet was resuspended in 1 mL of 40 % sucrose. The enterovirus mean recovery of this complete method in spiked experiments (n=5) was previously estimated at 75 ± 12 % (data not shown), close to the mean recovery reported in US-EPA method 1615 (Fout et al., 2012).

2.4. Extraction of viral nucleic acid

Total nucleic acids from water samples were extracted with a MagNA Pure Compact system (Roche Applied Science, Bâle, Switzerland) and MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume, allowing to the processing of samples up to 1 mL, according to the manufacturer's instructions. For each sample, a single extraction was performed and total nucleic acids were eluted in 100 μ L and aliquoted in 20 μ L, then the products were immediately used or stored at -80°C. Each specimen aliquot had undergone only one freezing/thawing cycle and was analyzed in duplicate with each method.

2.5. In-house real-time RT-PCR assay

New enterovirus degenerated primers (EV_F453: GCCCCTGAATGCG and EV_R583: TGTCACCATAAGCAGY, 18 pmol/reaction each) were designed from 5'-UTR region of enterovirus genome (relative to GenBank access: M33854 of Coxsackievirus B3, strain Nancy), using AlleleID[®] v.7.01 software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA). A new enterovirus probe was also designed (EV_P536: FAM-CCAAAGTAGTCGGTTCC-NFQ MGB, 2 pmol/reaction). These primers and probe were derived from multiple sequence alignment (CLUSTAL W) of 56 human enterovirus complete genomes collected in NCBI GenBank database and their specificity to human enteroviruses was evaluated in silico.

A competitive internal control of amplification, made of a partial sequence of human β -actin gene cloned into pCR2.1 TOPO vector (Life Technologies, Carlsbad, CA) and flanked by EV_F453 and EV_R583 sequences, was developed and used in 1000 copies in a multiplex reaction. A probe (BACT_P1172: HEX-CCCCTCCATCGTCCACCGCAAATG-BHQ1, 2 pmol/reaction) was specifically designed for this internal control. The amplification reaction was optimized by using TaqMan[®] Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

Each reaction was carried out with 5 μ L of concentrated and extracted water samples, 5 μ L of master mix TaqMan® Fast Virus 1-Step (Life Technologies, Carlsbad, CA), 5 μ L of moleculargrade water (Biosolve, Dieuze, France) and 5 μ L of primers and probes mix. All reactions were performed with an ABI 7500 real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA). The thermal cycling profile was one step of reverse transcription at 50°C for 5 min, one step of initial denaturation at 95°C for 20 s, and 45 cycles of 5 s denaturation at 95°C and 40 s annealing/extension at 60°C. Fluorescence was measured at the end of annealing/extension step on FAM and HEX channels. Each amplification run included a no template control and a positive amplification control. For each sample, results were reported as a mean of duplicate analysis. The raw amplification data was collected with SDS 7500 software v2.0.6 (Life Technologies, Carlsbad, CA) and then processed with Prism 6 software (GraphPad, La Jolla, CA). An extraction control based on MS2 bacteriophage was added to each sample before the nucleic acids extraction step. Specific primers for MS2 bacteriophage detection (MS2_F632: GTCGCGGTAATTGGCGC, 2 pmol/reaction and MS2_R708: GGCCACGTGTTTTGAT CGA, 6 pmol/reaction) were designed from ORF coding the maturation protein, using AlleleID[®] v.7.01 software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA). A hydrolysis probe was also designed (MS2_P650: FAM - AGGCGCTCCGCTAC CTTGCCCT-BHQ1, 6 pmol/reaction). The amplification reaction was optimized by using TaqMan[®] Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The runs were performed using the same thermal cycling profile as the enterovirus assay. This extraction control for in-house method was only used with environmental samples so as not to interfere with controls of the commercial kits.

2.6. Commercial real-time RT-PCR assays

Enterovirus detection was also performed using different real-time RT-qPCR assays, according to the manufacturer's instructions and compared to the new in-house method developed and optimized for environmental samples. To validate the new real-time RT-qPCR in-house method, its performance was compared to those of four commercial kits, all based on TaqMan 5'-nuclease technology: Enterovirus R-gene (Argene, Verniolle, France), Enterovirus Q-PCR Alert kit (Nanogen ElitechGroup, Puteaux, France), Human enterovirus real-time PCR (Diagenode, Seraing, Belgium) and enterovirus@ceeramTools (Ceeram, La Chapelle sur Erdre, France) (table 2). Each kit included its own inhibition control and positive control. Extracted RNA volumes used in each real-time RT-PCR assay were adjusted according to manufacturer's instructions. All samples were analysed in duplicate amplification. Rox normalization was not available with all kits and no threshold value was recommended in manufacturer's instructions to analyze the amplification curves. Thus, the threshold values were adjusted individually for each method. The amplification reactions were performed with an ABI 7500 system and raw amplification data was analyzed with SDS 7500 software v2.0.6 (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Résultats

			Included in the kit								
	Manufacturer	Name of kit	Ready-to- use reagents	IC ^a detection	Extraction control	Positive control	RNA extracted volume ^b (μL)	Reaction volume (µL)	Number of cycles ^b	Nature of reaction	Number of tests per kit
-	in-house	-	No	1000 copies of IC after extraction	Yes	in vitro RNA transcript	5	20	45	1-step real-time RT-PCR	NA
	Argene	Enterovirus R- gene	No	Provided IC before extraction	Yes	Plasmide provided	10	25	45	1-step real-time RT-PCR	90
	Nanogen Elitechgroup	Enterovirus Q-PCR Alert	Yes	Provided IC before extraction	Yes	Plasmide provided	10	15 for RT 40 for PCR	45	2-steps real-time RT-PCR	100
	Diagenode	Human enterovirus real-time PCR	No	Provided IC before extraction	Yes	Plasmide provided	5	25	45	1-step real-time RT-PCR	50
	Ceeram	enterovirus@ ceeramTools	No	Provided IC, before amplification	No available in separate kit, based on mengovirus	Plasmide provided	5	25	40	1-step real-time RT-PCR	48

Table 2. Main parameters of real-time RT-qPCR methods for enterovirus detection.

^a IC, internal control; ^b according to manufacturer's instructions.

2.7. Viral quantification

A partial sequence of 5'-UTR region was amplified with EV-F453 and EV-R583 primers (described previously) and cloned behind T7 polymerase promotor in pGEM-T-easy vector (Promega, Madison, WI). The circular plasmid was linearized by digestion with Sca-I restriction enzyme and transcribed in vitro using RiboMAX[™] Large Scale RNA Production System-T7 kit (Promega, Madison, WI). The quality of RNA transcripts was analyzed on 2100 bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) and they were precisely quantified by spectrophotometry using a BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). A standard curve was prepared from RNA transcripts by 10-fold serial dilutions, ranging from 10⁸ to 1 genome units/µL. This standard curve permitted to quantify the virus number for each environmental sample.

2.8. Enterovirus Genotyping

An identification of circulating enterovirus species in environmental samples was performed by genotyping of VP1 region using a derived method from Nix & al (Nix, Oberste, and Pallansch, 2006). Briefly, a reverse transcription step was performed using Superscript III RT (Life Technologies, Carlsbad, CA) and random hexamers at 50°C for 30 minutes. A volume of 2 μ L of cDNA was firstly amplified with the degenerated 224 and 222 primers for 40 cycles using Taq Platinum High Fidelity (Life Technologies, Carlsbad, CA). This PCR 1 generated a product of 992 bp. Then a nested PCR was performed with AN88 and AN89 primers for 35 cycles generating a product of 361 bp which was subcloned into pCR2.1 TOPO vector (Life Technologies, Carlsbad, CA). Ten colonies per Enterovirus positive samples were subsequently sequenced using 232 or 233 primers and BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit on 3130 XL Genetic Analyzer (Life Technologies, Carlsbad, CA). Then analysis of sequences was performed using BioEdit software (Ibis Bioscience, Carlsbad, CA). A phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. The branching confidence was estimated by bootstrapping with 1000 replications using the MEGA6 software (Tamura et al., 2013). The accession numbers of prototype viruses used for alignment and the neighbor-joining tree phylogenetic analysis were retrieved from GenBank database. Nucleotide sequences in the present study are designed according to the sampling location.

2.9. Statistical analysis

The performance for each method was estimated as followed. Sensitivity is the probability of a positive amplification result given that the sample is positive for EV. Specificity is the probability of no amplification given that the sample is negative for EV. Positive predictive value (PPV) is the probability of EV positive sample given that the test is positive. Negative predictive value (NPV) is the probability of EV negative sample given that the test is negative.

3. Results

3.1. Detection of various enterovirus species in clinical samples with each amplification method

The performance of the in-house method and the 4 commercial kits to detect various species of enterovirus at low concentration (from 2.10⁻¹ to 5.10³ TCID₅₀/mL) and a blind test was performed on 24 clinical samples (19 different clinical positive and 5 clinical negative samples) constituting European EQA panels enterovirus 2010 and enterovirus 2011 of QCDM organization. The positive samples were composed of CV-A9, CV-A16, CV-A21, CV-A24, CV-B3, E-11, E-30, EV-D68 or EV-A71, while EV negative samples contained RV-A16, HPeV-3 or only virus transport medium. All negative samples were confirmed by a second independent reaction. Each amplification run included a no template control and a positive amplification control, which were both provided in each commercial kit. For the in-house method, these controls were based on molecular grade water and in vitro transcribed RNAs respectively. The enterovirus detections were only qualitative as no standard curve was performed using any method. Each amplification method (kits and in-house) tested included an inhibition control (table 2). Any Ct shift of these controls, less than 2 cycles (equal to 2 x standard deviation, data not shown), was not considered as significant inhibition. For each amplification method, the no template control showed no amplification signal. No inhibition control (0/24) was affected by a Ct shift more than 2 cycles (compared to control value) in the samples. HPeV-3 was never amplified by any tool and RV-A16 was only amplified with Argene kit. One negative sample was positive with Argene and Nanogen kits. All enterovirus species tested were able to be amplified with these methods. But, some samples, identified as "infrequently detected" in panel reports (provided by QCMD organization), were not amplified, probably due to the detection limit of each kit. The sensitivity in clinical samples ranged from 89% to 100% while specificity ranged from 60% to 100%. The positive predictive values (PPV) were globally comparable (from 89% up to 100%), but negative predictive values (NPV) were more disparate (from 60% up to 100%). Otherwise, the ability of in-house method to detect CV-A6, E-6, E-7 and E-21 species, which were not included in the QCMD panels, was confirmed (data not shown). The performance values were calculated by analyzing each sample as an independent clinical sample. The results are reported in table 3.

Résultats

Manufacturer	No of EV positive RT- qPCR reactions / Total No of positive samples	No of EV negative RT-qPCR reactions / Total No of negative samples	negative RT-qPCR No of inhibited Ins / Total No of samples/Total No of ative samples samples		Specificity (%)	PPV ª (%)	NPV ^b (%)
In-house	17/19	5/5	0/24	89	100	100	71
Argene	17/19	3/5	0/24	89	60	89	60
Ceeram	18/19	5/5	0/24	95	100	100	83
Diagenode	19/19	5/5	0/24	100	100	100	100
Nanogen	17/19	4/5	0/24	89	80	94	67

Table 3. Enterovirus detection in clinical specimens.

^a positive predictive value; ^b negative predictive value

3.2. Performances of each detection method in environmental water spiked samples

Two species of enterovirus, poliovirus 1 (strain Sabin) and Coxsackievirus B3 (strain Nancy) were used to spike various EV negative environmental water matrices at two concentrations (100 or 1 000 genome units.mL⁻¹). A no template control and a positive control were included in each amplification runs for analysis validation (data not shown). The enterovirus detection was only qualitative as no standard curve was performed using any method. The amplification curves showed that all unseeded samples were negative for enterovirus using each detection method (in-house and kits) and the capacity to detect enterovirus in seeded samples varied according to its nature (low-, medium-, high-charged water). Although the limit of detection for each kit was not precisely evaluated in this study, all kits were able to amplify the samples seeded with 1000 and 100 genome units in the lowest charged matrices M1 and M3. Since the lower concentration was detected for all these methods, we excluded a problem of detection limit on the subsequent results. Overall, all seeded matrices were globally well detected with Diagenode kit (29 samples detected / 32 positives samples) and in-house method (29/32), and to a lesser extent, with Argene kit (18/32) and Ceeram kit (20/32). The amplification of the samples prepared in high-charged matrices was more problematic with Argene and Ceeram kits, with only 6/12 and 0/12 samples respectively. For Nanogen kit, only 5/32 samples were detected. Furthermore, for example, 100 and 1000 genome units samples were all detected in low and medium-charged matrices with Ceeram kit, but they were not in high-charged matrices. Such results suggested that performance of detection was more affected by the water nature than by the viral concentration. The performance values were calculated by analzing all seeded and unseeded samples, without distinction of water origin. Various inhibition frequencies were observed. Except for one kit for which an inhibition was observed in all samples, an inhibition determined by a Ct shift greater than 2 cycles (compared to control value), was mostly observed in the high-charged samples. In this newly developed method, no such inhibition was reported. The results are reported in table 4.

	No of p	ositive specimens i No of positive spe	dentified/ Total cimens	No of negative specimens identified/Total	No of inhibited	Sensitivity (%)	Specificity (%)	NPV ^a	PPV ^b (%)
	Total	Low/Medium- charged water	High-charged water	No of negative specimens	No of samples			(%)	
In-house	29/32	20/20	9/12	8/8	0/40	91	100	73	100
Argene	18/32	12/20	6/12	8/8	15/40	56	100	36	100
Ceeram	20/32	20/20	0/12	8/8	13/40	63	100	40	100
Diagenod					14/40				
е	29/32	20/20	9/12	8/8		91	100	73	100
Nanogen	5/32	4/20	1/12	8/8	40/40	16	100	23	100

Table 4. Detection of enterovirus in seeded and unseeded environmental matrices.

^a negative predictive value; ^b positive predictive value

3.3. Analyse of enterovirus contamination in river Seine samples

A total of 120 environmental water samples (80 treated wastewater samples and 40 river surface water samples) have been filtered and concentrated using a variation of US-EPA method 1615, and then analyzed using the new enterovirus detection method. An extraction control, based on MS2 bacteriophage, and an inhibition control of amplification, composed of a competitive internal control, were added (before and after nucleic acids extraction respectively) to each sample in order to check any potential inhibition. Under such conditions, we did not observe any inhibition greater than 2 cycles (compared to control value) in those samples (data not shown). Enterovirus detection frequencies of treated wastewater samples and river water samples were respectively 55% (22/40) and 16% (13/80). The mean concentration of treated wastewater samples positive in EV was 410 genome units/L while it was 45 genome units/L in river water samples (Figure 1).



Figure 1: Enterovirus concentrations in treated wastewater (n=40) and river water (n=80) samples, determined by RT-qPCR. The outlying lines represent the standard deviation; the line across indicates the mean; (-) Lower limit of detection.

In all EV positive samples, 7 different enterovirus genotypes have been determined among 26 sequenced samples: CV-A3, CV-A24, CV-B2, CV-B3, CV-B5, E-30 and EV-A71. Nine positive samples were not able to be sequenced, probably due to the detection limit of the genotyping method. All of these genotypes have been found in treated wastewater samples whereas only CV-A3, CV-B2, CV-B5 and E-30 have been isolated in river water samples. The results are reported in table 5 and figure 2.

Water	EV positive	Determined enterovirus genotypes	Identified enteroviral genotypes						
samples	water samples		CV-A3	CV-A24	CV-B2	CV-B3	CV-B5	E-30	EV-A71
Treated Wastewater	22	18	3	2	3	2	2	3	3
River water	13	8	2	0	3	0	1	2	0
Total	35	26	5	2	6	2	3	5	3

Table 5. Enterovirus (EV) genotypes identified by VP1 ORF sequencing.

Figure 2. Phylogenic tree identifying genotypes of sequenced environmental samples in VP1 gene. GenBank number of reference strains are mentioned between brackets. Nucleotide sequences are designed according to the sampling location: River for virus isolated from river Seine sample; WWTP for virus isolated from sample of treated wastewater.



4. Discussion

To our knowledge, this study is the first one which reports the performance of real-time RTqPCR enterovirus detection in environmental water samples for both a new in-house method and commercial detection kits. Firstly, all the evaluated methods presented high degrees of specificity (varying between 60% and 100%) and were generally able to amplify the genome of the tested enterovirus. This process of validation enabled the inclusion in the study of some relevant test methods for enterovirus detection. However, performance of methods of detection in environmental samples showed greater variation (between 16% and 91%). Some displayed a high degree of sensitivity to inhibition in environmental water matrices and were strongly affected by environmental compounds. It should also be noted that all methods targeted 5'-UTR region. The differences may have come from polymerase activity (samples with low virus concentration being detected in low-charged water by all kits). Three of four kits tested (Diagenode, Argene and Nanogen kits) are initially developed and validated for *in vitro* medical diagnostic use and no attempt of optimisation was performed in this study. Only one kit (Ceeram kit) is intended for using on environmental samples.

In this study the new in-house method provided the best performance of qualitative detection regarding environmental water samples. The low inhibition rate permitted enterovirus genomes quantification. As a consequence such a method is recommended for environmental monitoring of enteroviruses.

Among the kits, the Human enterovirus real-time PCR kit (Diagenode, Belgium) provided the best performance for qualitative detection with environmental matrices, despite a relatively high inhibition frequency, which prevented it from being used as a quantitative approach. Enterovirus R-gene kit (Argene, France) and enterovirus@ceeramTools kit (Ceeram, France) detected enterovirus in low and medium-charged water samples, but they presented strong inhibition in high-charged samples, which affected the enterovirus detection. In this context, an optimisation would probably be necessary for routine monitoring of environmental samples, especially in highly charged water such as wastewater effluents. Finally, the Enterovirus Q-PCR Alert kit (Nanogen ElitechGroup, Italy) was not adapted for any tested environmental samples. One possible explanation of the strong inhibition with the Enterovirus Q-PCR Alert kit could be the volume of RNA input (10 μ L as Argene kit instead of 5 μ L with other methods) recommended by the manufacturer. Indeed, the higher RNA input volume is, the better sensitivity could be expected. But, in environmental samples, high RNA input volume can also increase the amount of potential inhibitor and thus that can induce strong inhibition of amplification.

This study emphasizes the precautions for interpreting genome amplification from environmental water, which can contain various potential PCR inhibitors. Inhibitory compounds can disrupt the genome amplification through nucleic acids degradation, by affecting extraction process or by interfering with polymerase and reverse transcriptase (Radstrom et al., 2008). Humic and fulvic acids (Ijzerman, Dahling, and Fout, 1997), heavy metal ions and nucleases (Wilson, 1997) are probably inhibitory compounds the most problematic in environmental samples. The effects of inhibitors can be limited by using optimized process for sample concentration or nucleic acid extraction (Jothikumar, Cliver, and Mariam, 1998; Rodriguez et al., 2012) by adding genome amplification enhancers (bovine serum albumin, dimethyl sulfoxide or DNA carriers) (Wilson, 1997) and/or by performing amplification with optimised polymerases. In most cases with surface water samples, the inhibition was attributed to genome amplification. However, concerning wastewater or surface water samples with high concentrations of matter in suspension, a part of the inhibition may be a result of inefficient extraction of the nucleic acids. The use of extraction control revealed the global impact of sample origin on nucleic acids extraction and amplification steps. Such controls should be as close as possible to the targeted viruses. Nevertheless, detection of virus in environmental water samples implies the filtration and concentration of large sample volumes. These additional steps could be also be impacted by the nature of samples. Some studies including whole process controls were recently published concerning enteric hepatitis viruses or noroviruses (Mattison et al., 2009; Blaise-Boisseau et al., 2010; Martin-Latil et al., 2012).

The concentrations of enteric viruses in environmental samples are typically low (from 27 genome units/L to 6053 genome units/L in these samples) and any inhibition could result in underestimating the risk of exposure, especially as minimal infectious dose is close to 10 to 1000 ingested enteroviruses (Schiff et al., 1983; Schiff et al., 1984). Despite the limitation of genomic amplification-based methods regarding infectivity of viral particles, a recent study has shown that detection of virus genomes can be associated with an elevated risk of viral acute gastrointestinal illness, even at low average concentration, in non-disinfected drinking water (Borchardt et al., 2012).

The new in-house method has shown comparable sensitivity to the four commercial kits designed for clinical samples; however it offers the advantage of being less susceptible to inhibition in environmental samples. It was successfully applied to detect enteroviruses in environmental samples after filtration and concentration of 10 L of water according to a variation of the US-EPA method 1615. Addition in each sample of inhibition controls for the extraction and amplification steps allowed us to monitor the difficulties encountered with such matrices. In the tested condition, it is noteworthy that the high-charged samples from the wastewater treatment plants have not leaded to a strong inhibition.

The quantification results highlighted the detection ability of this method in various environmental water matrices. Moreover, genotyping results allowed to validate the capacity of the detection method to amplify enteroviruses not included in the QCMD panels tested, such as CV-A3, CV-B2 and CV-B5. Additionally, it revealed the main enterovirus genotypes circulating in environmental water in Paris, from May 2013 to January 2014. One of the major contamination sources could be the discharge of wastewater treatment plants. A study to identify the accurate contribution of wastewater treatment plants to the viral quality of the river Seine in Paris is currently in process. Moreover a comparison between enterovirus genotypes circulating in population and in environmental water in Paris is forcast. It is

remarkable that some enterovirus were never detected in the river Seine, only in the treated wastewater samples (genotypes CV-A24, CV-B3 and EV-A71). That observation could reveal a lower persistence capacity of these genotypes in environmental conditions or a lower influence of treated wastewater effluents on microbiological quality of the river than expected. Compared to a previous study in the river Seine in Paris that used culture methods, the level of detected virus in this study is higher (45 genome units/L vs 5-9 plaque forming units/10L) (Mons et al., 2009). This discrepancy can be explain by non-culturable virus detected by RT-qPCR method, by the lack of typical cytopathic effects of some species on permissive cell lines or higher recovery of the filtration method used in the present study compared to the glass wool filter recommended in French and European standards.

To conclude, the growing use of industrial laboratories to have efficient molecular tools for enterovirus detection in water involves the utilization of an optimized laboratory method or a commercial kit which has been validated on such particular matrices. The newly developed method seems promising and can be combined with analysis of the infectivity of virus, tested by culture on genome positive samples. Since virus culture is labor-intensive, molecular detection of enterovirus could be used as a first step to identify positive and/or negative samples. The culture method remains essential in order to assess the infectivity of positive samples, especially for poliovirus within the context of Global Polioeradication Program.

5. Acknowledgement

This work was funded by Eau de Paris. The authors thank Dr. Michel Joyeux for critical reading the manuscript. The authors are grateful to all manufacturers which provided free kits allowing the realization of this study. The authors thank also Alexandre Goncalves and Dr. Vincent Rocher (SIAAP) for the discussions about treated wastewater effluents.

6. References

Bae, S. and Wuertz, S., 2012. Survival of host-associated bacteroidales cells and their relationship with Enterococcus spp., Campylobacter jejuni, Salmonella enterica serovar Typhimurium, and adenovirus in freshwater microcosms as measured by propidium monoazide-quantitative PCR. Appl Environ Microbiol 78, 922-32.

- Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L. and Perelle, S., 2010. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. J Virol Methods 166, 48-53.
- Borchardt, M.A., Spencer, S.K., Kieke, B.A., Lambertini, E. and Loge, F.J., 2012. Viruses in nondisinfected drinking water from municipal wells and community incidence of acute gastrointestinal illness. Environ Health Perspect 120, 1272-9.
- Cashdollar, J.L., Brinkman, N.E., Griffin, S.M., McMinn, B.R., Rhodes, E.R., Varughese, E.A., Grimm, A.C., Parshionikar, S.U., Wymer, L. and Fout, G.S., 2013. Development and evaluation of EPA method 1615 for detection of enterovirus and norovirus in water. Appl Environ Microbiol 79, 215-23.
- European Food Safety Authority. 2010. Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2008, European Centre for Disease Prevention and Control, pp. 410.
- Fittipaldi, M., Rodriguez, N.J., Codony, F., Adrados, B., Penuela, G.A. and Morato, J., 2010. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. J Virol Methods 168, 228-32.
- Fout, G.S., Brinkman, N.E., Cashdollar, J.L., Griffin, S.M., McMinn, B.R., Rhodes, E.R., Varughese, E.A., Karim, M.R., Grimm, A.C., Spencer, B. and Borchardt, M.A. 2012. Method 1615 : Measurement of Enterovirus and Norovirus Occurrence in Water by Culture and RT-qPCR.
- Gibson, K.E. and Schwab, K.J., 2011. Detection of bacterial indicators and human and bovine enteric viruses in surface water and groundwater sources potentially impacted by animal and human wastes in Lower Yakima Valley, Washington. Appl Environ Microbiol 77, 355-62.
- Gibson, K.E., Schwab, K.J., Spencer, S.K. and Borchardt, M.A., 2012. Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples. Water Res 46, 4281-91.
- Grabow, W.O.K. 2007. Overview of Health-Related Water Virology. In: Bosch, A. (Ed), Human Viruses in Water, pp. 1-25.
- Guescini, M., Sisti, D., Rocchi, M.B., Stocchi, L. and Stocchi, V., 2008. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. BMC Bioinformatics 9, 326.
- 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, 424-36.
- Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C. and Furumai, H., 2011. Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. Appl Environ Microbiol 77, 4336-43.
- He, J.W. and Jiang, S., 2005. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. Appl Environ Microbiol 71, 2250-5.

- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M. and Fach, P., 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. J Clin Microbiol 42, 1863-8.
- Ijzerman, M.M., Dahling, D.R. and Fout, G.S., 1997. A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction. J Virol Methods 63, 145-53.
- Jofre, J. 2007. Indicators of Waterborne Enteric Viruses. In: Bosch, A. (Ed), Human Viruses in Water, pp. 227-49.
- Jothikumar, N., Cliver, D.O. and Mariam, T.W., 1998. Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. Appl Environ Microbiol 64, 504-8.
- Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L. and Perelle, S., 2012. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control. Int J Food Microbiol 157, 167-73.
- Mattison, K., Brassard, J., Gagne, M.J., Ward, P., Houde, A., Lessard, L., Simard, C., Shukla, A., Pagotto, F., Jones, T.H. and Trottier, Y.L., 2009. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborne RNA viruses. Int J Food Microbiol 132, 73-7.
- Mons, C., Dumetre, A., Gosselin, S., Galliot, C. and Moulin, L., 2009. Monitoring of Cryptosporidium and Giardia river contamination in Paris area. Water Res 43, 211-7.
- Moulin, L., Richard, F., Stefania, S., Goulet, M., Gosselin, S., Goncalves, A., Rocher, V., Paffoni,
 C. and Dumetre, A., 2010. Contribution of treated wastewater to the microbiological quality of Seine River in Paris. Water Res 44, 5222-31.
- Nix, W.A., Oberste, M.S. and Pallansch, M.A., 2006. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. J Clin Microbiol 44, 2698-704.
- Nuanualsuwan, S. and Cliver, D.O., 2002. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. J Virol Methods 104, 217-25.
- Parshionikar, S., Laseke, I. and Fout, G.S., 2010. Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. Appl Environ Microbiol 76, 4318-26.
- Radstrom, P., Lofstrom, C., Lovenklev, M., Knutsson, R. and Wolffs, P., 2008. Strategies for overcoming PCR inhibition. CSH Protoc 2008, pdb top20.
- Rajal, V.B., McSwain, B.S., Thompson, D.E., Leutenegger, C.M., Kildare, B.J. and Wuertz, S., 2007. Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. Water Res 41, 1411-22.
- Rodriguez, R.A., Thie, L., Gibbons, C.D. and Sobsey, M.D., 2012. Reducing the effects of environmental inhibition in quantitative real-time PCR detection of adenovirus and norovirus in recreational seawaters. J Virol Methods 181, 43-50.

- Schiff, G.M., Stefanovic, G.M., Young, E.C. and Pennekamp, J.K. 1983. Determination of a minimal infectious dose of an Enterovirus in drinking water, United States Environmental Protection Agency.
- Schiff, G.M., Stefanovic, G.M., Young, E.C., Sander, D.S., Pennekamp, J.K. and Ward, R.L., 1984.
 Studies of echovirus-12 in volunteers: determination of minimal infectious dose and the effect of previous infection on infectious dose. J Infect Dis 150, 858-66.
- Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S. and Moe, C.L., 2011. Norovirus infectivity in humans and persistence in water. Appl Environ Microbiol 77, 6884-8.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30, 2725-9.
- Teunis, P.F., Lodder, W.J., Heisterkamp, S.H. and de Roda Husman, A.M., 2005. Mixed plaques: statistical evidence how plaque assays may underestimate virus concentrations. Water Res 39, 4240-50.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 63, 3741-51.
- Wu, J., Long, S.C., Das, D. and Dorner, S.M., 2011. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. J Water Health 9, 265-78.

Article 2: Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population

Authors: Prevost B¹, Lucas FS¹, Goncalves A², Richard F², Moulin L³, Wurtzer S³

Affiliations:

¹ LEESU (UMR MA 102, Université Paris-Est, Agro ParisTech), Université Paris-Est Créteil, 61, Avenue du Général-de-Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

² SIAAP, Direction du développement et de la prospective, 82, Avenue Kléber, 92700 Colombes, France

³ Eau de Paris, DRDQE, R&D biologie, 33, Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry sur seine, France

*Corresponding author: <u>Laurent.moulin@eaudeparis.fr</u>

Abstract

Although enteric viruses constitute a major cause of acute waterborne diseases worldwide, environmental data about occurrence and viral load of enteric viruses in water are not often available. In this study, enteric viruses (i.e. adenovirus, aichivirus, astrovirus, cosavirus, enterovirus, hepatitis A and E viruses, norovirus of genogroups I and II, rotavirus A and salivirus) were monitored in the Seine River and the origin of contamination was untangled. A total of 275 water samples were collected, twice a month for one year, from the river Seine, its tributaries and the major WWTP effluents in the Paris agglomeration. All water samples were negative for hepatitis A and E viruses. AdV, NVGI, NVGI and RV-A were the most prevalent and abundant populations in all water samples. The viral load and the detection frequency increased significantly between the samples collected the most upstream and the most downstream of the Paris urban area. The calculated viral fluxes demonstrated clearly the measurable impact of WWTP effluents on the viral contamination of the Seine River. The viral load was seasonal for almost all enteric virus, in accordance with the gastroenteritis recordings provided by the French medical authorities. These results implied the existence of a close relationship between the health status of inhabitants and the viral contamination of WWTP effluents and consequently surface water contamination. Subsequently, the regular analysis of wastewater could serve as a proxy for the monitoring of the human viruses circulating in both a population and surface water.

Key words

Enteric viruses, Viral load, River water, Wastewater effluent, Water contamination, PCR

1 Introduction

Human enteric viruses are a major cause of acute waterborne diseases in both developed and developing countries (Enserink and others 2014; Patil and others 2015). In addition to long term persistence in environmental water and strong resistance to disinfection treatment, they are able to cause illness after ingestion at low infectious dose (Yezli and Otter 2011). Human infections by enteric viruses are often asymptomatic or pauci-symptomatic, but may also induce various symptoms such as intestinal and respiratory illness, hepatitis or conjunctivitis. They can even present a high risk of morbidity and mortality in high-risk populations such as young children, immunocompromised patients and elderly people (Gerba and others 1996).

Human enteric viruses have the ability to multiply within gastrointestinal tract of their hosts and are then excreted in faeces in large quantities (up to 10^{11} viruses / g stool) for a period ranging from several days to several months (Blacklow and Greenberg 1991). Consequently, wastewaters are likely to contain a large amount of enteric viruses (Cantalupo and others 2011; Lodder and others 2013). These effluents are then treated by wastewater treatment plants (WWTP) which are not designed to specifically eliminate enteric viruses (Kitajima and others 2012). WWTP effluents flow in rivers that are potentially used for different purposes such as shellfish farming (Rajko-Nenow and others 2013), recreational activities (Dorevitch and others 2012), market gardening (Cheong and others 2009) but also as catchment sources to produce drinking water (Maunula and others 2005).

In order to appreciate and model the risk assessment of viral contamination associated with surface water, it is necessary to acquire more data on viral contamination of surface water and WWTP effluents. However, there were a few studies reporting the spatial and temporal dynamics of the different enteric viruses in surface water and treated wastewater. If the water microbiological quality is generally based on the monitoring of faecal indicators (*Escherichia coli* (*E. coli*) and intestinal enterococcus), these bacteria have generally a capacity of persistence in water and a resistance to disinfection treatments lower than the human enteric viruses and can rarely serve as a valuable proxy to survey viral contamination (Contreras-Coll and others 2002; Tree and others 2003).

This study monitored the evolution of various circulating enteric viruses (adenovirus, aichivirus, astrovirus, cosavirus, enterovirus, hepatitis A and E viruses, norovirus of genogroups I and II, rotavirus A and salivirus) over one year in the river Seine through the Paris urban area. To our knowledge, for the first time, the estimation of viral fluxes identified clearly the main viral contamination source, WWTP effluents, in an urban river and permitted the monitoring of their evolution over time. Finally, this study implied a close relationship between the health status of the population connected to a sewage system and the viral contamination of surface water.

2 Materials and methods

2.1 Water samples campaign

Starting from May 2013 until May 2014, 11 water samples of 10L were collected twice a month at different points of the river Seine, upstream to downstream the Paris urban area (fig. 1), for a total of 275 analysed water samples. Each water samples were stored at 4°C until 24h maximum before the concentration of the viral particles. The treated wastewater samples were collected from the four major Paris area WWTP which are designed to eliminate classical pollutants (carbon, nitrogenous, and phosphorus). Sewage of the four plants are mainly treated by activated sludge (\blacktriangle^2 , 600 000 m³/day, 1.5 million equivalent inhabitants), by biological filtration (\bigstar^5 and \bigstar^{10} , 240 000 m³/day, 100 000 m³/day corresponding to 1 million and 400 000 equivalent inhabitants, respectively) and by an association of these two previous processes (\bigstar^7 , 1.5 million m³/day, 6 million equivalent inhabitants) (fig. 1). The large urban Ile de France area is connected to the WWTP using both combined and separated sewer network (usually combined in the downtown area and separated in the suburban area as described in (Lucas and others 2014)).



Figure 1: Map representing a section of the Seine River and all sampling points from the Seine River ●, the tributaries ■ and WWTP effluents ▲. This section of the Seine River was divided into three sub-sections A, B and C. The arrow indicates the direction of the Seine River flow.

2.2 Primers and probes design

For Aichivirus, Cosavirus, Enterovirus, Hepatitis E virus and Salivirus, RNA was detected using previously published primers and probes (Table 1). For Adenovirus, Astrovirus, Hepatitis A virus, Bacteriophage MS2, Norovirus of genogroups I and II and Rotavirus A, new primers and probes were developed (Table 1) using recently available genome sequences.

All developed primers and probes were designed using AlleleID[®] version 7.01 software (Premier Biosoft, Palo Alto, CA) by multiple sequence alignment of complete genomes, collected in NCBI GenBank database. Their specificity to various serotypes or genotypes of viruses and their strict specificity to human virus were evaluated *in silico* (Table 1). The developed primers and probes were evaluated using stool samples kindly provided by the French reference national center for enteric viruses. In addition, the performance of amplification reaction for norovirus, adenovirus and enterovirus were evaluated using external quality assessment panels from Quality Control for Molecular organization (QCMD, Glasgow, Scotland).

2.3 Viral concentration from water samples

Water samples were concentrated by three successive filtration/concentration steps previously described (Wurtzer and others 2014b). Briefly, 10 L of water sample was filtered using electropositive filters (NanoCeram[®] Virus Samplers, Argonide, Sanford, FL). Filters were then sonicated at 4°C for 1 h in an elution buffer composed of 1% beef extract (Bacto® Beef Extract Dessicated, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ), 0.05M glycine (Merck®, Darmstadt, Germany), 0.1%Tween 80 (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 0.1% sodium polyphosphate (Sigma Aldrich, St Louis, MO), adjusted at pH 9.5. Then the viruses were eluted in an inverted flow. Second, the pH was adjusted at pH 3.5, allowing virus flocculation under slow magnetic agitation for 1 h and followed by a centrifugation at 4000xq at 4° C for 2 h. Third, the pellet was resuspended in PBS 1x pH 9 and was finally ultracentrifugated on 1mL of 40% sucrose at 150,000xg at 4°C for 2 h. The pellet was resuspended in 1 mL of 40% sucrose. The mean recovery rate of the complete detection method in spiked experiments (3 experiments with 10L of surface water and 3 experiments with 10L of WWTP effluents) ranged from 18 to 42% for AdV type 41 and AdV type 5 LacZ Δ E1 Δ E3, 31 to 57% for AstV type 1, 57 to 83% for coxsackievirus B3, 40 to 68% for NVGI.4, 42 to 61% for NVG.4 and 39 to 65% for RV-A. The endogenous viral contamination, measured before the spiking, was negligible compared to the concentration of spiking solutions and did not affected the estimation of recovery rates.

2.3 Extraction of viral nucleic acid

All viral nucleic acids from concentrated water samples were extracted with a MagNA Pure Compact extractor and MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume (Roche Applied Science, Bâle, Switzerland), allowing the processing of samples up to 1 mL according to the manufacturer's instructions. Extracted nucleic acids were immediately analysed and the leftover was stored at -80°C.

2.4 Real-time PCR assay conditions

Each independent reaction was carried out with 5µL of total nucleic acids extracted, using specific primers and probes for each virus (table 1) and TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations. All reactions were performed with a ViiA[™] 7 real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA). The thermal cycling profile was one step of reverse transcription at 50°C for 5min, one step of initial denaturation at 95°C for 20 s, 45 cycles of 5 s denaturation at 95°C and 40 s annealing/extension at 60°C. Fluorescence was measured at the end of annealing/extension step on FAM, HEX and DFO channels. Each amplification run included a no template control and a positive amplification control based on plasmids used to perform standard curves. Results reported for each sample were means of duplicate. The raw amplification data were collected with ViiA[™] 7 software version 1.2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA) and then processed with Excel software (Microsoft, Redmond, WA).

2.5 Viral quantification

For each targeted virus, standard curves were performed using pGEM-T-easy vector (Promega, Madison, WI) containing the amplified sequence. The plasmid concentrations were determined by spectrophotometry using a BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) and then used to establish standard curves by 10-fold serial dilutions, ranging from 10⁸ to 1 genome units/reaction. These standard curves permitted quantifying the virus number in each water sample. The results were expressed as number of genome copies/L.

2.6 Viral concentration controls and analysis validation criteria

Three controls were included in order to confirm the good recovery rate of this method. A global control, an adenovirus 5 *LacZ* Δ *E1* Δ *E3* produced by transfection of pAD/CMV/V5-GW/LacZ vector (Life Technologies, Carlsbad, CA) in 293A cells, was beforehand seeded at 10000 genome units in each water samples before the concentration steps. A bacteriophage MS2, used as an extraction control and as a control of reverse transcription step, was seeded at 10000 genome units in each concentrated water samples just before the extraction step. A competitive inhibition control of the amplification step, made of a partial sequence of human β -actin gene cloned into pCR2.1 TOPO vector (Life Technologies, Carlsbad, CA) and flanked by EV_F453 and EV_R583 sequences (table 1) and 1000 genome units was added after extraction of total nucleic acids. If the recovery rate of the global control was at least equal to the lower limit determined in spiked experiments (i.e. 18%) and if no inhibition of extraction and

Résultats

amplification controls were observed, then the results would be validated. If an inhibition of extraction and/or amplification controls was observed (i. e. a Cycle threshold (Ct) shift greater than 2 cycles between the water sample and blank sample), then a dilution of extracted nucleic acids could be tested to overcome the inhibition. If the recovery rate was not validated and if any inhibition of the two other controls was observed, the sample would be excluded of the analysis (table S 2).

2.7 Calculation of viral fluxes

For each water sample, the viral flux was calculated by multiplying the estimated viral load and the average daily flow measured at each sampling point (table S 1, supplementary data). All flow-rate data were measured and provided by the Parisian public sanitation service using both ultrasound and venturi devices.

Viral Flux/day = Viral load x Daily flow

2.8 Statistical analysis

All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 6.01 software (GraphPad, La Jolla, CA). Wilcoxon matched-pairs signed rank tests were performed to compare the viral loads of the Seine River upstream and downstream of the Paris urban area. Kruskal-Wallis tests with Dunn's multiple comparisons post-test were performed to highlight the seasonality of enteric viruses. Spearman correlation tests were performed between observed viral loads and the number of bacterial faecal indicators in the surface water samples.

Table 1: Sequences of primers and probes used for detection and quantification of enteric viruses. {G} = LNA G base; {T} = LNA T base; Y = T or C base; R = A or G base; S = C or G base; D = A, G or T base; M = A or C base; K = G or T base; V = A, C or G base; W = A or T base.

Viruses	Primers and probes	Quantification limits (genome copies/reaction)	nM	Sequences 5'-3'	Targets	References
Adenovirus ABCDEFG (AdV)	AdV_ABDEFG_F17676 AdV_ABDEFG_R17727 AdV_ABDEFG_P17694 AdV_C_F1767	10	300 900 400 300	TACATGCAYATCGCCG CGGGCRAAYTGCACC FAM-CAGGAYGCYTCGGARTAYCT-BHQ1 TACATGCACATCTCGG	Hexon	This study
Adenovirus 5 LacZ ΔE1 ΔE2	Vector_F Vector_R Vector_P	10	300 300 100	CGCATAGTTAAGCCAGTATC CTTGCCTTGTTGTAGCTTAA DFO-CTACTCAGCGACCTCCAACAC-BH02	Linking sequence	This study
Aichivirus (AichiV)	AichiV_F AichiV_R AichiV_P	10	1000 1000 200	CCCAGTGTGCGTAACCTTCT GTACCTGCCTGGCATYCCTA HEX-ACGCCCTGTGCGGGATGAAA-BHQ1	5'-UTR	Nielsen et al. (2013)
Astrovirus (AstV)	Astrovirus_F_4126 Astrovirus_R_4264 Astrovirus_P_4221	100	400 400 200	ATCACTCCATGGGAAGCTCCT GCGATGGAGTTGCTCTTCTGTG FAM-TCCAGAVTCACGAAGCTGCTTWGCAGTCC- BHQ1	ORF1-ORF2 junction	This study
Cosavirus (CosaV)	CosaV_F CosaV_R CosaV_P	100	1000 1000 200	CTCCCGTTCCTTCTTGGAC CACTGTGTGGGGTCCTTTCG FAM-AGCGATGCTGTGCGTGTGTG-BHQ1	5'-UTR	Nielsen et al. (2013)
Enterovirus (EV)	EV_F453 EV_R583 EV_P536	10	900 900 100	GCCCCTGAATGCG TGTCACCATAAGCAGY FAM-CCAAAGTAGTCGGTTCC-NFQ MGB	5'-UTR	Wurtzer et al., (2014)
Hepatitis A virus (HAV)	HAV_F276 HAV_R442 HAV_P301	100	400 900 100	GGTCAACTCCATGATTAG GCATCTCTTCATAGAAGTA FAM-CTGTAGGAGTCTAA-NFQ MGB	5'-UTR	This study
Hepatitis E virus (HEV)	HEV_F HEV_R HEV_P	10	250 250 100	GGTGGTTTCTGGGGTGAC AGGGGTTGGTTGGATGAA FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ1	Capsid	Jothikumar et al. (2006)
Bacteriophage MS2	MS2_F632 MS2_R708 MS2_P650	10	100 300 300	GTCGCGGTAATTGGCGC GGCCACGTGTTTTGATCGA FAM-AGGCGCTCCGCTACCTTGCCCT-BHQ1	Maturation protein	this study
Norovirus (NVGI and NVGII)	NVGL_F5290 NVGL_R5374 NVGL_P5318 NVGIL_F5012 NVGIL_R5080 NVGIL_P5042	10	600 300 300 900 300 200	CGYTGGATGCGSTTCCAT CTTAGACGCCATCATCATTTAC FAM-CGACYCCGTCACA-BHQ1 ATGTTYAGRTGGATGAGRTTCTC CGACGCCATCTTCATTCACA HEX-AGCACGTGGGAGGGCGATCG-BHQ1	ORF1-ORF2 junction	This study
Rotavirus A (RV-A)	RAV_F9 RAV_R83 RAV_P35	10	300 600 100	ATGSTTTTCAGTGGTTGMTGC AGCDACAACTGCRGCTTC FAM-ATGA{G}TC{T}ACDCARCA{G}A{T}GG-BHQ1	nsp3	This study
Salivirus (SaliV)	SaliV_F1 SaliV_R1 SaliV_P1 SaliV_F2 SaliV_R2 SaliV_P2	100	1000 1000 200 1000 1000 200	TAGTCGTCTTCCGGCTTGTC CCTGGGTGGTCTTGAGKTGT FAM-TGCCCAACGCCCGTACTTTGG-BHQ1 CCTCTCATGTGTGTGCCTTGG GTCCATTRCTGGACTGGTCT HEX-CTGAGACGATGTTCCGCTGTCCC-BHQ1	5'-UTR	Nielsen et al. (2013)

3 Results

3.1 Detection frequency and viral load in water samples

A total of 275 water samples collected from 11 different sample points (see sampling location on the fig. 1) were analysed: 100 samples from WWTP effluents, 100 surface water samples from the Seine River and 75 samples from its tributaries. For each water sample, recovery rate of the global control allowed to validate the analysis. Moreover, the extraction control and the competitive amplification control did not reveal any significant inhibition in accordance with the validation criteria defined in the part 2.6 (supplementary data – table S 3). All water samples were negative for HAV and HEV. During the whole year, in all water samples from the Seine River (n = 100), AdV, AstV, NVGI, NVGI and RV-A were the most abundant and frequent populations with a median viral load ranging from 10² to 10³ copies/L and detection frequency of 93%, 36%, 88%, 92% and 57%, respectively (fig. 2a). AichiV, CosaV, EV and SaliV had a median viral load inferior to 10² copies/L, with a detection frequency of 21%, 14%, 6% and 13% respectively (fig. 2a). In water samples from the tributaries (n=75), AdV, AstV, CosaV, AichiV and NVGII had a median viral load ranging from 10² to 10³ copies/L with a detection frequency 65%, 16%, 12%, 9% and 73%, respectively (fig. 2b). EV, NVGI, RV-A and SaliV presented a median viral load inferior to 10² copies/L with a detection frequency of 13%, 72%, 21% and 1% respectively (fig. 2b). In the WWTP effluents (fig. 2c), the viral loads were higher compared to surface water (fig. 2a and b). In all WWTP effluent samples (n=100), AdV and RV-A were the most abundant and frequent viruses, with a median viral load comprised between 10⁴ and 10⁵ copies/L and a detection frequency of 100% and 86% respectively (fig. 2c). In treated sewage, AstV, NVGI and NVGII had a median viral load between 10³ and 10⁴ copies/L with a detection frequency of 84%, 98% and 98% respectively (fig. 2c). AichiV, CosaV and SaliV were less abundant and frequent in treated sewage, with a median viral load ranging from 10² to 10³ copies/L, and a detection frequency of 61%, 65% and 44%, respectively. Meanwhile, EV presented the lowest viral load in the effluents, with a median viral load below 10² copies/L, and a detection frequency of 64% (fig. 2c). At the end of this one year sampling campaign, four major enteric viral populations could be distinguished from others in their frequencies and their viral loads: AdV, NVGI, NVGI and RV-A. The following results focused on these four viral populations. During the whole sampling campaign, bacterial faecal indicators (E. coli and intestinal enterococcus) were measured in parallel at the same day (or in most cases, with a time difference inferior to 24h). No correlation was found between these four viral populations and the usual faecal indicators (supplementary data - fig. S 6).

Résultats



Figure 2: Viral load of each detected enteric virus determined by real-time RT-PCR assays in water samples from (a) the Seine River (n = 100), (b) the tributaries of the Seine River (n = 75) and (c) the WWTP effluents (n = 100). Percentage represents the detection frequency of each enteric virus. The black lines represent median viral loads for each detected enteric virus. (-) means not detected.

3.2 Influence of the Paris urban area on the river Seine

The influence of the Paris urban area on the Seine River was estimated by comparing the viral loads between the sample collected the most upstream (n = 25) and the most downstream (n = 25) of the Paris urban area (fig. 1). The downstream viral loads were significantly higher than the upstream loads (Wilcoxon matched-pairs signed rank test with all p values < 0.0001) (fig. 3). The average difference of viral loads between the most upstream and the most downstream samples was 4.90×10^3 copies/L ($\pm 5.61 \times 10^3$) for AdV, 9.25×10^2 copies/L ($\pm 1.13 \times 10^3$) for NVGI, 1.41×10^2 copies/L ($\pm 1.62 \times 10^3$) for NVGII and 2.84×10^3 copies/L ($\pm 3.84 \times 10^3$) for RV-A. The detection frequency in the upstream samples (80% (20/25) for AdV, 64% (16/25) for NVGI and 84% (21/25) for NVGII was lower than the detection frequency in the downstream samples in which these viruses were always detected. To a lesser extent, the detection frequency of RV-A also increased from 28% (7/25) in the upstream samples to 84% (21/25) in the downstream samples.



Figure 3: Comparison of viral loads between the most upstream sampling point (n = 25, \square) and the most downstream sampling point (n = 25, \square) of the Paris urban area during the whole sampling campaign. Each bar represents a sampling time. (-) means not detected.

3.3 Identification of viral contamination sources

The estimation of the daily viral flux for each sampling point took into account the flow of the WWTP effluents and the tributaries, and thus allowed to assess their real impact in terms of viral contamination of the Seine River. Therefore, in order to model the contribution of tributaries and effluents of each WWTP, the Seine River was divided into three sections A, B and C (fig. 1). For the sections A and C, a WWTP effluent and a tributary were considered while for the section B, there was only a WWTP effluent. On the figure 4, for each sampling time, the left bar represents the viral flux addition from the upstream sampling point of the Seine River section and the viral flux from the potential sources (WWTP effluent and/or tributary), while the right bar represents the viral flux from the downstream sampling point of the Seine River section. The comparison between these bars allowed validating the consistency of the viral flux approach. The figure 4 shows that a major part of the viral contamination resulted from WWTP effluents while the tributaries of the Seine River played a minor role. In the section A, the Marne River contribution to the viral contamination of the Seine River could be considerable at times. In the section C, the Oise River did not seem to have a real impact on the Seine River contamination. Overall, the most important viral fluxes in the river Seine were recorded between December and March, and were mainly due to an increase in viral fluxes from the WWTP. Indeed, the incidence rates of acute diarrhea in the Ile-de-France population available from the Sentinelles network exceeded 100 cases per 100,000 inhabitants between October and April which was consistency with the viral fluxes increase from WWTP effluents (Fig. 4).

Figure 4: Observed Viral fluxes of AdV, NVGI, NVGII and RV-A over time for three different sections of the Seine River. The top, middle and down rows of viral fluxes graphs represents respectively the sections A, B and C. Each sampling time (n = 25) is composed of 2 bars. The left one is the addition of the viral flux from the sampling point the most upstream \square of the Seine River section and the viral flux from WWTP effluents \blacksquare and/or tributaries \blacksquare of the Seine River. The right one represents the viral flux from the sampling point the sampling point the most downstream \square of the Seine River section. The right one represents the viral flux from the sampling point the most downstream \square of the Seine River section. Incidence rates (cases per 100,000 inhabitants) of acute diarrhea in Ile-de-France population (data from Sentinelles network, INSERM/UPMC, http://www.sentiweb.fr).

Résultats



3.4 Seasonality of enteric viruses

In order to investigate the seasonal concentration of human enteric viruses in the surface water, a statistical test was performed for each viral population (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons post-test, n=100 p values <0.05 were considered as significant). During the winter, the viral loads of AichiV, AstV, NVGII, and RV-A were significantly higher than all other seasons with a median viral loads of 1.55 x 10³ copies/L, 1.08 x 10⁵ copies/L, 9.57 x 10⁴ copies/L and 2.11 x 10⁵ copies/L respectively. However the viral loads of AdV, NVGI and CosaV in winter were significantly higher than those measured only in summer and autumn. No significant seasonal difference of viral load was shown for EV and SaliV (fig. 5). Similar results were observed in the WWTP effluents (data not shown).



Figure 5: Viral load of each enteric virus in surface water according to season (22 in summer (n= 28), \Box in autumn (n= 24), \Box in winter (n= 24), 22 in spring (n= 24)) during the sampling campaign (n= 100). The median value is represented by a line inside the box and the minimum and maximum values by bars. (-) means not detected.

4 Discussion

Given that human enteric viruses are excreted in faeces of infected people and are mainly transmitted by ingestion of contaminated water or/and food, the monitoring of virus circulating in the environment is necessary in order to better understand the virus epidemiology and to identify the viral contamination sources. The aim of this study was to investigate the real impact of WWTP effluents in a 90 kilometers section of the Seine River for one year. In this study, the prevalence and concentration of a very large panel of human

enteric viruses were evaluated using real time RT-PCR assays in different water samples from the Seine River, its tributaries and the major wastewater effluents in the Paris urban area. To our knowledge this is the first study that clearly demonstrates the quantitative contribution of WWTP effluents. We also developed several primer sets and probes that could be valuable for the monitoring of a large panel of enteric viruses. In this study, all viral loads of human enteric viruses were calculated without considering any loss of viral particles during the steps of concentration and detection. However, the global control, the extraction control and the inhibition amplification control permitted to compare all water samples analysed even if concentrations of these viruses were probably under-estimated. Real-time PCR assays detect viral nucleic acids of both infectious and non-infectious viruses but this approach allowed to look for various enteric viruses.

4. 1 Viral population circulating in the Seine River and WWTP effluents

A huge diversity of human enteric viruses could be detected in this study with especially AdV, NVGI, NVGII and RV-A were remarkable in their high detection frequency and viral load in analysed water samples. In accordance with previous studies, no correlation was observed between faecal indicators and these four viruses, confirming that specific analysis is needed to describe any viral contamination (Contreras-Coll and others 2002; Tree and others 2003). These four viruses are frequently detected in different types of water, wastewater effluents (Prado and others 2011), river water (Hamza and others 2009) and groundwater (Jung and others 2011). Few studies with quantitative data for these four viruses are available in the literature to compare their occurrence in different waters and countries. In river water, the average viral load varied for NVGI and II and rotavirus between 2 x 10² to 2 x 10³ copies/L in Netherlands (Lodder and de Roda Husman 2005). For AdV the concentration was estimated between 10^1 to 10^4 copies/L in Spain, 6.10×10^2 to 8.51×10^2 copies/L in Taïwan (Huang and others 2014) and 4.20 x 10² to 2.70 x 10³ copies/L in Japan (Kishida and others 2014). In treated sewage, the average viral load varied for NVGI and II between 8.96 x 10² to 7.49 x 10³ copies/L in Netherlands (Lodder and de Roda Husman 2005) and up to 2.15 x 10^7 copies/L for AdV in Norway (Grøndahl-Rosado and others 2014). For RV-A the estimated concentration was 5.98 x 10² to 2.9 x 10⁴ copies/L in Netherlands (Lodder and de Roda Husman 2005). Despite the low number of studies concerning the viral load and the discrepancy between detection methods, it was noteworthy that these concentrations were in the same range. Additionally, if the size of the river was quite different between the studies, the results was similar. Further studies should focus on the population density connected to a river. In addition, 88% (241/275) of the collected samples were positive for AdV which was consistent with many studies that proposed AdV as a potential viral indicator of water contamination in several countries, for example in Spain (Albinana-Gimenez and others 2009), in New Zealand (Hewitt and others 2013) and in United states of America (Kundu and others 2013). Moreover, AichiV, CosaV and SaliV were detected for the first time in the Seine River. Their presence in surface water was not surprising in view of precedent studies realized around the world (Alcala and others 2010; Blinkova and others 2009; Haramoto and others 2013). In this study, the lack of HAV and HEV detection in all water samples was quite consistent with the low seroprevalence for HAV and HEV in Paris population (Cadilhac and Roudot-Thoraval 1996; Maylin and others 2012). The identification of WWTP as major contributor to the contamination of the Seine River by human enteric viruses was possible by estimating the viral fluxes. For instance, the relative contribution of WWTP effluents to viral contamination measured downstream of each section (A, B and C) were 56%, 72% and 73% for AdV averaged over the year, respectively. This relative contribution of WWTP effluents was 42%, 57% and 56% for NVGI, 28%, 56% and 58% for NVGII and 60%, 72% and 63% for RV-A, respectively. Even if the tributaries contribution was minor, the relative contribution of the Marne River was higher compared to the Oise River. This observation could be explained by the upstream contamination of the Seine River in each section. Indeed, despite the fact that viral fluxes of the Marne and Oise Rivers were comparable, the Seine River was less contaminated in section A (upstream to Paris area).

4.2 Temporal variation and relation with the health status of the population

All calculated viral fluxes from WWTP effluents were higher between December and March. This would mean the existence of a seasonal prevalence of human enteric viruses in the population connected to the Parisian wastewater network. This result was consistent with the observed seasonality in the epidemiology of gastroenteritis (Lorrot and others 2011). We confronted our results with the database from the French Sentinelles network, which reports weekly the French cases number of gastroenteritis requiring specialized consultation. The data comparison (fig. 4) suggested the existence of a close relationship between the health status of a population and viral contamination of WWTP effluents and surface water. However, a potential discrepancy between viruses circulating in population and isolated viruses after hospitalization could be observed. Such a difference could result by the fact that many infections are asymptomatic or pauci-symptomatic and do not need any hospitalisation (Bucardo and others 2010). Individual host factors (age, immune system, genetics ...) can probably explain the severity of infection, but differences in pathogenicity between various genotypes could also impact the care patient. The regular survey of wastewater viral quality could serve as surrogate for the evaluation of the circulating human viruses both in the human population and in the surface water. The use of high throughput sequencing approach on surface water and wastewater could permit a better prediction of epidemic outbreaks in order to optimize vaccination strategies, furthermore it could also allow an identification of potential human virus genotypes resistant to the WWTP treatments. Moreover, these viral loads present in river water are likely to have a real impact on the viral shellfish contamination (Iritani and others 2014), on the virological quality of irrigation water and consequently on the viral quality of raw vegetables and fruits (Cheong and others 2009). As a resource for drinkingwater, the river contamination could influence the tap water quality. For example in this study, the median viral load of RV-A was about 3.50×10^2 copies/L. According to the guidelines for
drinking-water quality suggested by the World Health Organization, drinking-water treatment plants related to the Seine River should provide a reduction of the viral load at least 6 \log_{10} for such concentrations of RV-A (WHO 2011). In the Paris area plants, the multistep disinfection treatments (i.e, ozonation, UV and chloration) performed after the usual physic chemical clarification were necessary. However in few cases where the viral loads were beyond the limit of 10⁴ copies/L (maximal value of 1.16 x 10⁴ copies/L in the Seine River for RV-A), the reduction should be confirmed.

5 Conclusions

The surveillance of the viral contamination of surface water in an urban area showed the huge diversity of isolated virus in water. This survey provided an overview of the viral dynamic in the Seine River around Paris area for one year. With this data, identification of the viral contamination sources could be realized by a viral flux approach, showing WWTP as the main source. The huge diversity of human enteric viruses were identified in WWTP effluents meaning that all of these viruses circulated across the local population. Moreover, in the winter period, the number of gastroenteritis cases increased, impacting directly the viral quality of the river water. Consequently, the viral quality of the river water was closely linked to the health status of the local population.

Aknowledgement

This work was funded by Eau de Paris (France) and the IIe-de-France region funded a PhD scholarship associated with this work. The authors thank warmly the sampling management departments of Eau de Paris and SIAAP to the delivery of all the water samples.

References

- Albinana-Gimenez, N.; Miagostovich, M.P.; Calgua, B.; Huguet, J.M.; Matia, L.; Girones, R. Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. Water Research. 43:2011-2019; 2009
- Alcala, A.; Vizzi, E.; Rodriguez-Diaz, J.; Zambrano, J.L.; Betancourt, W.; Liprandi, F. Molecular detection and characterization of Aichi viruses in sewage-polluted waters of Venezuela. Appl Environ Microbiol. 76:4113-4115; 2010
- Blacklow, N.R.; Greenberg, H.B. Viral gastroenteritis. N Engl J Med. 325:252-264; 1991
- Blinkova, O.; Rosario, K.; Li, L.; Kapoor, A.; Slikas, B.; Bernardin, F.; Breitbart, M.; Delwart, E. Frequent detection of highly diverse variants of cardiovirus, cosavirus, bocavirus, and circovirus in sewage samples collected in the United States. J Clin Microbiol. 47:3507-3513; 2009
- Bucardo, F.; Nordgren, J.; Carlsson, B.; Kindberg, E.; Paniagua, M.; Mollby, R.; Svensson, L. Asymptomatic norovirus infections in Nicaraguan children and its association with viral properties and histo-blood group antigens. The Pediatric infectious disease journal. 29:934-939; 2010

Cadilhac, P.; Roudot-Thoraval, F. Seroprevalence of hepatitis A virus infection among sewage workers in the Parisian area, France. European journal of epidemiology. 12:237-240; 1996

Cantalupo, P.G.; Calgua, B.; Zhao, G.; Hundesa, A.; Wier, A.D.; Katz, J.P.; Grabe, M.; Hendrix, R.W.; Girones, R.; Wang, D.; Pipas, J.M. Raw sewage harbors diverse viral populations. mBio. 2; 2011

Cheong, S.; Lee, C.; Song, S.W.; Choi, W.C.; Lee, C.H.; Kim, S.J. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. Appl Environ Microbiol. 75:7745-7751; 2009

Contreras-Coll, N.; Lucena, F.; Mooijman, K.; Havelaar, A.; Pierz, V.; Boque, M.; Gawler, A.; Holler, C.; Lambiri, M.; Mirolo, G.; Moreno, B.; Niemi, M.; Sommer, R.; Valentin, B.; Wiedenmann, A.; Young, V.; Jofre, J. Occurrence and levels of indicator bacteriophages in bathing waters throughout Europe. Water Res. 36:4963-4974; 2002

- Dorevitch, S.; Dworkin, M.S.; Deflorio, S.A.; Janda, W.M.; Wuellner, J.; Hershow, R.C. Enteric pathogens in stool samples of Chicago-area water recreators with new-onset gastrointestinal symptoms. Water Res. 46:4961-4972; 2012
- Enserink, R.; van den Wijngaard, C.; Bruijning-Verhagen, P.; van Asten, L.; Mughini-Gras, L.; Duizer, E.;
 Kortbeek, T.; Scholts, R.; Nagelkerke, N.; Smit, H.A.; Kooistra-Smid, M.; van Pelt, W.
 Gastroenteritis Attributable to 16 Enteropathogens in Children Attending Day Care. Significant
 Effects of Rotavirus, Norovirus, Astrovirus, Cryptosporidium and Giardia. The Pediatric
 infectious disease journal; 2014
- Gerba, C.P.; Rose, J.B.; Haas, C.N. Sensitive populations: who is at the greatest risk? International journal of food microbiology. 30:113-123; 1996
- Grøndahl-Rosado, R.; Yarovitsyna, E.; Trettenes, E.; Myrmel, M.; Robertson, L. A One Year Study on the Concentrations of Norovirus and Enteric Adenoviruses in Wastewater and A Surface Drinking Water Source in Norway. Food Environ Virol. 6:232-245; 2014
- Hamza, I.A.; Jurzik, L.; Stang, A.; Sure, K.; Uberla, K.; Wilhelm, M. Detection of human viruses in rivers of a densly-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. Water Res. 43:2657-2668; 2009
- Haramoto, E.; Kitajima, M.; Otagiri, M. Development of a reverse transcription-quantitative PCR assay for detection of salivirus/klassevirus. Appl Environ Microbiol. 79:3529-3532; 2013
- Hewitt, J.; Greening, G.E.; Leonard, M.; Lewis, G.D. Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. Water Res. 47:6750-6761; 2013
- Huang, Z.-M.; Hsu, B.-M.; Kao, P.-M.; Chang, T.-Y.; Hsu, T.-K.; Ho, Y.-N.; Yang, Y.-C.; Huang, Y.-L. Prevalence, quantification, and typing of human adenoviruses detected in river water in Taiwan. Environ Sci Pollut Res:1-8; 2014
- Iritani, N.; Kaida, A.; Abe, N.; Kubo, H.; Sekiguchi, J.; Yamamoto, S.P.; Goto, K.; Tanaka, T.; Noda, M. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. Journal of medical virology. 86:2019-2025; 2014
- Jothikumar, N.; Cromeans, T.L.; Robertson, B.H.; Meng, X.J.; Hill, V.R. A broadly reactive one-step realtime RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. J Virol Methods. 131:65-71; 2006
- Jung, J.H.; Yoo, C.H.; Koo, E.S.; Kim, H.M.; Na, Y.; Jheong, W.H.; Jeong, Y.S. Occurrence of norovirus and other enteric viruses in untreated groundwaters of Korea. Journal of water and health. 9:544-555; 2011
- Kishida, N.; Noda, N.; Haramoto, E.; Kawaharasaki, M.; Akiba, M.; Sekiguchi, Y. Quantitative detection of human enteric adenoviruses in river water by microfluidic digital polymerase chain reaction.
 Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research. 70:555-560; 2014
- Kitajima, M.; Haramoto, E.; Phanuwan, C.; Katayama, H.; Furumai, H. Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. J Appl Microbiol. 112:605-613; 2012

- Kundu, A.; McBride, G.; Wuertz, S. Adenovirus-associated health risks for recreational activities in a multi-use coastal watershed based on site-specific quantitative microbial risk assessment. Water Research. 47:6309-6325; 2013
- Lodder, W.J.; de Roda Husman, A.M. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. Appl Environ Microbiol. 71:1453-1461; 2005
- Lodder, W.J.; Rutjes, S.A.; Takumi, K.; de Roda Husman, A.M. Aichi virus in sewage and surface water, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 19:1222-1230; 2013
- Lorrot, M.; Bon, F.; El Hajje, M.J.; Aho, S.; Wolfer, M.; Giraudon, H.; Kaplon, J.; Marc, E.; Raymond, J.;
 Lebon, P.; Pothier, P.; Gendrel, D. Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France.
 European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 30:361-368; 2011
- Lucas, F.S.; Therial, C.; Goncalves, A.; Servais, P.; Rocher, V.; Mouchel, J.M. Variation of raw wastewater microbiological quality in dry and wet weather conditions. Environmental science and pollution research international. 21:5318-5328; 2014
- Maunula, L.; Miettinen, I.T.; von Bonsdorff, C.H. Norovirus outbreaks from drinking water. Emerg Infect Dis. 11:1716-1721; 2005
- Maylin, S.; Stephan, R.; Molina, J.M.; Peraldi, M.N.; Scieux, C.; Nicand, E.; Simon, F.; Delaugerre, C. Prevalence of antibodies and RNA genome of hepatitis E virus in a cohort of French immunocompromised. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 53:346-349; 2012
- Nielsen, A.C.; Gyhrs, M.L.; Nielsen, L.P.; Pedersen, C.; Bottiger, B. Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus, and salivirus in young children. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 57:239-242; 2013
- Patil, P.R.; Chitambar, S.D.; Gopalkrishna, V. Molecular surveillance of non-polio enterovirus infections in patients with acute gastroenteritis in Western India: 2004-2009. Journal of medical virology. 87:154-161; 2015
- Prado, T.; Silva, D.M.; Guilayn, W.C.; Rose, T.L.; Gaspar, A.M.; Miagostovich, M.P. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. Water Res. 45:1287-1297; 2011
- Rajko-Nenow, P.; Waters, A.; Keaveney, S.; Flannery, J.; Tuite, G.; Coughlan, S.; O'Flaherty, V.; Dore, W. Norovirus genotypes present in oysters and in effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland in 2010. Appl Environ Microbiol. 79:2578-2587; 2013
- Tree, J.A.; Adams, M.R.; Lees, D.N. Chlorination of indicator bacteria and viruses in primary sewage effluent. Appl Environ Microbiol. 69:2038-2043; 2003
- WHO. Guidelines for drinking-water quality, fourth edition: World Health Organization; 2011
- Wurtzer, S.; Prevost, B.; Lucas, F.S.; Moulin, L. Detection of Enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. Journal of virological methods; 2014a
- Wurtzer, S.; Prevost, B.; Lucas, F.S.; Moulin, L. Detection of enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. J Virol Methods. 209:47-54; 2014b
- Yezli, S.; Otter, J. Minimum Infective Dose of the Major Human Respiratory and Enteric Viruses Transmitted Through Food and the Environment. Food Environ Virol. 3:1-30; 2011

Supplementary data

Table S 1: Mean measured flow in m^3/day for each sampling points and times. • (the river Seine), • (Tributaries of the river Seine, the river Marne and the river Oise) and \blacktriangle (WWTP effluents) represent the sampling points of the figure 1.

Mean sampling point flows (m³/day)

Sampling dates	• ¹	▲ ²	∎ ³	• ⁴	▲5	• ⁶	▲7	∎ ⁸	• ⁹	▲ ¹⁰
29-Apr-13	3,13E+07	4,80E+05	8,38E+06	3,97E+07	2,36E+05	3,99E+07	1,40E+06	8,47E+06	4,68E+07	1,49
10-Jun-13	4,02E+07	6,05E+05	1,16E+07	5,18E+07	2,35E+05	5,20E+07	1,44E+06	8,99E+06	6,25E+07	1,60
24-Jun-13	2,50E+07	5,24E+05	1,27E+07	3,77E+07	2,39E+05	3,79E+07	1,46E+06	1,27E+07	5,31E+07	1,81
22-Jul-13	1,10E+07	4,04E+05	5,44E+06	1,64E+07	2,36E+05	1,67E+07	1,27E+06	4,75E+06	2,22E+07	1,89
29-Jul-13	1,24E+07	4,67E+05	6,65E+06	1,91E+07	2,37E+05	1,93E+07	1,71E+06	7,08E+06	2,87E+07	1,97
5-Aug-13	9,85E+06	3,59E+05	5,01E+06	1,49E+07	2,06E+05	1,51E+07	1,05E+06	3,63E+06	2,12E+07	1,87
19-Aug-13	9,50E+06	3,40E+05	4,75E+06	1,43E+07	1,93E+05	1,44E+07	1,05E+06	3,89E+06	2,11E+07	2,04
2-Sep-13	9,42E+06	3,94E+05	5,10E+06	1,45E+07	1,96E+05	1,47E+07	1,19E+06	3,46E+06	1,86E+07	2,51
16-Sep-13	1,13E+07	3,72E+05	7,60E+06	1,89E+07	1,94E+05	1,91E+07	1,97E+06	3,63E+06	2,51E+07	1,98
30-Sep-13	1,25E+07	2,64E+05	7,69E+06	2,02E+07	2,39E+05	2,05E+07	1,67E+06	3,80E+06	2,79E+07	6,13
14-Oct-13	2,74E+07	3,52E+05	1,18E+07	3,92E+07	1,82E+05	3,94E+07	1,34E+06	5,36E+06	4,71E+07	1,77
28-Oct-13	3,62E+07	6,08E+05	1,85E+07	5,47E+07	2,94E+05	5,50E+07	1,52E+06	9,59E+06	6,40E+07	2,34
18-Nov-13	4,70E+07	5,15E+05	2,98E+07	7,68E+07	3,21E+05	7,71E+07	1,46E+06	1,58E+07	9,37E+07	1,12
2-Dec-13	3,48E+07	4,87E+05	2,11E+07	5,59E+07	3,29E+05	5,62E+07	1,38E+06	8,90E+06	6,39E+07	3,55
16-Dec-13	2,54E+07	4,60E+05	1,10E+07	3,64E+07	3,37E+05	3,67E+07	1,34E+06	7,26E+06	4,46E+07	7,11
6-Jan-14	3,58E+07	5,56E+05	1,68E+07	5,26E+07	2,34E+05	5,29E+07	1,44E+06	1,94E+07	7,12E+07	5,53
27-Jan-14	4,08E+07	7,18E+05	1,67E+07	5,75E+07	2,33E+05	5,77E+07	1,62E+06	1,80E+07	7,72E+07	6,73
3-Feb-14	4,19E+07	6,08E+05	2,10E+07	6,29E+07	2,39E+05	6,31E+07	1,61E+06	1,99E+07	8,59E+07	6,17
17-Feb-14	4,67E+07	5,63E+05	1,94E+07	6,62E+07	2,30E+05	6,64E+07	1,50E+06	2,02E+07	8,75E+07	5,22
3-Mar-14	4,92E+07	7,37E+05	2,00E+07	6,92E+07	2,34E+05	6,94E+07	2,37E+06	1,97E+07	8,88E+07	8,34
17-Mar-14	2,41E+07	5,23E+05	9,68E+06	3,38E+07	2,32E+05	3,40E+07	1,40E+06	1,27E+07	4,87E+07	1,26
30-Mar-14	1,75E+07	4,00E+05	7,34E+06	2,48E+07	2,39E+05	2,50E+07	1,42E+06	1,04E+07	3,72E+07	1,29
14-Apr-14	1,30E+07	3,97E+05	5,53E+06	1,85E+07	2,36E+05	1,87E+07	1,40E+06	8,47E+06	3,00E+07	1,49
28-Apr-14	1,25E+07	5,00E+05	4,75E+06	1,73E+07	1,98E+05	1,75E+07	1,33E+06	7,17E+06	2,71E+07	1,21
12-May-14	1,12E+07	4,94E+05	5,10E+06	1,63E+07	2,45E+05	1,66E+07	2,04E+06	8,29E+06	2,68E+07	1,16
Mean annual flow (m³/dav)	2,54E+07	4,85E+05	1,17E+07	3,72E+07	2,40E+05	3,74E+07	1,49E+06	1,01E+07	4,88E+07	1,35

|Ct blank - Ct water sample|

Table S 2: Monitoring of inhibition related to water samples on obtained results and % recovery of global control during the whole sampling campaign (n = 275).

Sampling periods	Number of water samples	% Recovery of global control median (min - max)	Extraction and reverse transcriptase control median (min - max)	Competitive inhibition control median (min - max)
Summer	77	28 (21 - 33)	0.64 (0.11 - 1.46)	0.55 (0.09 - 1.27)
Autumn	66	23 (19 - 38)	0.48 (0.08 - 1.23)	0.43 (-0.13 - 1.06)
Winter	66	25 (18 - 34)	0.57 (0.22 - 1.39)	0.62 (0.04 - 1.33)
Spring	66	25 (18 - 31)	0.61 (0.28 - 1.29)	0.48 (0.18 - 1.58)

NVGI AdV Number of fecal indicators/100m L N um ber of fecal in dicators/100m L 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 1 0 10 (-) 10 (-) 10 10 10 10 10 10 10 1.0 10 (-) 1.0 1.0 1.0 c o p i e s / L copies/L NVGII R V - A N um ber of fecal indicators/100m L N um ber of fecal in dicators/100m L 10 10 10 10 10 10 10 1.0 1.0 1.0 10 10 (-10 10 10 5 10 (-) 10 10 10 10 10 10 10 10 10^{4} copies/L c o p i e s / L

Figure S 6: Correlation between observed viral loads and number of fecal indicators (*E. coli* \bullet and intestinal enterococcus \bullet) in surface water sample (n = 150) during the whole sampling campaign. For AdV, Spearman correlation coefficient (r) and p-value were 0,01042 (-0,1751 to 0,1548) and 0,8993 with *E. coli* and 0,003575 (-0,1707 to 0,1637) and 0,9658 with intestinal

147

enterococcus. For NVGI, r and p-value were 0,07586 (-0,09023 to 0,2378) and 0,3562 with *E. coli* and 0,08325 (-0,08514 to 0,2470) and 0,3178 with intestinal enterococcus, respectively. For NVGII, r and p-value were -0,03535 (-0,1991to 0,1304) and 0,6676 with *E. coli* and -0,02022 (-0,1868 to 0,1475) and 0,8086 with intestinal enterococcus, respectively. For RV-A, r and p-value were -0,1348 (-0,2932 to 0,03087) and 0,1001 with *E. coli* and -0,09028 (-0,2537 to 0,07810) and 0,2785 with intestinal enterococcus, respectively. (-) means not detected.

Conclusion du chapitre 1

Sur la base de l'étude des *Enterovirus*, les résultats issus de l'article 1 ont permis de juger la pertinence de l'utilisation de kits commerciaux de détection de virus entériques sur des matrices d'eau environnementale. La plupart de ces kits se sont avérés peu performants par rapport aux outils que nous avions développés, notamment du fait d'une sensibilité aux inhibiteurs présents dans les matrices hydriques. De plus, les résultats obtenus soulignaient que ce type échantillon est 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*.

L'article 2 a quant lui permis de mettre en évidence la circulation d'un large panel de virus entériques tout au long de l'année et ce même en dehors de la période épidémique, qui pour la plupart de ces virus se situe durant la période hivernale. Ce résultat suggère qu'une part importante des infections virales est asymptomatique ou que tout du moins une part de la population reste en permanence infectée par des virus entériques.

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. 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 une sédimentation de ces particules virale relativement faible ou tout du moins équivalente à la quantité de virus remobilisée par remise en suspension des sédiments.

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 x 10⁴ 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.

Chapitre 2: Analyse de la diversité des astrovirus et norovirus humains circulants dans l'environnement

Introduction

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.

Cette étude s'est donc intéressée à 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 qui ont en charge le traitement des eaux usées d'environ 9 millions d'habitants (environ 15% de la population française). Cette approche a également pour objectif 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 microorganismes 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). Les résultats qui font l'objet de ce chapitre 2 sont décrits dans l'article 3 soumis au journal « Applied and Environmental Microbiology ».

Article 3: Deciphering the astrovirus and norovirus diversity in wastewater treatment plant effluents

Authors: Prevost B¹, Lucas FS¹, Ambert-Balay K², Pothier P², Moulin L³, Wurtzer S³

Affiliations:

¹ LEESU (UMR MA 102, Université Paris-Est, Agro ParisTech), Université Paris-Est Créteil, 61, Avenue du Général-de-Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

² National Reference Centre for Enteric Viruses, CHU Dijon, 2 rue Angélique Ducoudray, 21070 Dijon, France

³ Eau de Paris, DRDQE, R&D biologie, 33, Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry sur seine, France

*Corresponding author: Laurent.moulin@eaudeparis.fr

Abstract

Although clinical epidemiology lists human enteric viruses among the primary causes of acute gastroenteritis in human population, their circulation in the environment remains poorly investigated. These viruses are excreted by the human population into the sewers, and may be released in the rivers through the effluents of wastewater treatment plants (WWTP). In order to evaluate the viral diversity and loads found in WWTP effluents of Paris urban area, representing about 9 million inhabitants (approximately 15% of the French population), the seasonal occurrence of astrovirus and norovirus was investigated over one year in 100 WWTP effluent samples. The coupling of these measurements with a high throughput sequencing approach allowed to estimate specifically the diversity of human astrovirus (HAstV-1, HAstV-2, HAstV-5 and HAstV-6), norovirus of genogroup I (NoV GI.1 to NoV GI.6 and NoV GI.8) and genogroup II (NoV GII.1 to NoV GII.7, NoV GII.9, NoV GII.12 to NoV GII.15, NoV GII.17, NoV GII.20 and NoV GII.21) in effluent samples. Comparison of the viral diversity in WWTP effluents to clinical data throughout France underlined a consistency between identified genotypes. However, some genotypes were locally present in effluents and were not found in clinical analysis. These findings could highlight an underestimation of enteric virus diversity circulating into the human population. Consequently, analysis of WWTP effluents could allow the exploration of the viral diversity in environmental waters but also in a population linked to a sewerage network in order to lead to a better comprehension of viral epidemiology and to forecast seasonal outbreaks.

Key words

astrovirus, norovirus, wastewater, high throughput sequencing, epidemiology

Introduction

Epidemiology of viral gastroenteritis is mainly conducted on clinical dataset. However, clinical data provide a partial vision of gastroenteritis viruses circulating in the human population. Indeed, a lot of viral infections do not require specialized consultations or hospitalizations, and finally they are not directly included in the clinical statistics. Moreover, since there is no systematic identification of pathogens for each gastroenteritis case reported, this research being usually limited to immune-compromised patients, young children and elderly people, the clinical data obviously cannot reach the real viral diversity of the population. As a consequence these datasets offer a limited view of the enteric viral diversity and occurrence inside the human population.

Human astroviruses (HAstV) and noroviruses (NoV) are among the main causes of human acute gastroenteritis worldwide (Jeong et al. 2011; Lopman et al. 2011). HAstV and NoV are non-enveloped viruses and have a positive-sense single stranded RNA. The genome of HAstV is composed by three open-reading frames (ORF), and ORF2, encoding capsid protein precursor, allows to discriminate eight genotypes, HAstV-1 to HAstV-8 (Belliot et al. 1997). HAstV-1 has been recognized as the most prevalent genotype throughout the world, and the second common genotype differs in different geographic regions (De Benedictis et al. 2011; Mendez-Toss et al. 2004; Silva et al. 2006). The genome of NoV is also composed by three ORF, and the genotyping based on genetic similarity of ORF2 and 3 allows to discriminate 9 genotypes of genogroup I NoV (NoV GI), 22 genotypes of genogroup II NoV (NoV GII), which are the most common genogroups associated with human infections. Worldwide, the prevalent genotype described in NoV outbreaks was NoV GII.4 (Desai et al. 2012; Zheng et al. 2010).

HAstV and NoV are able to infect all ages and cause a great variety of symptoms as vomiting, diarrhea and nausea, abdominal pain and dehydration (Bhattacharya et al. 2006; Gallimore et al. 2004). These enteric viruses are very contagious given that they have a low infectious dose (Blacklow and Greenberg 1991; Kirby et al. ; Kirby et al. 2015; Teunis et al. 2008) and their major transmission mode is the fecal-oral route, either directly by person-to-person contact (Deneen et al. 2000; Walter and Mitchell 2000) or indirectly by ingestion of contaminated food or water (LeBaron et al. 1990; Meakins et al. 2003). A high quantity of viral particles are excreted in feces (Atmar et al. 2008; Zhang et al. 2006) and finally they are circulated through the wastewater network (Aw and Gin 2010; Katayama et al. 2008). Generally viruses are not eliminated by the wastewater treatment plants (WWTP) and, as a consequence, they can be released in rivers at noticeable levels (He et al. 2011; Kitajima et al. 2012; Prevost et al. 2015). At our knowledge, no information concerning any evolution of virus diversity in WWTP was

available. Consequently, WWTP effluents could be representative of the viruses circulating in environmental waters but also in the human population.

Recent studies suggested the existence of a relationship between the viruses spread into a sewerage network and the health status of the local population (Hellmer et al. 2014; Prevost et al. 2015). In order to estimate, a seasonal monitoring of concentration and diversity of HAstV, NoV GI and NoV GII was performed over one year in WWTP effluents from the Paris urban area. At the same period HAstV and NoV genotypes were determined in fecal clinical samples collected in the whole country by the French National Reference Centre for Enteric Viruses. The two datasets were confronted in order to enrich the evaluation of the viral diversity circulating in the infected human population taking into account both the sick population and the healthy one. The main goal of this study was to highlight the interest of monitoring enteric viruses in WWTP effluents in order to appreciate the viral diversity circulating in rivers but also to evaluate it in a consistent population linked to a sewerage network.

Materials and methods

Sampling campaign

From May 2013 to May 2014, 4 major WWTP were sampled in Paris area (France) in order to determine the concentration and the diversity of HAstV and NoV GI and II in their effluents. Samples of 10 L were collected twice a month, for a total of 100 samples: 24 samples in spring, 28 samples in summer, 24 samples in autumn and 24 samples in winter. Each sample was stored at 4°C for 24h at the most before the concentration of the viral particles. These samples were collected from the WWTP Seine-Amont (Valenton, France), Seine Centre (Colombes, France), Seine-Aval (Achères, France) and Seine Grésillons (Triel-sur-Seine, France) which treat wastewater of 263 municipalities, representing about 9 million inhabitants (approximately 15% of the French population). These WWTP are designed to eliminate classical pollutants (carbon, nitrogenous, and phosphorus) using primary decantation and biological secondary treatment (details in (Prevost et al. 2015)). During the same period, 1395 stool samples were collected from 669 sporadic cases and 726 samples from 230 outbreaks of gastroenteritis by the National Reference Centre for enteric viruses in Dijon (France) as part of their routine national monitoring.

Viral concentration from wastewater samples

Effluents samples were concentrated by three successive filtration/concentration steps following (Wurtzer et al. 2014). Briefly, 10 L of sample was filtered using electropositive filters (NanoCeram[®] Virus Samplers, Argonide, Sanford, FL). Filters were then sonicated at 4°C for 1 h in an elution buffer composed of 1% beef extract (Bacto[®] Beef Extract Dessicated, BD

Bioscience, Franklin Lakes, NJ), 0.05M glycine (Merck[®], Darmstadt, Germany), 0.1% Tween 80 (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 0.1% sodium polyphosphate (Sigma Aldrich, St Louis, MO), adjusted at pH 9.5. Then the viruses were eluted in an inverted flow. The pH was adjusted to 3.5, allowing virus flocculation under slow magnetic agitation for 1 h and followed by a centrifugation at 4000xg at 4°C for 2 h. The pellet was resuspended in PBS 1x (pH 9) and was ultracentrifugated on 1mL of 40% sucrose at 150,000xg at 4°C for 2 h. Finally, the pellet was resuspended in 1 mL of 40% sucrose.

Extraction of viral nucleic acid from wastewater samples and stool samples

For the effluents samples, viral nucleic acids from the resuspended pellets were extracted with a MagNA Pure Compact extractor and MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume (Roche Applied Science, Bâle, Switzerland), allowing to process up to 1 mL samples according to the manufacturer's instructions. Extracted nucleic acids were immediately analyzed and the leftover was stored at -80°C.

For the stool samples, viral nucleic acids was extracted from 20 % stool suspensions in phosphate-buffered saline using NucliSENS[®] EasyMAGTM platform (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions.

Quantification of viral nucleic acid from wastewater samples

For each effluents samples (n=100), one-step Reverse Transcription - quantitative PCR (RTqPCR) assays for HAstV, NoV GI and II were performed in a reaction volume of 20 µL containing 5 µL of RNA, specific primers and probes for each virus and TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations. These assays, primers and probes were previously described in (Prevost et al. 2015). Each amplification run included a no template control and a positive amplification control based on the plasmid used to perform standard curves. Results reported for each sample were means of duplicate. The raw amplification data were collected with ViiA[™] 7 software version 1.2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA) and then processed with Excel software (Microsoft, Redmond, WA).

Viral concentration controls and analysis validation criteria

Three controls were included in order to confirm the good recovery rate of the concentration and detection method as described previously (Prevost et al. 2015). A global control, an adenovirus 5 LacZ Δ E1 Δ E3 produced by transfection of pAD/CMV/V5-GW/LacZ vector (Life Technologies, Carlsbad, CA) in 293A cells, was beforehand seeded at 10,000 genome units in each water sample before the concentration steps. A bacteriophage MS2, used as an extraction control and as a control of reverse transcription step, was seeded at 10,000 genome units in each concentrated water samples just before the extraction step. A competitive inhibition control of the amplification step, made of a partial sequence of human β -actin gene cloned into pCR2.1 TOPO vector (Life Technologies, Carlsbad, CA) and 1000 genome units was added after extraction of total nucleic acids. If the recovery rate of the global control was at least equal to the lower limit determined in spiked experiments (i.e., 18%) and if no inhibition of extraction and amplification controls was observed, then the results would be validated. If an inhibition of extraction and/or amplification controls was observed (i.e., a Cycle threshold (Ct) shift greater than 2 cycles between the water sample and blank sample), then a dilution of extracted nucleic acids could be tested to overcome the inhibition. If the recovery rate was not validated and if any inhibition of the two other controls was observed, the sample would be excluded of the analysis.

Detection of viral nucleic acid from stool samples

HAstV and NoV GI and NoV GII were detected by one-step RT-qPCR using probes previously described (Le Cann et al. 2004), (Lyman et al. 2009) and (Loisy et al. 2005), respectively, and the TaqMan[®] Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations.

Genotyping of viral nucleic acids from wastewater and stool samples

For wastewater samples, sequencing PCR amplifications were performed independently for HAstV, NoV GI and NoV GII on each samples that were positive for the RT-qPCR. Then the PCR products were pooled according to the season, resulting in 4 average samples, one for each season. The sequencing was performed on these 4 pooled samples.

A step of reverse transcription at 50°C for 30 min using random primers and Superscript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA) was performed. Then a first PCR was performed with an initial denaturation at 94°C for 30s, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, primer annealing at 50°C for 30 s, extension reaction at 68°C for 1 min and then a final extension at 68°C for 5 min. The first PCR reaction was performed using Taq Platinum High Fidelity polymerase (Life Technologies, Carlsbad, CA) within 50 μ L reaction volume and with 5 μ L of cDNA. The first set of primers used for NoV GI were COG1F and G1SKR, for NoV GII COG2F and G2SKR. A semi nested-PCR was then performed in the same conditions than the first PCR with the following second set of primers: G1SKF and G1SKR for NoV GI; G2SKF and G2SKR for NoV GII. Primers for NoV genotyping were previously described (Kageyama et al. 2003; Kojima et al. 2002). For HAstV genotyping, the primers MON270 and MON269 were used (Noel et al. 1995) and no semi-nested PCR was performed. Each positive sample with the RT-qPCR (part 2.4) was also positive with the genotyping PCR.

Then, a last PCR step was performed with a forward primer containing the forward primer sequence (MON270, G1SKF or G2SKF), an adaptor sequence, a barcode sequence and a 10 pb multiplex identifier (MID). The specific MID was selected in order to discriminate each season. The reverse primer was constructed with the reverse primer sequence (MON269, G1SKR or G2SKR) and an adaptor sequence. In accordance with the manufacturer's recommendations for preparation of amplicon library, amplicons were purified, quantified and normalized to equimolar concentrations for each sample and then pooled for each season. Emulsion PCR (emPCR) amplification and pyrosequencing were performed with a Lib-L kit and with a GS Junior system, respectively, according to the manufacturer's recommendations (Roche Applied Science, Bâle, Switzerland). Finally, raw sequences and quality files were extracted for data processing.

For stool samples, genotyping of HAstV, NoV GI and NoV GII from positive samples was performed by sequencing a gene fragment, as described previously (Sdiri-Loulizi et al. 2009a; Sdiri-Loulizi et al. 2009b), on a 3130XL DNA Genetic Analyser (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Data processing of sequencing reads

All analysis of sequencing data were performed using QIIME software 1.9.0 version (Caporaso et al. 2010). Only sequences between 200 and 1000 bp were conserved, as well as sequences harboring an overall quality score above 25, less than 3 ambiguous bases, and with no mismatch in primers sequences. After the selection of high quality sequences, sequences were clustered into OTUs (Operational Taxonomy Unit) with a 100% similarity threshold. For each virus, reference sequences came from NCBI database and were aligned using MEGA 6 software (Tamura et al. 2013). A minimum of two representative reference sequences for each genotype were used (Table S 1). All sequence alignments were performed using CLUSTAL W algorithm. Aligned sequences were truncated in order to target the same genomic regions as sequences obtained by high throughput sequencing. A Fasta file, containing all OTU, was queried against the file of reference sequences using BLAST algorithm in order to determine the OTU genotype. Below the threshold of 90% identity and an e-value > 0.0001, OTUs were considered as unidentified. The phylogenetic tree was created using the neighbor-joining method with a Kimura two parameter model in MEGA 6 software, and branch support was calculated based on 1000 bootstrap replicates. Nucleotide sequences of reference NoVGII.4 variants were collected from the NCBI database.

All identified OTU sequences have been deposited in GenBank under accession numbers X to Y.

Résultats

Statistical analysis

Statistical analyses were performed on the quantification data only (n=100), using GraphPad Prism version 6.01 software (GraphPad, La Jolla, CA). Kruskal-Wallis tests with Dunn's multiple comparisons post-test were performed to highlight the seasonality of HAstV, NoV GI and NoV GII in samples of WWTP effluents, p values < 0,05 were considered as significant.

Results

Viral loads and prevalence in WWTP effluents

For each RT-qPCR assay, all no template controls were negative and all positive amplification controls were positive (data not shown). For each effluent sample, recovery of global control allowed to validate the results (recovery rate > 18%). Moreover, the extraction control and the competitive amplification control did not reveal any significant inhibition in accordance with the inhibition threshold defined in materials and methods. The median viral load and prevalence in all effluent samples (n = 100) were respectively 2.69 x 10³ copies/L and 83% for HAstV, 3.97 x 10³ copies/L and 97% for NoV GI and 6.80 x 10³ copies/L and 97% for NoVGII. (Table 1). The highest values of viral load for HAstV, NoV GI and NoV GII were all detected in winter with 1.39 x 10⁶ copies/L, 2.04 X 10⁵ copies/L and 2.92 x 10⁵ copies/L, respectively. Winter was significantly the season during which the viral loads were uppermost for HAstV and NoV GII. However, only the viral loads measured of NoV GI in winter and spring were significantly higher than those in summer and autumn.

Seasons	Number of analysed	Viral prevalence (%)				Median viral load (copies/L) (min -max)			
	samples	HAstV	NoV GI	NoV GII	· –	HAstV	NoV GI	NoV GII	
Spring	24	83	100	100		6.50 x 10 ³ (0 - 4.87 x 10 ⁵)	1.65 x 10 ⁴ (4.04 x 10 ² - 1.03 x 10 ⁵)	1.11 x 10 ⁴ (1.69 x 10 ¹ - 1.12 x 10 ⁵)	
Summer	28	79	93	93		1.66 x 10 ² (0 - 1.04 x 10 ⁴)	4.58 x 10 ² (0 - 4.88 x 10 ³)	1.49 x 10 ³ (0 - 1.13 x 10 ⁴)	
Autumn	24	75	100	96		2.03 x 10 ³ (0 - 2.00 x 10 ⁵)	3.82 X 10 ³ (8.79 x 10 ¹ - 3.60 x 10 ⁴)	4.40 x 10 ³ (0 - 1.41 x 10 ⁵)	
Winter	24	96	96	100		1.09 x 10⁵ (0 - 1.39 x 10 ⁶)	5.09 x 10 ⁴ (0 - 2.04 x 10 ⁵)	9.58 x 10 ⁴ (2.49 x 10 ³ - 2.92 x 10 ⁵)	
Total	100	83	97	97		2.69 x 10 ³ (0 - 1.39 x 10 ⁶)	3.97 x 10 ³ (0 - 2.04 X 10 ⁵)	6.80 x 10 ³ (0 - 2.92 x 10 ⁵)	

Table 1: Seasonal viral loads and prevalence for HAstV, NoV GI and NoV GII from 10 effluent samples from four WWTPs.

Viral diversity from WWTP effluents

A high throughput sequencing approach has been set up in order to determine genotype variations according to seasons. A total of 5990, 7469 and 6299 sequences were generated from the samples that were positive for HAstV, NoV GI and NoV GII, respectively. The identified genotypes from WWTP effluent samples were shown on the left column of figure 1. Four genotypes of HAstV were identified HAstV-1, HAstV-2, HAstV-5 and HAstV-6. HAstV-1 represented 76% of identified genotypes over the year and was clearly the principal genotype whatever the season (66% of the sequences in spring, 67% in summer, 75% in autumn and 92% in winter). HAstV-5 was also identified in every season (3% in spring, 25% in summer, 15% in autumn and 4% in winter) whereas HAstV-2 were only detected in autumn (3%) and winter (3%). HAstV-6 was only detected in winter (< 1%).

For NoV GI positive samples, 7 human genotypes were present and NoV GI.4 was always the predominant genotype with a detection rate about 47% in spring and 64% in autumn. The other genotypes were globally detected at 16% for NoV GI.2, 1% for NoV GI.3, 12% for NoV GI.5 and 8% for NoV GI.6. The genotypes NoV GI.1 and NoV GI.8 showed lower occurrences with less than 0.5% of sequences.

For NoV GII, 16 different genotypes (NoV GII.1 to 7, NoV GII.9, NoV GII.12 to NoV GII.17, NoV GII.20 and NoV GII.21) were identified among the 19 known genotypes infecting Human. In winter, 7 genotypes could be detected among which NoV GII.1, NoV GII.2, NoV GII.6, NoV GII.13 and NoV GII.14 had a detection rate below 2% and about 10% for NoV GII.3. NoV GII.4 was present in 86% of samples and is the most prevalent genotype. In autumn, among the 12 identified genotypes, only NoV GII.3 and NoV GII.4 were above 10% with 37% and 26%, respectively. In spring, the four most represented genotypes were NoV GII.4 with 40%, NoV GII.13 with 20%, NoV GII.1 with 16% and NoV GII.3 with 11%, among the 11 identified genotypes. In summer, 14 different genotypes were identified and the highest detection percentage was 18% for NoV GII.13.



Figure 1: Genotype diversity of HAstV (n= 5990), NoV GI (n= 7469) and NoV GII (n= 6299) from WWTP effluents according to season between May 2013 and May 2014 was represented in the left column. Genotype diversity of HAstV (n = 15), NoV GI (n= 38) and NoV GII (n= 256) from clinical data throughout France according to season between May 2013 and May 2014 was represented in the right column. Each line represents the diversity for one type of virus.

Viral diversity from stool samples

During the same period, only 18 strains were detected in Paris urban area corresponding to 1 HAstV and 17 NoV GII. In order to have a more relevant vision of HAstV, NoV GI and NoV GII strains circulating in population, and since the study area represented a large part of the French population, the comparison of viral diversity was realized with national data. Thus, a total of 309 strains corresponding to 15 HAstV, 38 NoV GI and 256 NoV GII were identified (supplementary data, Table S 2) throughout France. The genotypes were counted from each isolated infection and each epidemic event. The highest number of positive stools for HAstV and for NoV GI was observed in spring with 9 (60%) and 17 (45%) respectively, while it was 70 (27%) for NoV GII. In winter, 4 (27%) HAstV positive stools were collected, 16 positive (42%) for NoV GI and 119 positive (46%) for NoV GII. In summer and in autumn, only 1 (about 7%) and 1 (about 7%) positive stool for HAstV, 4 (10%) and 1 (about 3%) for NoV GI and 27 (10%) and 40 (16%) for NoV GII were found, respectively.

Viral diversity found in stool samples is shown in the right column of figure 1. For HAstV, in spring positive samples corresponded to 9 identified gastroenteritis cases mainly related to HAstV-5 (n = 5) and to a lesser extent related to HAstV-1 (n = 2) and HAstV-2 (n = 1). In summer and autumn, only one positive sample was isolated with an unidentified and HAstV-5 genotypes, respectively. In winter, three HAstV-5 sequences could be identified among 4 positive cases.

For NoV GI, 45% (17/38) of reported cases, involving 8 different genotypes (NoV GI.1 to NoV GI.4, NoV GI.6, NoV GI.8, NoV GI.9 and NoV GI.6), were identified in spring and 42% (16/38) involving 5 genotypes (NoV GI.2, NoV GI.3, NoV GI.4, NoV GI.6 and NoV GI.9) in winter (supplementary data, Table S 2). In opposition, during summer and autumn periods, this rate was clearly lower with a respective value of 11% (4/38) and <3% (1/38). Among the 4 positive samples in summer, 2 cases of NoV GI.3 and 2 of NoV GI.6 could be identified. Moreover, 2 recombinant strains NoV GI.b/I.6 and NoV GI.b/I.4 were detected in 8 cases and 1 case, respectively (Table S2).

Two hundred fifty six cases linked to NoV GII was reported between May 2013 and May 2014 whose 59% (152/256) were NoV GII.4. The highest detection rate of epidemic cases was found in winter with 46% (119/256) and NoV GII.4 was the main involved genotype with 62% (74/119). During this season, 6 genotypes were identified, NoV GII.2 to NoV GII.4, NoV GII.6, NoV GII.7 and NoV GII.17. For the other seasons, NoV GII.4 was still the main identified genotype and several genotypes were found, 4 (NoV GII.2, NoV GII.4, NoV GII.6 and NoV GII.17) in spring, 6 (NoV GII.4, NoV GII.6, NoV GII.7, NoV GII.10, NoV GII.14 and NoV GII.16) in summer and 5 (NoV GII.2, NoV GII.4, NoV GII.6, NoV GII.6, NoV GII.7 and NoV GII.14) in autumn. Additionally, 5 NoV GII recombinants were identified (NoV GII.c/II.1, NoV GII.2, NoV GII.2

Analysis of NoV GII.4 variants

Among stool samples, a total of 153 were positive for NoV GII.4 which could be composed of 4 NoV GII.4 2006.a, 3 NoV GII.4 2006b, 14 NoV GII.4 2009 and 131 NoV GII.4 2012 (supplementary data, Table S 2). In WWTP effluents, the major change in repartition of viral diversity was observed in winter with a significant increase of NoV GII.4 representing about 86% of diversity viral for NoV GII (Figure 1). This viral diversity change among NoV GII genotypes was primarily linked to an increase of sequence number representing 4 specific OTUs which corresponded to GII.4 (Figure 2). All OTUs identified as NoV GII.4 were NoV GII.4 2012 variants (data not shown) and consequently the 4 OTUs which greatly increased (supplementary data, Figure S 1).





Figure 2: Heatmap representing the number of OTUs which were identified as NoV GII.4 in WWTP effluents for each season.

Discussion

Currently, epidemiological studies are essentially based on clinical data, although a major part of infections do not require specialized consultation. As a consequence, a large part of the circulating enteric viruses are certainly underestimated by these studies. Thus, for the first time to our knowledge, this study using high throughput sequencing technology provided epidemiological data for human viruses from effluents of WWTP (representing about 9 million inhabitants) over one year in order to characterize the temporal variation of viral loads and diversity in WWTP effluents. It permitted also to compare these environmental data with clinical data obtained by the French National Reference Centre for enteric viruses during the same period.

First of all, the analysis of 100 effluent samples allowed to highlight the high detection frequencies and viral loads for HAstV, NoV GI and NoV GII that showed an overall consistency with median viral loads of WWTP effluents observed worldwide, in Singapore with 3,9 x 10^4 copies/L for HAstV, 7.1X10⁴ copies/L for NoV GI, 5.2x10⁴ copies/L for NoV GII (Aw and Gin

2010), in Japan with 2.9 X10³ copies/L for NoV GI and 2.6x10³ copies/L for NoV GII (Katayama et al. 2008), in New Zealand with between 10^2 and 10^3 copies/L for NoV GI and between 10^2 and 10^4 for NoV GII (Hewitt et al. 2011). Part of the discrepancy in the detection frequencies could be explained by the difference in the concentration and detection methods and by the sample volumes (He et al. 2011; Kitajima et al. 2012; Murray et al. 2013).Our results showed high detection frequencies and viral loads in WWTP effluents reflecting the high prevalence and circulation of human HAstV, NoV GI and NoV GII in the human population. Moreover, viral loads above 10^5 copies/L in WWTP effluents could be released in the Seine River, which serves as catchment source to produce drinking-water. Considering the daily water flows (about 1.49 x 10^6 m³/day in effluents and 3.72×10^7 m³/day in the Seine river), it may significantly impair the water resource used by drinking-water plants.

Statistical analysis of the viral loads in WWTP effluents showed the significant prevalence of HAstV, NoV GI and NoV GII in winter and also in spring for NoV GI. These observations were consistent with the data from the clinical samples (87% (13/15) positive samples for HAstV detected in winter and spring, 87% (33/38) positive samples for NoV GI detected in winter and spring and 46% (119/256) positive samples for NoV GII detected in winter) but also with epidemiological data which were found in different countries under temperate climate (Lin et al. 2008; Liu et al. 2006; Mounts et al. 2000; Mustafa et al. 2000; Wollants et al. 2015). Moreover, as some studies (Hellmer et al. 2014; Hewitt et al. 2011; Prevost et al. 2015), these results suggest a close link between the health status of the population and the viral loads in WWTP effluents.

A high viral diversity was identified from WWTP effluent samples, 4 HAstV genotypes (HAstV-1, HAstV-2, HAstV-5 and HAstV-6), 7 NoV GI genotypes (NoV GI.1 to NoV GI.6 and NoV GI.8) and 16 NoV GII genotypes (NoV GII.1 to NoV GII.7, NoV GII.9, NoV GII.12 to NoV GII.15 to NoV GII.17, NoV GII.20 and NoV GII.21) and indirectly circulating in the resident or working population of Paris urban area. The small number of stool samples, only 17 positive for HAstV, NoV GI and NoV GII in Paris urban area, highlighted the limit of epidemiologic data collected by the traditional network. However, a similar global diversity was observed in stools of reported gastroenteritis cases in France. But, it is striking to note that the repartition of genotypes identified was wildly different. The HAstV predominant genotype from WWTP effluents was clearly HAstV-1 which was in agreement with previous epidemiological studies (De Benedictis et al. 2011; Resque et al. 2007; Zhou et al. 2014). In opposition, the predominant genotype from stool samples collected was HAstV-5 following by HAstV-2. For NoV GI, the most prevalent genotype in WWTP effluents was NoV GI.4 while no genotype stood out clearly from clinical samples. Unlike the two other viruses, the predominant NoV GII genotype from WWTP effluents varied according to the season: NoV GII.4 in spring and winter, NoV GII.3 in autumn. Up to 14 different genotypes were found in summer without a predominant genotype evolution. In comparison, stool samples showed a majority of NoV GII.4 in all seasons as in most clinical studies (Silva et al. 2006; Tan et al. 2015). These observations could be explained by the low number of HAstV or NoV GI positive stools collected, but not for NoV GII. Also, this could globally reflect a lower pathogenicity of some circulating strains leading to less hospitalizations or medical consultations, and finally to less reported cases specifically due to these strains.

Furthermore, all HAstV genotypes from effluent samples were also found in the clinical samples except for HAstV-6, rarely found in previous epidemiological studies (De Grazia et al. 2011; Guix et al. 2002; Mendez-Toss et al. 2004). All NoV GI genotypes identified in WWTP effluent samples were also found in clinical samples except for NoV GI.5 which were though frequently isolated worldwide both in clinical studies (Park et al. 2012; Sang et al. 2013) and environmental studies (Lee et al. 2014; Mans et al. 2013; Rajko-Nenow et al. 2013). The only NoV GII genotype, which was found in WWTP effluents and no in stool samples, was NoV GII.20, found in previous epidemiological studies (Dove et al. 2005; Yu et al. 2014). The discrepancy found between environmental and clinical data is also in agreement with the lack of systematic virus analysis in feces and less severe symptoms associated to certain genotypes, not requiring medical consultation or hospitalization. At our knowledge, no study describing such difference of pathogenicity or virulence related to genotypes for NoV and HAstV are available, probably due to the lack of cellular model for replicating these viruses. Studies would be interesting to validate this hypothesis.

Some genotypes (NoV GI.f and NoV GII.10) were detected only in stool samples. That could be explained by the sampling campaign which was national for stool samples and regional for WWTP effluents. We were not able to exclude that some genotypes could present properties conferring greater or lesser resistance in the environment. This aspect deserves to be studied because such properties could also confer better resistance to disinfection treatments.

Despite the weak severity of infections by various classical genotypes, the emergence of new recombinant strains more virulent could become a higher public health concern. This high virus diversity circulating in the human population and the potential events of coinfection (due to facilities to infect humans) could promote the emergence of new strains by inter- and intra-genotype recombinations and even inter-genogroup events (Mans et al. 2014; Martella et al. 2014; Nayak et al. 2008; Verma et al. 2010). As such, 2 and 5 recombinant strains of Nov GI (NoV GI.b/I.6 and NoV GI.b/I.4) and NoV GII (NoV GII.c/II.1, NoV GII.e/II.2, NoV GII.7/II.6, NoV GII.g/II.12 and NoV GII.21/II.3), respectively were identified in stool samples. The methodology of this study could not allow to evaluate the rate of recombinant strains in WWTP effluents but it would be interesting to deepen the genotyping, despite the technical limitation of pyrosequencing due to the amplicon length usable by this sequencing technology. However, the methodology allowed the analysis of NoV GII.4 variants in WWTP effluents. All NoV GII.4 found were identified as NoV GII.4 2012 Sydney variants. This observation was consistent with clinical data which showed that 86% (131/158) of identified NoV GII.4 in stool samples were NoV GII.4 2012 Sydney variants. It is noteworthy that NoV GII.4 is currently one the major genotype contributing to the NoV related gastroenteritis epidemic. The large number of OTUs identified as NoV GII.4 2012 Sydney variants in WWTP effluents proved a great variability of nucleotide sequences coding for the VP1 protein, the major compound of the NoV viral capsid. This variability could contribute to an escape strategy against adaptive immune response. Thus, identification of the NoV GII.4 diversity in WWTP effluents could be relevant from the perspective of a viral vaccine approach.

Finally, effluent sample analysis could provide deeper information regarding the viral diversity into the population linked to a sewerage network and could involve a better comprehension of the viral epidemiology, thereby supplementing the clinical data. Moreover, WWTP effluents are very often released in rivers that can be used for different purposes such as shellfish farming and catchment to produce drinking-water and to irrigate fruits and vegetables (Cheong et al. 2009; Maunula et al. 2005; Rajko-Nenow et al. 2013). This approach would provide an identification of circulating viral strains, associated to high or low pathogenicity, which could be potentially present in these foods.

Acknowledgments

This work was funded by Eau de Paris (France) and the IIe-de-France region funded a PhD scholarship associated with this work (DIM R2DS). The authors warmly thank the sampling management department of the SIAAP (France) for the delivery of all the water samples and the Lariboisiere hospital (France) for the access to their high-throughput sequencing platform.

References

- Atmar, R.L.; Opekun, A.R.; Gilger, M.A.; Estes, M.K.; Crawford, S.E.; Neill, F.H.; Graham, D.Y. Norwalk virus shedding after experimental human infection. Emerging infectious diseases. 14:1553-1557; 2008
- Aw, T.G.; Gin, K.Y. Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. Journal of applied microbiology. 109:716-730; 2010
- Barrabeig i Fabregat, I.; Rovira, A.; Buesa, J.; Bartolomé, R.; Pintó Solé, R.M.; Prellezo, H.; Domínguez García, À. Foodborne norovirus outbreak: the role of an asymptomatic food handler. BMC Infectious Diseases, 2010, 10: 269; 2010
- Belliot, G.; Laveran, H.; Monroe, S.S. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. Archives of virology. 142:1323-1334; 1997
- Bhattacharya, R.; Sahoo, G.C.; Nayak, M.K.; Ghosh, S.; Dutta, P.; Bhattacharya, M.K.; Mitra, U.; Gangopadhyay, D.; Dutta, S.; Niyogi, S.K.; Saha, D.R.; Naik, T.N.; Bhattacharya, S.K.; Krishnan, T. Molecular epidemiology of human astrovirus infections in Kolkata, India. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 6:425-435; 2006
- Blacklow, N.R.; Greenberg, H.B. Viral gastroenteritis. The New England journal of medicine. 325:252-264; 1991
- Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Pena,
 A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; Huttley, G.A.; Kelley, S.T.; Knights, D.; Koenig, J.E.; Ley, R.E.;
 Lozupone, C.A.; McDonald, D.; Muegge, B.D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J.R.; Turnbaugh,

P.J.; Walters, W.A.; Widmann, J.; Yatsunenko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nature methods. 7:335-336; 2010

- Cheong, S.; Lee, C.; Song, S.W.; Choi, W.C.; Lee, C.H.; Kim, S.J. Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. Applied and environmental microbiology. 75:7745-7751; 2009
- De Benedictis, P.; Schultz-Cherry, S.; Burnham, A.; Cattoli, G. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 11:1529-1544; 2011
- De Grazia, S.; Platia, M.A.; Rotolo, V.; Colomba, C.; Martella, V.; Giammanco, G.M. Surveillance of human astrovirus circulation in Italy 2002-2005: emergence of lineage 2c strains. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 17:97-101; 2011
- Deneen, V.C.; Hunt, J.M.; Paule, C.R.; James, R.I.; Johnson, R.G.; Raymond, M.J.; Hedberg, C.W. The impact of foodborne calicivirus disease: the Minnesota experience. The Journal of infectious diseases. 181 Suppl 2:S281-283; 2000
- Desai, R.; Hembree, C.D.; Handel, A.; Matthews, J.E.; Dickey, B.W.; McDonald, S.; Hall, A.J.; Parashar, U.D.; Leon, J.S.; Lopman, B. Severe outcomes are associated with genogroup 2 genotype 4 norovirus outbreaks: a systematic literature review. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 55:189-193; 2012
- Dove, W.; Cunliffe, N.A.; Gondwe, J.S.; Broadhead, R.L.; Molyneux, M.E.; Nakagomi, O.; Hart, C.A. Detection and characterization of human caliciviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Blantyre, Malawi. BioMed research international. 77:522-527; 2005
- Gallimore, C.I.; Lewis, D.; Taylor, C.; Cant, A.; Gennery, A.; Gray, J.J. Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 30:196-204; 2004
- Guix, S.; Caballero, S.; Villena, C.; Bartolome, R.; Latorre, C.; Rabella, N.; Simo, M.; Bosch, A.; Pinto, R.M.
 Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. Journal of clinical microbiology. 40:133-139; 2002
- He, X.Q.; Cheng, L.; Zhang, D.Y.; Xie, X.M.; Wang, D.H.; Wang, Z. One-year monthly survey of rotavirus, astrovirus and norovirus in three sewage treatment plants in Beijing, China and associated health risk assessment. Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research. 63:191-198; 2011
- Hellmer, M.; Paxeus, N.; Magnius, L.; Enache, L.; Arnholm, B.; Johansson, A.; Bergstrom, T.; Norder, H.
 Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreaks. Applied and environmental microbiology. 80:6771-6781; 2014
- Hewitt, J.; Leonard, M.; Greening, G.E.; Lewis, G.D. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. Water research. 45:6267-6276; 2011
- Higgins, G.; Schepetiuk, S.; Ratcliff, R. Aetiological importance of viruses causing acute gastroenteritis in humans. Microbiology Australia. 33:49-52; 2012
- Jeong, A.Y.; Jeong, H.S.; Jo, M.Y.; Jung, S.Y.; Lee, M.S.; Lee, J.S.; Jee, Y.M.; Kim, J.H.; Cheon, D.S. Molecular epidemiology and genetic diversity of human astrovirus in South Korea from 2002 to 2007. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 17:404-408; 2011

- Kageyama, T.; Kojima, S.; Shinohara, M.; Uchida, K.; Fukushi, S.; Hoshino, F.B.; Takeda, N.; Katayama,K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. Journal of clinical microbiology. 41:1548-1557; 2003
- Katayama, H.; Haramoto, E.; Oguma, K.; Yamashita, H.; Tajima, A.; Nakajima, H.; Ohgaki, S. One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. Water research. 42:1441-1448; 2008
- Kirby, A.E.; Teunis, P.F.; Moe, C.L. Two human challenge studies confirm high infectivity of Norwalk virus.
- Kirby, A.E.; Teunis, P.F.; Moe, C.L. Two human challenge studies confirm high infectivity of Norwalk virus. The Journal of infectious diseases. 211:166-167; 2015
- Kitajima, M.; Haramoto, E.; Phanuwan, C.; Katayama, H.; Furumai, H. Molecular detection and genotyping of human noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. Journal of applied microbiology. 112:605-613; 2012
- Kojima, S.; Kageyama, T.; Fukushi, S.; Hoshino, F.B.; Shinohara, M.; Uchida, K.; Natori, K.; Takeda, N.; Katayama, K. Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. Journal of virological methods. 100:107-114; 2002
- Le Cann, P.; Ranarijaona, S.; Monpoeho, S.; Le Guyader, F.; Ferre, V. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. Research in microbiology. 155:11-15; 2004
- LeBaron, C.W.; Furutan, N.P.; Lew, J.F.; Allen, J.R.; Gouvea, V.; Moe, C.; Monroe, S.S. Viral agents of gastroenteritis. Public health importance and outbreak management. MMWR Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report Recommendations and reports / Centers for Disease Control. 39:1-24; 1990
- Lee, G.C.; Kim, M.J.; Kim, J.I.; Lee, C.H. Occurrence and molecular characterization of noroviruses in Korean surface water between 2007 and 2010. Journal of microbiology and biotechnology. 24:556-562; 2014
- Lin, H.C.; Kao, C.L.; Chang, L.Y.; Hsieh, Y.C.; Shao, P.L.; Lee, P.I.; Lu, C.Y.; Lee, C.Y.; Huang, L.M. Astrovirus gastroenteritis in children in Taipei. Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi. 107:295-303; 2008
- Liu, C.; Grillner, L.; Jonsson, K.; Linde, A.; Shen, K.; Lindell, A.T.; Wirgart, B.Z.; Johansen, K. Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 35:69-72; 2006
- Loisy, F.; Atmar, R.L.; Guillon, P.; Le Cann, P.; Pommepuy, M.; Le Guyader, F.S. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. Journal of virological methods. 123:1-7; 2005
- Lopman, B.A.; Hall, A.J.; Curns, A.T.; Parashar, U.D. Increasing rates of gastroenteritis hospital discharges in US adults and the contribution of norovirus, 1996-2007. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 52:466-474; 2011
- Lyman, W.H.; Walsh, J.F.; Kotch, J.B.; Weber, D.J.; Gunn, E.; Vinje, J. Prospective study of etiologic agents of acute gastroenteritis outbreaks in child care centers. The Journal of pediatrics. 154:253-257; 2009
- Mans, J.; Murray, T.Y.; Taylor, M.B. Novel norovirus recombinants detected in South Africa. Virology journal. 11:168; 2014

- Mans, J.; Netshikweta, R.; Magwalivha, M.; Van Zyl, W.B.; Taylor, M.B. Diverse norovirus genotypes identified in sewage-polluted river water in South Africa. Epidemiology and infection. 141:303-313; 2013
- Martella, V.; Pinto, P.; Tummolo, F.; De Grazia, S.; Giammanco, G.M.; Medici, M.C.; Ganesh, B.; L'Homme, Y.; Farkas, T.; Jakab, F.; Banyai, K. Analysis of the ORF2 of human astroviruses reveals lineage diversification, recombination and rearrangement and provides the basis for a novel sub-classification system. Archives of virology. 159:3185-3196; 2014
- Maunula, L.; Miettinen, I.T.; von Bonsdorff, C.H. Norovirus outbreaks from drinking water. Emerging infectious diseases. 11:1716-1721; 2005
- Meakins, S.M.; Adak, G.K.; Lopman, B.A.; O'Brien, S.J. General outbreaks of infectious intestinal disease (IID) in hospitals, England and Wales, 1992-2000. The Journal of hospital infection. 53:1-5; 2003
- Meliopoulos, V.; Schultz-Cherry, S. Astrovirus Pathogenesis. Astrovirus Research: Springer; 2013
- Mendez-Toss, M.; Griffin, D.D.; Calva, J.; Contreras, J.F.; Puerto, F.I.; Mota, F.; Guiscafre, H.; Cedillo, R.; Munoz, O.; Herrera, I.; Lopez, S.; Arias, C.F. Prevalence and genetic diversity of human astroviruses in Mexican children with symptomatic and asymptomatic infections. Journal of clinical microbiology. 42:151-157; 2004
- Mounts, A.W.; Ando, T.; Koopmans, M.; Bresee, J.S.; Noel, J.; Glass, R.I. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. The Journal of infectious diseases. 181 Suppl 2:S284-287; 2000
- Murray, T.Y.; Mans, J.; Taylor, M.B. Human calicivirus diversity in wastewater in South Africa. Journal of applied microbiology. 114:1843-1853; 2013
- Mustafa, H.; Palombo, E.A.; Bishop, R.F. Epidemiology of astrovirus infection in young children hospitalized with acute gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a period of four consecutive years, 1995 to 1998. Journal of clinical microbiology. 38:1058-1062; 2000
- Nayak, M.K.; Balasubramanian, G.; Sahoo, G.C.; Bhattacharya, R.; Vinje, J.; Kobayashi, N.; Sarkar, M.C.; Bhattacharya, M.K.; Krishnan, T. Detection of a novel intergenogroup recombinant Norovirus from Kolkata, India. Virology. 377:117-123; 2008
- Noel, J.S.; Lee, T.W.; Kurtz, J.B.; Glass, R.I.; Monroe, S.S. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. Journal of clinical microbiology. 33:797-801; 1995
- Park, S.; Jung, J.; Oh, S.; Jung, H.; Oh, Y.; Cho, S.; Cho, S.; Cho, S.; Park, H.; Jo, N.; Bae, K.; Choi, S.; Kim,
 B.; Kim, J.; Chae, Y.; Jung, H.; Cheon, D.; Kim, H. Characterization of norovirus infections in
 Seoul, Korea. Microbiology and immunology. 56:700-707; 2012
- Prevost, B.; Lucas, F.S.; 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. Environment international. 79:42-50; 2015
- Rajko-Nenow, P.; Waters, A.; Keaveney, S.; Flannery, J.; Tuite, G.; Coughlan, S.; O'Flaherty, V.; Dore, W.
 Norovirus genotypes present in oysters and in effluent from a wastewater treatment plant during the seasonal peak of infections in Ireland in 2010. Applied and environmental microbiology. 79:2578-2587; 2013
- Resque, H.R.; Munford, V.; Castilho, J.G.; Schmich, H.; Caruzo, T.A.; Racz, M.L. Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in Sao Paulo, Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 102:969-974; 2007

- Sang, S.W.; Zhao, Z.T.; Suo, J.J.; Xing, Y.B.; Jia, N.; Gao, Y.; Du, M.M.; Xie, L.J.; Liu, B.W.; Ren, S.W.; Liu,
 Y.X. [Study on the molecular epidemiological characteristics of norovirus in acute gastroenteritis of Beijing]. Zhonghua liu xing bing xue za zhi = Zhonghua liuxingbingxue zazhi. 34:263-266; 2013
- Sdiri-Loulizi, K.; Ambert-Balay, K.; Gharbi-Khelifi, H.; Sakly, N.; Hassine, M.; Chouchane, S.; Guediche, M.N.; Pothier, P.; Aouni, M. Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis investigated using samples collected from children in Tunisia during a four-year period: detection of the norovirus variant GGII.4 Hunter as early as January 2003. Journal of clinical microbiology. 47:421-429; 2009a
- Sdiri-Loulizi, K.; Gharbi-Khelifi, H.; de Rougemont, A.; Hassine, M.; Chouchane, S.; Sakly, N.; Pothier, P.;
 Guediche, M.N.; Aouni, M.; Ambert-Balay, K. Molecular epidemiology of human astrovirus and
 adenovirus serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. Journal of
 medical virology. 81:1895-1902; 2009b
- Silva, P.A.; Cardoso, D.D.; Schreier, E. Molecular characterization of human astroviruses isolated in Brazil, including the complete sequences of astrovirus genotypes 4 and 5. Archives of virology. 151:1405-1417; 2006
- Simpson, R.; Aliyu, S.; Iturriza-Gómara, M.; Desselberger, U.; Gray, J. Infantile viral gastroenteritis: On the way to closing the diagnostic gap. Journal of medical virology. 70:258-262; 2003
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular biology and evolution. 30:2725-2729; 2013
- Tan, D.; Deng, L.; Wang, M.; Li, X.; Ma, Y.; Liu, W. High prevalence and genetic diversity of noroviruses among children with sporadic acute gastroenteritis in Nanning City, China, 2010-2011. Journal of medical virology. 87:498-503; 2015
- Teunis, P.F.; Moe, C.L.; Liu, P.; Miller, S.E.; Lindesmith, L.; Baric, R.S.; Le Pendu, J.; Calderon, R.L. Norwalk virus: how infectious is it? Journal of medical virology. 80:1468-1476; 2008
- Verma, H.; Chitambar, S.D.; Gopalkrishna, V. Astrovirus associated acute gastroenteritis in western India: predominance of dual serotype strains. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 10:575-579; 2010
- Walter, J.E.; Mitchell, D.K. Role of astroviruses in childhood diarrhea. Current opinion in pediatrics. 12:275-279; 2000
- Wollants, E.; De Coster, S.; Van Ranst, M.; Maes, P. A decade of norovirus genetic diversity in Belgium. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 30:37-44; 2015
- Wurtzer, S.; Prevost, B.; Lucas, F.S.; Moulin, L. Detection of enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. Journal of virological methods. 209:47-54; 2014
- Yu, Y.; Yan, S.; Li, B.; Pan, Y.; Wang, Y. Genetic diversity and distribution of human norovirus in China (1999-2011). 2014:196169; 2014
- Zhang, Z.; Mitchell, D.K.; Afflerbach, C.; Jakab, F.; Walter, J.; Zhang, Y.J.; Staat, M.A.; Azimi, P.; Matson,
 D.O. Quantitation of human astrovirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain
 reaction to examine correlation with clinical illness. Journal of virological methods. 134:190-196; 2006
- Zheng, D.P.; Widdowson, M.A.; Glass, R.I.; Vinje, J. Molecular epidemiology of genogroup II-genotype
 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. Journal of clinical microbiology.
 48:168-177; 2010

Zhou, N.; Lin, X.; Wang, S.; Wang, H.; Li, W.; Tao, Z.; Xu, A. Environmental surveillance for human astrovirus in shandong province, china in 2013. Scientific reports. 4:7539; 2014

Supplementary data

NCBI number access of reference sequences

AB025806.1, AB037274.1, AF248738.2, AF260508.1, AY720891.1, AY720892.1, DQ028633.1, DQ070852.1, DQ344027.1, EF583300.1, FJ755405.1, GQ495608.1, GQ901902.2, GU732187.1, HM237363.1, HQ398856.2, JF491430.1, JN887820.1, JQ403108.1, JX087964.1, KF039910.1, KF039911.1, KF039913.1, KF211475.1, L23513.1, Y08632.2, Z46658.1, Z66541.1

KF039737.1, KF429789.1, KF429783.1, KF429774.1, KF429773.1, KF429761.1, KF429770.1, JX023285.1, KF306212.1, FJ515294.1, JN699050.1, JN699048.1, JQ743330.1, JN603244.1, JN183164.1, FJ711164.1, JN603273.1, JN603266.1, JN603259.1, JN603245.1, KJ402295.1, JN699046.1, KC998959.1, JN699045.1, JN222366.1, JQ388274.1, JN899243.1, JN183161.1, JN005886.1, GU299761.1, EU003970.1, KF586508.1, KF586507.1, JN183159.1

KC597151.1, KF429786.1, KF429764.1, JN797508.1, KJ407074.2, KC464505.1, JX846925.1, KC597138.1, KF429769.1, AB662863.1, KP064097.1, KF306213.1, JX846924.1, KC597140.1, KC597144.1, KF712510.1, KC175323.1, JX989074.1, KM272334.1, GU325839.2, JN699044.1, KJ407072.2, JX989075.1, KC832474.1, KF006266.1, JN699042.1, JF802498.1, JX846926.1, GU131223.1, EU494708.1, JX416401.1, KM349447.1, EU448331.1, EU448332.1, KP064099.1, KJ938995.1, AB810014.1, JX439807.1, JN899242.1, GU594162.1, GU017903.2, HM635108.1, KC207117.1, AB810002.1, KJ156329.1, KC597139.1, JN699043.1, EU448333.1, GQ149616.1, JX047017.1, JN899245.1, JF300333.1, HV321704.1, AB542917, EU373815, AY675554, AB542915

Table S 1: Reference sequences for HAstV, NoV GI and NoV GII used to OTUs identification.

Virue	Constyne	Number o	Total				
virus	Genotype	Spring	Summer	Autumn	Winter	TULAT	
	1	2	0	0	0	2	
HAstV	2	1	0	0	3	4	
	5	5	0	1	0	6	
	Untypable	1	1	0	1	3	
	Total	9	1	1	4	15	
	l.1	1	0	0	0	1	
	1.2	1	0	0	2	3	
	1.3	3	2	0	2	7	
	1.4	1	0	0	1	2	
	I.6	0	0	0	1	1	
	1.8	1	0	0	0	1	
NOV GI	1.9	1	0	0	1	2	
	I.b/I.4	0	0	0	1	1	
	I.b/I.6	2	2	0	4	8	
	I.f	1	0	0	0	1	
	Untypable	6	0	1	4	11	
	Total	17	4	1	16	38	
	II.c/II.1	0	0	0	1	1	
	11.2	2	0	2	5	9	
	II.e/II.2	1	0	0	1	2	
	II.3	0	0	0	1	1	
	II.4 2006a	2	1	0	1	4	
	II.4 2006b	2	0	0	1	3	
	II.4 2009	5	2	3	4	14	
	II.4 2012	36	12	15	68	131	
NoV GII	II.6	12	1	11	18	42	
	II.7	0	2	1	1	4	
	II.10	0	1	0	0	1	
	II.16	0	1	0	0	1	
	II.7/II.6	0	1	1	2	4	
	II.g/II.12	1	1	1	2	5	
	11.14	0	1	1	0	2	
	II.17	3	0	0	1	4	
	II.21/II.3	4	1	2	3	10	
	Untypable	2	3	3	10	18	
	Total	70	27	40	119	256	

Table S 2: Number of identified acute gastroenteritis cases whose origin is linked to AstV, NoV GI and NoV GII in France between May 2013 and May 2014.

Résultats



0.02

Figure S 1: Phylogenetic trees based on nucleotide sequences (302 nucleotides) of NoV GII.4 variants. The trees were constructed by the neighbor-joining method. Numbers of each branch indicate the bootstrap values obtained from 1000 replicates. Sequences. • represents 4 major OTUs in winter.

Conclusion du chapitre 2

Cette étude a évalué la diversité virale dans les effluents de STEP à l'aide du séquençage haut débit. L'utilisation de ce moyen technique a tout d'abord 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 par 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 génotype 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 capside (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.

Chapitre 3: Persistance des virus entériques dans l'eau de surface et l'eau potable : pertinence de l'utilisation d'agents intercalants

Introduction

Les résultats des chapitres 1 et 2 mettent clairement en évidence le lien qu'il existe entre les effluents de STEP et la contamination virale de la rivière réceptrice. En effet, la contamination virale de la Seine est directement, et essentiellement, liée aux effluents de STEP. La circulation de ces virus est un enjeu de santé publique à conditions qu'ils possèdent la capacité de persister dans les eaux de rivières ou/et qu'ils présentent une résistance importante aux traitements de désinfection, mis en place au sein des usines de potabilisation et parfois au sein des STEP.

L'absence de modèle cellulaire pour la plupart des virus entériques, et notamment pour les NoV humains qui sont à l'origine de la plupart des épidémies virales de gastroentérites, a contribué à généraliser l'utilisation des outils de biologie moléculaire. Ainsi, ces techniques permettent des analyses virales très sensibles, spécifiques mais aussi plus rapides que la culture cellulaire. Cependant, leur principal inconvénient réside dans leur incapacité à fournir une information quant au caractère infectieux des particules virales ainsi détectées. Ainsi, plusieurs études mettent en évidence la discordance qu'il existe entre la quantification par culture cellulaire et la quantification par biologie moléculaire (Dubois et al. 2002, Green and Lewis 1999). Pour pallier à cette limite, de nombreuses pistes ont été proposées telles que l'amplification d'une longue séquence de génome viral (Rodríguez et al. 2013), un traitement à l'aide d'une protéase suivi d'une nucléase (Nuanualsuwan and Cliver 2002), ou les traitements utilisant des agents intercalants de l'ADN (Kim et al. 2011). À l'heure actuelle, aucune étude ne s'est réellement intéressée à la pertinence de leur utilisation sur des échantillons issus de l'environnement.

Le chapitre 3 a pour but d'évaluer l'intérêt d'un prétraitement aux agents intercalants avant une amplification par (RT)-PCR pour évaluer l'intégrité des virus entériques et ainsi étudier leur persistance en fonction de différents facteurs environnementaux et en fonction de traitements de désinfection. Dans un premier temps le chapitre 3 s'intéresse à mieux définir les conditions d'utilisation d'un prétraitement basé sur l'utilisation d'agents intercalants. Par la suite, la persistance de virus entériques cultivables, l'adénovirus type 41 et le coxsackievirus B2, a été évaluée dans différentes matrices d'eau (eau potable et eau de surface) à différentes températures mais également suite à des traitements de désinfection comme la chloration et les rayonnements UV, généralement appliqués au sein des usines de production d'eau potable. Pour finir, cette étude évalue la pertinence de l'emploi d'agents intercalants dans le cadre de l'analyse d'échantillons environnementaux d'eau. Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis au journal « Water Research ».

Article 4: Viral persistence in surface and drinking water: suitability of intercalating dyes

Prevost B¹, Goulet M², Lucas FS¹, Joyeux M², Moulin L², Wurtzer S²

¹ LEESU (UMR MA 102, Université Paris-Est, Agro ParisTech), Université Paris-Est Créteil, 61, Avenue du Général-de-Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

² Eau de Paris, DRDQE, R&D biologie, 33, Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry sur seine, France

*Corresponding author: <u>Laurent.moulin@eaudeparis.fr</u>

Abstract

After many enteric virus outbreaks associated with drinking water consumption, enteric virus study in water significantly increased in the recent years. In order to better understand the dynamics of enteric viruses in environmental water and the viral risk associated, it is required to estimate their persistence at different conditions. In this study, two representative models of human enteric viruses, adenovirus 41 (AdV 41) and coxsackievirus B2 (CV-B2), were used to evaluate the persistence of enteric viruses in environmental water. Thus, the persistence of infectious particles, encapsided genomes and free nucleic acids of AdV 41 and CV-B2 was evaluated in drinking water and surface water at different temperatures (4°C, 20°C and 37°C). Infectivity of AdV 41 and CV-B2 persisted at least 25 days whatever the water temperature, and beyond 70 days at 4°C and 20°C in both drinking and surface water. Encapsided genomes persisted beyond 70 days whatever the water temperature. Free nucleic acids (i.e. without capsid) were also able to persist at least 16 days in drinking and surface water. The usefulness of a detection method based on intercalating dye pre-treatment, which allowed to target specifically preserved particles, was estimated to discriminate between free and encapsided genomes and it was compared to virus infectivity. Moreover, the resistance of AdV 41 and CV-B2 against two major disinfection treatments applied in drinking water plants (UV and chlorination) was estimated and even after the application of UV rays and chlorine at high doses (400 mJ/cm² and 10 mg.min/L, respectively), viral genomes were still detected by biology molecular methods. Although the intercalating dye pre-treatment had only a little utility to detect the effect of UV treatment, it was really relevant for chlorination treatments with less than 1 log₁₀ difference compared to the infectivity results. Finally, for the first time, a sampling of four drinking-water plants and two rivers allowed to underline the suitability of intercalating dye pre-treatment to estimate the quality of the water produced by the plants. Although 55% (27/49) of drinking water samples were positive by molecular detection for enteric viruses, none of them were positive when using intercalating dye pre-treatment, which could indicate that the viruses detected may not be infectious.

Key words

Enteric viruses, Surface water, Drinking water, Persistence, EMA, PMA

1 Introduction

Despite the release of high quantities of human pathogens in rivers by the wastewater treatment plants (WWTP) effluents, (Prevost et al. 2015, Zhou et al. 2015), surface water is widely used in order to produce drinking-water (Grondahl-Rosado et al. 2014), for recreational activities (Allmann et al. 2013) and for agricultural irrigation (Cheong et al. 2009). Among the waterborne pathogens, human enteric viruses are a major cause of acute gastroenteritis worldwide. They also may cause various other symptoms as hepatitis, conjunctivitis or neurological lesions, and present a high risk of morbidity and mortality in vulnerable populations such as young children, immunocompromised patients and elderly people (Gallimore et al. 2004). The number of studies focusing on enteric viruses in drinking water and foods has recently increased, which is partly due to the report of several outbreaks associated with food or water consumption, and the improvement of detection methods (Iritani et al. 2014, Loury et al. 2015, Morillo et al. 2012). Currently, molecular method such as quantitative polymerase chain reaction (qPCR) or reverse transcriptase-qPCR (RT-qPCR) are largely used for viral detection and quantification. Nevertheless, the gold standard method remains the titration on the cell culture which provides information about the virus infectivity. The lack of cell lines for some enteric viruses, and more particularly for norovirus, explains the success of molecular biology methods (Neesanant et al. 2013). Molecular methods present the advantage to be highly sensitive and to be perfectly adapted for the detection of low virus levels. Indeed, small amount of human enteric viruses may be sufficient to provoke a rapid infection, given that they have a low infectious dose (between 10 and 100 viral particles) (Yezli and Otter 2011). In spite of these advantages, the detection of viral nucleic acids in a sample does not allow to conclude about the infectious risk. Thus, several studies using molecular methods provided positive viral analysis on food and drinking water, without discrimination between infectious and non-infectious viral particles (Heerden et al. 2005, Kokkinos et al. 2012). In order to assess the viral integrity, some authors recommend to treat the samples with intercalating dyes such as ethidium monoazide (EMA) or propidium monoazide (PMA) before performing nucleic acid extraction and molecular amplification (Coudray-Meunier et al. 2013, Karim et al. 2015). The rational for using intercalating dyes is based on the hypothesis that a virus with a damaged capsid would not be infectious and the intercalating dyes could reach the genome and block its amplification. However, some studies suggested that the utilization of intercalating dyes was not always relevant to discriminate infectious from noninfectious viral particles, since the capsid damage depends on the water disinfection process (Kim et al. 2011, Leifels et al. 2015). Indeed, heat exposition tends to destroy the viral capsid, chlorine or ozone treatments may damage both viral capsid and nucleic acids according to the exposition doses, while UV rays tend to target mainly the nucleic acids. Currently the experiments using intercalating dye pre-treatment to assess viral integrity were only conducted under laboratory conditions with a certain quantity of purified viral particles spiked in water samples. No experiment was conducted in environmental samples with endogenous enteric viruses.

The main goal of this study was to evaluate the persistence of enteric viruses in water samples while emphasizing the suitability of intercalating dye pre-treatment in order to detect viruses in water samples. Thus, the efficiency of EMA and PMA to prevent genome amplification was evaluated on different types of viral nucleic acids: double strand DNA or RNA, positive and negative single strand RNA. Then, the persistence of human enteric viruses was estimated in surface water and drinking water samples exposed to different temperatures, using adenovirus 41 (AdV 41) and coxsackievirus B2 (CV-B2) as models of human enteric viruses. Moreover the impact on viral resistance of two major disinfection treatments (chlorine and UV rays) generally used in drinking water plants was also estimated. Finally, the relevance of intercalating dye pre-treatment in the monitoring of viral contamination in drinking water and river water was evaluated during an extensive sampling campaign.

2 Materials and methods

2.1. Viral stock preparation

AdV 41 and CV-B2 strains were respectively cultivated on monolayer cultures of 293A cells and BGMK cells at 37°C with 5% CO₂. The 293A cells were grown in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), glutamine and nonessential amino acids. The BGMK cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Mediumhigh glucose supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and non-essential amino acids. To collect viruses, the cells were lysed by three consecutive freeze-thawing cycles and the supernatant containing the viral particles was clarified by centrifugation at 1500 x g for 10 minutes. AdV 41 and CV-B2 suspensions were purified on a sucrose gradient then quantified by viral titration and by (RT)-qPCR. Purified viruses were stored at -80°C until use. Rotavirus A (RV-A) was extracted from stool sample and Influenza virus A/California/07/09 was kindly provided by the French Reference National Centre for Influenza virus.

These four viruses were used to obtain different types of free nucleic acids (double-strand DNA or RNA, positive and negative single-strand RNA). AdV 41 and CV-B2 strains were also used to evaluate the impact of different conditions (temperature, water type and disinfection treatment) on viral persistence.

2.2 Ethidium and propidium monoazide treatments

Intercalating dyes, 2.5mM EMA and PMA solutions were prepared in molecular grade water and aliquots were stored at -20°C. Each aliquot underwent only one freeze-thaw cycle. Each

pre-treatment with EMA or PMA was made with a quantity of 0.02µmole for 100µL sample. Then, samples were mixed and incubated on ice for 30 min in the dark followed by a photoactivation step with a PhaST Blue system (IUL, Barcelona, Spain) for 15 min. After intercalating dye pre-treatment, water samples were extracted.

2.3 Extraction of viral nucleic acid

All viral nucleic acids were extracted with a MagNA Pure Compact instrument and MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume (Roche Applied Science, Bâle, Switzerland), allowing the processing of samples up to 1 mL according to the manufacturer's instructions. Extracted nucleic acids were immediately purified with OneStep[™] PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) according to the manufacturer's instructions, then analyzed and the leftover was stored at -80°C.

2.4 Real-time PCR assay conditions

Each independent reaction was carried out with 5µL of nucleic acids, using specific primers and probes for each virus All used primers were previously described in (Prevost et al. 2015) for adenovirus (AdV), astrovirus (AstV), norovirus of genogroups I and II (NoV GI and NoV GII) and rotavirus A (RV-A), in (Wurtzer et al. 2014) for enterovirus (EV), in (Nielsen et al. 2013) for aichivirus (AichiV), cosavirus (CosaV) and salivirus (SaliV), in (Influenza 2011) for Influenza virus and in (Oka et al. 2006) for sapovirus (SapoV). Amplification were carried on using TaqMan[®] Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations. All reactions were performed with a ViiA[™] 7 real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA). The thermal cycling profile was one step of reverse transcription at 50°C for 5min, one step of initial denaturation at 95°C for 20s, 45 cycles of 5s denaturation at 95°C and 40s annealing/extension at 60°C. Fluorescence was measured at the end of the annealing/extension step on FAM, HEX and DFO channels. Each amplification run included a no template control and a positive amplification control. Results reported for each sample were means of duplicate. The raw amplification data were collected with ViiA[™] 7 software version 1.2.1 (Life Technologies, Carlsbad, CA) and then processed with Excel software (Microsoft, Redmond, WA).

For each targeted virus, standard curves were performed using pGEM-T-easy vector (Promega, Madison, WI) containing the target sequence. The plasmid concentrations were determined by spectrophotometry using a BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) and then used to establish standard curves by 10-fold serial dilutions, ranging from 10⁸ to 1 genome units/reaction.

2.5 Viral titration

AdV 41 and CV-B2 were respectively titrated by standard 10-fold dilution in 96-well plates (5 \times 10³ cells per well) on 293A and BGMK cell layers. Inoculated wells with signs of cell layer degradation were tracked by comparison with control wells under microscopic observation. From the moment when cell layer degradations were observed, the surpernatants were discarded, and cells were fixed with 0.1 M HCl treatment for 5 min. HCl solution was removed and a coloration with a crystal violet solution (4g/L) was realized in each well during 10 min. After rinse with PBS 1x pH 7, positive wells were counted and viral titer was estimated using the Spearman–Kärber method and expressed as the median tissue culture infective dose (TCID₅₀) ml⁻¹ (Hierholzer and Killington 1996).

2.6 Efficiency of intercalating dyes treatment

The usefulness of intercalating dyes to determine the integrity of viral particles from water samples was estimated on different viral genomes types (dsDNA, (+)ssRNA, (-)ssRNA and dsRNA). DNA and RNA were extracted from AdV 41, CB-V2, RV-A and Influenza A strains. The different types of free nucleic acids were subjected to EMA and PMA pre-treatment, before quantification by (RT)-qPCR.

To estimate the limit number of genome units which could be not detected by molecular biology after intercalating dyes pre-treatment, 10-fold serial dilutions of each free nucleic acid preparation (ranging from 10^8 to 1 genome units/reaction) were realized in $100 \ \mu$ L of molecular grade water. Each pre-treated sample was immediately purified with OneStepTM PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA) according to the manufacturer's instructions, then analyzed by molecular biology. The validation of the maximum capacity reduction of viral genomes was determined after 5 distinct experiments. The reduction in equivalent DNA or RNA weight and equivalent nucleotides were calculated by multiplying the number of genomes quantified by qPCR by the genome size (AdV 41 (dsDNA; 34200 bp), CV-B2 ((+)ssRNA;7396 nucleotides), Influenza A/California/04/2009 (H1N1) ((-)ssRNA; 13123 nucleotides) and RV-A (dsRNA; 18600 bp)) and according to a mean value for a nucleotide of 330 g.mol⁻¹.

2.7 Viral persistence at different temperatures

The effect temperature on the persistence of viral particles and free viral nucleic acids in surface water and in drinking water was estimated in laboratory conditions during 70 days. River and drinking water samples were seeded with AdV 41 and CV-B2 ((about 10⁵ genome units/ml). These water samples presented various properties (Table S 1, supplementary data) and both were negative for AdV and EV genomes. Three temperatures (4°C, 20°C and 37°C) were tested in triplicate for each combination of water type and viral strain (n= 12)
experimental units). Each experiment was performed in the dark using a borosilicate bottle filled with 30mL of water. For each sampling time, the virus number was estimated by viral titration, by qPCR (or RT-qPCR) without and with intercalating dyes pre-treatment.

2.8 Ultraviolet (UV) treatment

To test the persistence of viral particles and free viral nucleic acids to UV treatment, AdV 41 and CV-B2 were suspended in PBS 1x pH 7. Working solutions were prepared to have a final viral concentration of about 5x10⁵ TCID₅₀/mL viral suspension were then were exposed at room temperature to UV doses of 5, 10, 20, 40, 100, 200 or 400 mJ/cm² at 254,7 nm wave length light with a UV lamp (Phillips, Amsterdam, Netherlands). Exposition to UV rays was monitored using a digital UVX radiometer (IL Metronic Sensortechnik GmbH, Germany). Each experiment was realized in triplicate for each type of virus. After UV treatment, each sample was analyzed by viral titration, qPCR (or RT-qPCR) with and without intercalating dye pre-treatment.

2.9 Chorine treatment

Glassware was prepared by soaking overnight in 50mg/L chlorine solution, rinsed thoroughly with chlorine demand-free (CDF) water, and finally autoclaved for 1h at 135°C. All solutions and buffers were made with reagent-grade, CDF water which was prepared by treating drinking water using a PURELAB Ultra device (ELGA Labwater, Antony, France). Sodium hypochlorite was diluted in CDF water to prepare a 100mg/L stock solution. Chlorine concentrations were measured with a Pocket colorimeter[™] II (HACH LANGE, Dusseldorf, Germany). Viral suspensions were prepared to have a final viral concentration of about 5x10⁵ TCID₅₀/mL in PBS 1x pH 7. A preliminary assay was realized in order to estimate the initial chlorine concentration required to reach approximately 1mg/L of free chlorine after spiking with viruses (data not shown). Each experiment was treated at room temperature with a concentration of free chlorine approximately at 1mg/L and incubated for 1 min, 3 min, 5 min and 10 min. Applied chlorine treatment was expressed in CT-value (mg.min/L) corresponding to time (min) multiplied to disinfectant concentration (mg/L). Then, 0.4% thiosulfate was added to quench any remaining free chlorine in order to stop disinfection treatment. After chlorine treatment, each sample was analyzed by viral titration, qPCR (or RT-qPCR) with and without intercalating dye pre-treatment.

2.10 Modelling of viral persistence kinetic

All persistence data (temperature, UV and chlorine experiments) were fitted with an exponential one-phase decay model, which has been determined using GraphPad Prism

version 6.01 software (GraphPad, La Jolla, CA) and according to the equation $Y=(YO - Plateau)*e^{(-K*X)} + Plateau$

YO is the Y value when X (time) is zero and Plateau is the Y value at infinite times.

K is the rate constant, expressed in reciprocal of the X axis units. All values of Y0, plateau and K were indicated in table S2 for viral persistence at different temperatures and in table S3 for viral persistence at UV rays and chlorine treatments (Supplementary data).

2.11 Water sampling

A total of 69 water samples (49 samples from drinking water and 20 from river water) were collected from November 2014 to February 2015. The drinking water samples (n=49) were collected at the exit of the four drinking water plants which supply Paris city (about 2.2 millions of inhabitants). The river water samples (n=20) were collected in the Seine and Marne rivers (France). Each water sample was stored at 4°C until 24h maximum before the concentration of viral particles.

2.12 Viral concentration

Water samples from rivers and drinking treatment plants were concentrated by three successive filtration/concentration steps as previously described (Wurtzer et al. 2014). Briefly, the entire volume of water sample was filtered using electropositive filters (NanoCeram[®] Virus Samplers, Argonide, Sanford, FL). Filters were then sonicated at 4°C for 1h in an elution buffer composed of 1% beef extract (Bacto[®] Beef Extract Dessicated, BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ), 0.05M glycine (Merck[®], Darmstadt, Germany), 0.1%Tween 80 (Sigma Aldrich, St Louis, MO), 0.1% sodium polyphosphate (Sigma Aldrich, St Louis, MO), adjusted at pH 9.5. Then the viruses were eluted in an inverted flow. Second, the pH was adjusted to 3.5, allowing virus flocculation under slow magnetic agitation for 1 h and followed by a centrifugation at 4000×g at 4°C for 2h, the pellet was then suspended in PBS 1x pH 9. After a centrifugation at 4000×g at 4°C for 10 min, the supernatant was filtered with 0.45µm then 0.22µm filters. The filtrate was ultracentrifugated on 1mL of 40% sucrose at 150000×g at 4 °C for 2h. Finally the pellet was resuspended in 1mL and divided in two samples of 400µL and one other of 200µL. From one, nucleic acids were directly extracted then amplified and the second was pre-treated with EMA then nucleic acids were extracted and amplified.

In order to check if the quantity of EMA was enough to reduce all viral genomes present in environmental samples, the remaining volume of total nucleic acids, from the extraction without EMA pre-treatment, was treated with an equimolar quantity of EMA that previously described in part 2.2. The EMA pre-treatment before extraction was only performed if environmental samples were positive for at least one targeted virus without EMA pre-treatment and if the quantity of EMA was sufficient to reduce all nucleic acids. For all environmental samples (n = 69), quantity of EMA was sufficient to reduce all nucleic acids.

2.13 Controls

The good recovery rate of the concentration step was confirmed by three controls previously described which were a global control consisting of AdV 5 *LacZ* Δ *E1* Δ *E3* (Life Technologies, Carlsbad, CA), a bacteriophage MS2 as extraction control, and a competitive inhibition control (Prevost et al. 2015).

The extraction control and the competitive inhibition control were also used to validate all results of this study with and without intercalating dyes pre-treatment. For all environmental samples (n = 69), the global control quantity was similar with and without EMA pre-treatment.

3 Results

3.1 Efficiency of intercalating dyes treatment on different types of free nucleic acids

First of all, the inhibition linked to pre-treatment with 0.02 µmole of EMA or PMA without any photo-activation was noticeable and the use of OneStepTM PCR Inhibitor Removal Kit was necessary to remove this inhibition after extraction step (data not shown). The pre-treatment with 0.02 µmole of EMA or PMA reduced completely the number of genomes when the sample contained up to 1.94×10^5 and 7.28×10^3 genomes for AdV 41 (respectively for EMA and PMA), 1.40×10^6 and 1.59×10^4 CV-B2 genomes, 8.87×10^4 and 1.65×10^4 Influenza A virus genomes and 5.30×10^4 and 4.09×10^6 RV-A genomes (Table 1).

In order to overcome the impact of genome length on this evaluation, the efficacy of dye pretreatment to avoid detection by PCR was expressed in nucleotide equivalents mobilizable and in DNA/RNA weight. The efficacy of PMA and EMA seemed to be relatively homogenous for the different kinds of nucleic acids, even a better performance of PMA dye with dsRNA. For samples spiked with dsDNA or ssRNA, EMA dye was respectively able to mobilize about 10 times and up to 100 times more nucleotide equivalents in dsDNA and ssRNA format than PMA dye, but near 70 times less in samples spiked with dsRNA. Based on these results, only EMA pre-treatment was used to continue the study.

Résultats

PMA+ (0.02µmole)

	Genome			Genome		
	unit	DNA/RNA weight (g)	Equivalent nucleotides	unit	DNA/RNA weight (g)	Equivalent nucleotides
AdV 41	1.94x10 ⁵	7.26x10 ⁻¹²	6.63 x 10 ⁹	7.28x10 ³	2.73x10 ⁻¹³	2.48x10 ⁸
CV-B2	1.40x10 ⁶	5.67x10 ⁻¹²	10.35 x 10 ⁹	1.59x10 ⁴	6.46x10 ⁻¹⁴	1.17x10 ⁸
Influenza A	8.87x10 ⁴	1.31x10 ⁻¹²	1.16 x 10 ⁹	1.65x10 ⁴	1.22x10 ⁻¹³	2.16x10 ⁸
RV- A	5.30x10 ⁴	1.08x10 ⁻¹²	0.98.10 ⁹	4.09x10 ⁶	8.33x10 ⁻¹¹	7.60x10 ¹⁰

Table 1: The maximal reduction of dsDNA, (+)ssRNA, (-)ssRNA and dsRNA genomes by EMA and PMA pre-treatments was determined by choosing the minimal reduction value resulting from 5 distinct experiments.

3.2 Evaluation of viral persistence in drinking water and surface water

EMA+ (0.02µmole)

The persistence of AdV 41 and CV-B2 in drinking water and in surface water was closely related to the temperature conditions. Infectious AdV 41 and CV-B2 were still detected by cell culture assay after 70 days of incubation at 4°C and 20°C in both drinking water and surface water while infectious AdV 41 and CV-B2 could not persist after 30 days at 37°C (Figure 1).

The modeling of persistence kinetics with an one-phase decay equation, provided extrapolated values corresponding to the number of days required to observe a 1 log₁₀ reduction of infectivity (Table 2). Infectious CV-B2 persisted shorter when the temperature increased (from 32,8 days at 4°C up to 6.9 days at 37°C in surface water). The RT-qPCR method showed a slow decay of encapsided genomes while up to 117.2 days would be necessary for 1 log₁₀ reduction at 4°C in water surface. The EMA-RT-qPCR results always indicated intermediate values. These values were globally closer to infectious virus quantity at 37°C, suggesting a negative effect of temperature increase on the capsid integrity. No noticeable difference was visible between incubations in drinking water and in surface water. Similar results were observed for AdV 41, however this virus seemed to be more robust with extended persistence of both genome and infectivity (Figure 1 and table 2).

At temperature inferior to 20°C (close to realistic conditions under temperate climate), infectious AdV 41 generally persisted longer than CV-B2 in surface water (at least 50 days versus 24 days respectively) and drinking water (at least 50 days versus 30 days respectively). Free nucleic acids were able to persist at least 16 days in drinking and surface water whatever the temperature. Persistence of free nucleic acids were also realized with an EMA pre-

treatment and no amplification was observed using molecular assays confirming the method efficacy (data not shown).



Figure 1: Persistence (days) of AdV 41 and CV-B2 in drinking water and surface water at different temperatures (4°C, 20°C and 37°C), evaluated by cell culture $-\bigcirc$ and by RT-qPCR (or qPCR) without - or with - EMA pre-treatment. In parallel, persistence of free nucleic acids from AdV 41 and CV-B2 was also evaluated by RT-qPCR (or qPCR) $-\Box$. The data were fitted with the one-phase decay equation. Error bars represent standard deviation from 3 distinct experiments realized for each measure.

			Free nucleic acids	Vir	Viral particles					
			(RT)-qPCR	EMA-(RT)-qPCR	(RT)-qPCR	Cell culture				
		4°C	1.9	18.0	52.0	14.3				
<u>ب</u>	CV-B2	20°C	1.2	24.8	20.3	11.5				
Surface wate		37°C	1.2	3.8	4.8	3.1				
		4°C	3.0	45.2	54.9	25.8				
	AdV 41	20°C	3.9	16.0	26.4	13.5				
		37°C	3.0	3.9	7.7	3.2				
		4°C	5.5	40.7	56.7	28.3				
L.	CV-B2	20°C	2.4	20.0	28.7	12.0				
g wate		37°C	1.8	4.2	7.9	3.8				
nking		4°C	10.5	27.8	35.5	19.0				
Dri	AdV 41	20°C	6.1	17.9	24.3	14.2				
		37°C	5.3	4.8	10.2	2.5				

Number of days for 1 log₁₀ reduction

Table 2: Time (days) needed to observe a 1 log_{10} reduction of CV-B2 and AdV 41 in surface water and drinking water at different temperatures (4, 20 and 37°C). The values were calculated with the one-phase decay equation.

3.3 Viral persistence to disinfection treatments

The persistence of AdV 41 and CV-B2 against two major disinfection treatments (UV rays and chlorine) applied in drinking water plants was estimated (Figure 2).

After UV treatment (10 to 400 mJ/cm²), elimination of both free and encapsided nucleic acids was below 1 log₁₀ for AdV 41and CV-B2. A complete removal of infectious AdV 41 and CV-B2 was observed after UV dose of 400 mJ/cm² and 100 mJ/cm², respectively. The modeling of persistence kinetics, using an exponential one-phase decay equation, allowed to estimate the UV dose necessary to generate 1 log₁₀ or 4 log₁₀ removal (Table 3). About 50 mJ/cm² permitted a 4 log₁₀ reduction of infectious CV-B2 whereas about 93 mJ/cm² were necessary for removing AdV 41. According to this model, UV doses superior to 3000 mJ/cm² should be applied for such elimination level of viral genomes (free or encapsided), and superior to 1200 mJ/cm² despite of EMA pre-treatment.

A total reduction of infectivity was observed for AdV 41 and CV-B2 after a chlorination with a CT value of 3 mg.min/L and 5 mg.min/L, respectively. However the reduction of free nucleic acids and encapsided nucleic acids measured by (RT)-qPCR was about 2 log₁₀ for AdV 41 and inferior to 2 log₁₀ for CV-B2 after chlorination with a CT of 10 mg.min/L. The exposition doses to free chlorine necessary to generate 1 log₁₀ or 4 log₁₀ reduction were modeled for each detection method (Table 3). Unlike UV rays treatment, EMA-(RT)-qPCR method provided expected results for the chlorine treatment very close to those observed by viral titration (Table 3). The difference between virus quantity measured by cell culture and EMA-(RT)-qPCR were inferior to 1log₁₀ whatever the CT of chlorine.

Persistence analyses of free nucleic acids following to UV treatment and chlorination were also realized with an EMA pre-treatment and no amplification was observed using molecular assays confirming the method efficacy (data not shown).



Figure 2: Effect of UV rays and chlorine treatments on the persistence of AdV 41 and CV-B2. Results are expressed as average log removal of viruses evaluated by cell culture $-\bigcirc$ and by RT-qPCR (or qPCR) without - or with - EMA pre-treatment. In parallel, persistence of free nucleic acids from AdV 41 and CV-B2 was also evaluated by RT-qPCR (or qPCR) - - Error bars represent standard deviation from 3 distinct experiments. The data were fitted with the one-phase decay equation.

		Free nu	cleic acids	Viral particles											
		(RT)-qPCR		EMA-(I	RT)-qPCR	(RT)	-qPCR	Cell culture							
		1 log ₁₀	4 log ₁₀												
UV dose	CV-B2	413.18	2554.57	203.14	1242.42	486.44	3015.29	8.62	49.83						
(mJ/cm²)	AdV	616.90	3786.06	310.04	1954.59	657.63	4052.17	15.50	93.27						
Chlorine	CV-B2	5.18	31.74	0.71	4.23	7.51	45.20	0.42	2.49						
(mg.min/L)	AdV	4.17	25.83	0.36	2.31	5.48	32.97	0.13	0.79						

Table 3: UV doses and chlorine CT to observe $1 \log_{10}$ and $4 \log_{10}$ reduction for CV-B2 and AdV 41. The values were calculated with the one-phase decay equation.

3.4 Viral loads and prevalence from samples of drinking and surface water

The presence of virus with intact capsids was evaluated in river water and drinking water. A total of 69 water samples collected between November 2014 and February 2015 were analysed using molecular assays with EMA pre-treatment: 49 large volume samples of drinking-water and 20 samples of surface water (Table 4). For each molecular assay (targeting AdV, AichiV, HAstV, CosaV, EV, NoV GI, NoV GII, RV-A, SaliV and SapoV), all no template controls were negative and all positive amplification controls were positive (data not shown). For each sample, the results were validated as the recovery of the global control was superior to 18% (following Prevost et al. 2015). Moreover, the extraction control and the competitive amplification steps linked to the EMA pre-treatment was revealed. Moreover, no significant difference was revealed between the genome unit number of the global control with or without EMA pre-treatment confirming that the sample concentration did not generate any additional damage on the viral capsids.

For river water samples, 100% (20/20) of the samples were positive to at least one of the targeted virus and more precisely 75% (15/20) for AdV, 20% (4/20) for AichiV, 10% (2/20) for HAstV, 10% (2/20) for CosaV, 5% (1/20) for EV, 80% (16/20) for NoV GI, 55% (11/20) for NoV GII, 20% (4/20) for RV-A, 20% (4/20) for SaliV, 15% (3/20) for SapoV (Table 4). Moreover, 95% (19/20) of the positive river samples remained positive after the EMA pre-treatment. Median viral loads were about 90 copies/L for AdV and HAstV, between 23 and 50 copies/L for AichiV, CosaV, NoV GI, NoV GII, RV-A and SaliV, inferior to 10 copies/L for EV and SapoV (Table 4).

For drinking water samples, 55% (27/49) of samples were positive for at least one of the targeted virus by molecular assay and more precisely 33% (16/49) for AdV, 6% (3/49) for AichiV, 2% (1/49) for CosaV, 10% (5/49) for EV, 8% (4/49) for NoV GI, 10% (5/49) for NoV GII,

2% (1/49) for SaliV (Table 4). No HAstV positive sample was detected. Median viral loads were below 1 copie/L of drinking water for every targeted viruses, except for AdV which could be present up to 160 copies/L. All positive samples from drinking-water plants were negative after EMA pre-treatment, meaning that no enteric virus with an intact capsid could be detected (Table 4).

	Surface wa	ter		Drinking-water								
Number of samples	20			49								
Median volume of filtered sample (L) (min - max)	20 (20 - 20)			2713 (1088 – 5065)								
		Viral pre	valence (%)		Viral prevalence (%)							
	Median viral load copies/L (min - max)	EMA -	EMA +	Median viral load copies/L (min - max)	EMA -	EMA +						
AdV	94 (11 - 1729)	75	70	0,193 (0.028 – 160.421)	33	0						
AichiV	23 (13 - 109)	20	20	0.050 (0 – 0.100)	6	0						
AstV	90 (83 - 98)	10	10	ND	0	0						
CosaV	24 (15 - 34)	10	10	0.052 (0.051 – 0.052)	2	0						
EV	3 (3 - 3)	5	0	0.028 (0 - 0.1)	10	0						
NoV GI	29 (5 - 128)	80	75	0.058 (0.007 – 0.084)	8	0						
NoV GII	25 (12 - 292)	55	45	0.041 (0.011 – 0.088)	10	0						
RV-A	50 (22 - 82)	20	20	ND	0	0						
SaliV	24 (2 - 50)	20	20	0.268 (0.268 – 0.268)	2	0						
SapoV	7 (2 - 10)	15	20	ND	0	0						
Global		100	95		55	0						

Table 4: Median viral loads and viral prevalence for AdV, AichiV, AstV, CosaV, EV, NoV GI, NoV GI, RV-A, SaliV, SapoV in samples of river water (n=20) and drinking water (n=49) with and without EMA pre-treatment.

4 Discussion

Although cell culture remains the gold standard method to evaluate viral persistence, the lack of cell culture system for the major part of enteric virus promoted the viral detection by molecular assay. Indeed, qPCR is nowadays commonly used to detect enteric viruses in environmental studies and to estimate viral loads and prevalence in water samples. However, this method does not give any clue about the infectivity of viral particles. Consequently, many authors suggested that the use of intercalating dyes such as EMA and PMA could allow to discriminate between infectious and non-infectious viruses (Coudray-Meunier et al. 2013, Kim et al. 2011, Leifels et al. 2015). The use of intercalating dye pre-treatment could be suitable to evaluate the persistence of human enteric viruses in environment.

4.1 Validation of the intercalating dye pre-treatment

First of all, it was very important to check whether intercalating dyes were able to link to different types of nucleic acids potentially present in environmental samples, and whether the quantity of EMA or PMA was sufficient to reduce the totality of free nucleic acids present in environmental samples. To answer these questions, the maximal inhibition capacity of EMA and PMA on the different types of nucleic acids was determined. Globally, EMA pre-treatment allowed to reduce a higher quantity of free viral genomes than PMA pre-treatment did in agreement with some previous studies (Coudray-Meunier et al. 2013, Leifels et al. 2015). This approach permitted to determine a maximum threshold quantity of target that could be appropriately analyzed with dye pre-treatment for viral monitoring. But the genome length has probably a crucial impact on this estimation. In order to overcome this effect, the efficacy of dye pre-treatment was expressed in nucleotide equivalents mobilizable (Table 1). Except for dsRNA, a given concentration of EMA dye seemed to mobilize more nucleotides than the same PMA dye concentration. The mechanism by which intercalating dyes interact with ssRNA is not clear, but we can hypothesize that such interactions are possible in secondary structures allowing dye intercalation, that becomes covalent after photoactivation step. Thereby, the results recorded with EMA dye for positive and negative ssRNA suggested probably the existence of hotspot regions for dye intercalation in viral genomes resulting of secondary structures (stem-loop, pseudoknot ...). As a consequence the efficacy of intercalating dyes may vary according to the amplified region of viral genomes.

Some previous studies showed that free viral nucleic acids were detected after the sample concentration step (Haramoto et al. 2007) but the relatively great persistence of free acid nucleic justified the use of intercalating dye pre-treatment. Indeed in environmental water samples, there are a lot of additional sources of DNA or RNA coming from phages, bacteria, and eukaryotes that could dilute the effect of intercalating dye. The concentration method we developed permits to exclude the major part of these contaminations and as a consequence limit the quantity of interfering nucleic acids. Moreover, it is important to ensure that the concentration method used did not damage viral particles at the risk of underestimating the quantity of preserved viruses and potentially infectious. In this study, the global control quantity was similar with and without EMA pre-treatment which meant that the viral

concentration method used did not significantly damage viral capsid integrity of enteric viruses. Retrospectively, subject to use a concentration method allowing to remove the major part of contaminant microorganisms and free nucleic acids naturally present in environmental samples, EMA pre-treatment could have been relevant for viral analysis in environmental water (WWTP effluents, surface water and drinking water) from major part of studies worldwide (Grondahl-Rosado et al. 2014, Kluge et al. 2014, Prevost et al. 2015).

4.2 Impact of temperature on the persistence of infectious enteric viruses

Viral persistence in drinking water and surface water was evaluated at different temperatures. Regardless the temperature, infectious AdV 41 and CV-B2 could still be detected after about 24 days in surface water and in drinking water. These results were not surprising because a study previously showed a remarkable persistence of AdV 2, until 400 days by PCR, in water at 20°C (Ogorzaly et al. 2010). Moreover, another study showed a significant persistence of infectious human NoV GI.1 in groundwater which were still able to infect humans after 61 days and could be detected by PCR after about 3 years of storage in ground water (Seitz et al. 2011). Although the impact of some parameters (such as sunshine or temperature variation) were not tested, our results suggested a great persistence of human enteric viruses in river and drinking waters. Consequently, environmental water could constitute a remarkable reservoir of enteric viruses and it could promote a redoubtable vector of dissemination in the absence of efficient disinfection treatments.

4.3 Impact of disinfection treatment on the viral persistence

The study of disinfection treatment allowed to confirm the suitability of intercalating dyes pretreatment after chlorination but not after UV treatment as suggested in previous studies (Karim et al. 2015, Leifels et al. 2015). Previous studies have already demonstrated the effect of UV rays, chlorination and ozonation on virus particles. The detection of non-infectious viruses detected by molecular biology is a real problem for virus risk assessment and an intercalating dye pre-treatment was probably not sufficient to discriminate totally between non-infectious and infectious viruses in the absence of conditions destabilizing viral capsids such as ozonation, high temperature and chlorination. To overcome this limitation, the use of long-template qPCR in order to evaluate the DNA damages caused by UV treatment could be possible (Rodríguez et al. 2013). Moreover, it would be necessary to evaluate the persistence of viral infectivity in relation to the destabilization degree of viral capsid.

4.4 Viral capsid integrity in environmental waters

Finally, for the first time, the level of virus with intact capsids was evaluated in water samples from drinking water plants and river by (RT)-qPCR with and without EMA pre-treatment. During this sampling campaign, 100% and 55% of samples were positive by (RT)-qPCR for at least one targeted virus in river and drinking water respectively. Nevertheless no drinking water sample was still positive using EMA-(RT)-qPCR method, whereas 95% of river samples remained positive. Such results in drinking water were probably observed thanks to the large

volumes of water concentrated. Several previous studies showed a large number of samples from drinking water plants which were positive for enteric virus genomes worldwide. Indeed, samples were positive by PCR at 27% for EV, 23% for AdV and 16% for RV-A in Brazil (Kluge et al. 2014), 25% for EV and 100% for AdV in China (Ye et al. 2012), 16% for NoV in Ghana (Gibson et al. 2011), 19% for EV and 5% for AdV in South Africa (Ehlers et al. 2005, Heerden et al. 2005). However these studies did not investigate the integrity of the capsid in water samples. Our findings suggested that the most part of viral particles in surface water could have non-damaged capsid and could have conserved their infectivity. Moreover, the high detection rate of enteric viruses in drinking water by classical molecular assays was consistent with the persistence of viral genomes in drinking water (minimum 15 days at 37°C) and after disinfection treatments.

5 Conclusion

This study showed that enteric viruses were probably preserved and infectious virus particles remained for a long time in the environment. Several disinfection treatments as ozonation, chlorination UV rays are currently applied in drinking water plants and some of them cause damages of virus capsid. In this context, this study showed that intercalating dye pre-treatment coupled to molecular detection assay permitted a better evaluation of virus risk assessment associated to drinking water consumption. This approach could be applied for the monitoring of viruses for which a cell culture model fails.

Aknowledgement

This work was funded by Eau de Paris (France) and the Ile-de-France region (R2DS program). The authors thank warmly the sampling management departments of Eau de Paris for the delivery of all the water samples.

Reference

Allmann, E., Pan, L., Li, L., Li, D., Wang, S. and Lu, Y. (2013) Presence of enteroviruses in recreational water in Wuhan, China. J Virol Methods 193(2), 327-331.

Cheong, S., Lee, C., Song, S.W., Choi, W.C., Lee, C.H. and Kim, S.J. (2009) Enteric viruses in raw vegetables and groundwater used for irrigation in South Korea. Appl Environ Microbiol 75(24), 7745-7751.

Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L. and Perelle, S. (2013) Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. BMC Microbiol 13, 216.

Ehlers, M.M., Grabow, W.O. and Pavlov, D.N. (2005) Detection of enteroviruses in untreated and treated drinking water supplies in South Africa. Water Res 39(11), 2253-2258.

Gallimore, C.I., Lewis, D., Taylor, C., Cant, A., Gennery, A. and Gray, J.J. (2004) Chronic excretion of a norovirus in a child with cartilage hair hypoplasia (CHH). J Clin Virol 30(2), 196-204.

Gibson, K.E., Opryszko, M.C., Schissler, J.T., Guo, Y. and Schwab, K.J. (2011) Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana. Am J Trop Med Hyg 84(1), 20-29.

Grondahl-Rosado, R.C., Yarovitsyna, E., Trettenes, E., Myrmel, M. and Robertson, L.J. (2014) A One Year Study on the Concentrations of Norovirus and Enteric Adenoviruses in Wastewater and A Surface Drinking Water Source in Norway. Food Environ Virol.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. and Ohgaki, S. (2007) Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. J Virol Methods 142(1-2), 169-173.

Heerden, J., Ehlers, M.M., Vivier, J.C. and Grabow, W.O. (2005) Risk assessment of adenoviruses detected in treated drinking water and recreational water. J Appl Microbiol 99(4), 926-933.

Hierholzer, J.C. and Killington, R.A. (1996) Virology Methods Manual. Kangro, B.W.J.M.O. (ed), pp. 25-46, Academic Press, London.

Influenza, W.H.O.G. (2011) Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.

Iritani, N., Kaida, A., Abe, N., Kubo, H., Sekiguchi, J., Yamamoto, S.P., Goto, K., Tanaka, T. and Noda, M. (2014) Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. J Med Virol 86(12), 2019-2025. Karim, M.R., Fout, G.S., Johnson, C.H., White, K.M. and Parshionikar, S. (2015) Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. J Virol Methods.

Kim, K., Katayama, H., Kitajima, M., Tohya, Y. and Ohgaki, S. (2011) Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. Water Sci Technol 63(3), 502-507.

Kluge, M., Fleck, J.D., Soliman, M.C., Luz, R.B., Fabres, R.B., Comerlato, J., Silva, J.V., Staggemeier, R., Vecchia, A.D., Capalonga, R., Oliveira, A.B., Henzel, A., Rigotto, C. and Spilki, F.R. (2014) Human adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. J Water Health 12(3), 526-532.

Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., de Roda Husman, A.M., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., Rzezutka, A., Petrovic, T. and Vantarakis, A. (2012) Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. Food Environ Virol 4(4), 179-191.

Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M. and Hamza, I.A. (2015) Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. Int J Hyg Environ Health.

Loury, P., FS, L.E.G., JC, L.E.S., Ambert-Balay, K., Parrot, P. and Hubert, B. (2015) A norovirus oysterrelated outbreak in a nursing home in France, January 2012. Epidemiol Infect, 1-8.

Morillo, S.G., Luchs, A., Cilli, A. and do Carmo Sampaio Tavares Timenetsky, M. (2012) Rapid detection of norovirus in naturally contaminated food: foodborne gastroenteritis outbreak on a cruise ship in Brazil, 2010. Food Environ Virol 4(3), 124-129.

Neesanant, P., Sirinarumitr, T., Chantakru, S., Boonyaprakob, U., Chuwongkomon, K., Bodhidatta, L., Sethabutr, O., Abente, E.J., Supawat, K. and Mason, C.J. (2013) Optimization of one-step real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays for norovirus detection and molecular epidemiology of noroviruses in Thailand. J Virol Methods 194(1-2), 317-325.

Nielsen, A.C., Gyhrs, M.L., Nielsen, L.P., Pedersen, C. and Bottiger, B. (2013) Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus, and salivirus in young children. J Clin Virol 57(3), 239-242.

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

Oka, T., Katayama, K., Hansman, G.S., Kageyama, T., Ogawa, S., Wu, F.T., White, P.A. and Takeda, N. (2006) Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. J Med Virol 78(10), 1347-1353.

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.

Rodríguez, R.A., Bounty, S. and Linden, K.G. (2013) Long-range quantitative PCR for determining inactivation of adenovirus 2 by ultraviolet light. J Appl Microbiol 114(6), 1854-1865.

Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S. and Moe, C.L. (2011) Norovirus infectivity in humans and persistence in water. Appl Environ Microbiol 77(19), 6884-6888.

Wurtzer, S., Prevost, B., Lucas, F.S. and Moulin, L. (2014) Detection of enterovirus in environmental waters: a new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. J Virol Methods 209, 47-54.

Ye, X.Y., Ming, X., Zhang, Y.L., Xiao, W.Q., Huang, X.N., Cao, Y.G. and Gu, K.D. (2012) Real-time PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China. Curr Microbiol 65(3), 244-253.

Zhou, J., Wang, X.C., Ji, Z., Xu, L. and Yu, Z. (2015) Source identification of bacterial and viral pathogens and their survival/fading in the process of wastewater treatment, reclamation, and environmental reuse. World J Microbiol Biotechnol 31(1), 109-120.

Supplementary data

Quality parameters	Drinking water	River water
Aluminium	0 μg/l	167 μg/l
Calcium	80.2 mg/l	78.2 mg/l
Magnesium	3.4 mg/l	3.3 mg/l
Manganese	0 μg/l	10 μg/l
Sodium	10.5 mg/l	8.5 mg/l
Ammonium	0.00 mg/l	0.07 mg/l
Nitrites	0.00 mg/l	0.06 mg/l
Total organic carbon (TOC)	1.13 mg/l	2.83 mg/l
рН	7.55	8.05
Orthophosphates	0.82 mg/l PO4	0.17 mg/l PO4
Silica	5.87 mg/l SiO2	6.74 mg/l SiO2
Sulfates	23.8 mg/l SO4	20.4 mg/l SO4
Alkalinity titer	0 °F	0 °F
Complete alkalinity titer	16.1 °F	17.3 °F
Hydrometric titer	20.7 °F	20 °F
Turbidity	0.03 NTU	7.9 NTU
Escherichia coli	0 CFU/100mL	2140 MNP/100mL
Enterococcus	0 CFU/100mL	230 MNP/100m
Total coliforms	0 CFU/100mL	5100 CFU/100ml
Acido-sulfato-reducing bacteria	0 CFU/100mL	200 CFU/100mL
25°C conductivity	472 μS/cm	452 μS/cm
Free chlorine	0.54 mg/l	7.1 mg/l
Total chlorine	0.64 mg/l	-
Total Chlorine/free chlorine	0.84	-
UV (254nm) adsorption	0.013 cm-1	-

Table S 1: Physico-chemical parameters of drinking water and river water samples which were used for the viral persistence experiment at different temperatures.

				Free r	nucleic	acids			Viral particles Résultats														
				F	RT-qPCF	8		EMA-RT-qPCR					RT-qPCR						Infectivity				
			YO	Plateau	к	-1 log	x	YO	Plateau	к	-1 log	x	YO	Plateau	к	-1 log	x	YO	Plateau	к	-1 log	x	
		4°C	5.98	0.00	0.10	4.98	1,9	5.17	0.00	0.01	4.17	18,0	5.48	0.00	0.00	4.48	52,0	4.96	0.00	0.02	3.96	14,3	
	CV-B2	20°C	5.53	0.00	0.17	4.53	1,2	5.42	0.00	0.01	4.42	24,8	5.62	0.00	0.01	4.62	20,3	5.45	0.00	0.02	4.45	11,5	
River water		37°C	5.54	0.00	0.17	4.54	1,2	5.53	0.00	0.05	4.53	3,8	6.02	0.00	0.04	5.02	4,8	5.42	0.00	0.07	4.42	3,1	
	AdV41	4°C	6.98	0.00	0.05	5.98	3,0	5.32	0.00	0.00	4.32	45,2	5.60	0.00	0.00	4.60	54,9	5.14	0.00	0.01	4.14	25,8	
		20°C	5.50	0.00	0.05	4.50	3,9	5.42	0.00	0.01	4.42	16,0	5.51	0.00	0.01	4.51	26,4	5.08	0.00	0.02	4.08	13,5	
		37°C	5.33	0.00	0.07	4.33	3,0	5.82	0.00	0.05	4.82	3,9	5.46	0.00	0.03	4.46	7,7	5.83	0.00	0.06	4.83	3,2	
		4°C	6.21	0.00	0.03	5.21	5,5	5.11	0.00	0.01	4.11	40,7	5.33	0.00	0.00	4.33	56,7	5.05	0.00	0.01	4.05	28,3	
	CV-B2	20°C	6.03	0.00	0.08	5.03	2,4	5.19	0.00	0.01	4.19	20,0	5.24	0.00	0.01	4.24	28,7	5.40	0.00	0.02	4.40	12,0	
g watei		37°C	5.25	0.00	0.12	4.25	1,8	5.68	0.00	0.05	4.68	4,2	5.33	0.00	0.03	4.33	7,9	5.75	0.00	0.05	4.75	3,8	
inking		4°C	5.69	0.00	0.02	4.69	10,5	5.47	0.00	0.01	4.47	27,8	5.67	0.00	0.01	4.67	35,5	5.35	0.00	0.01	4.35	19,0	
Drin	AdV41	20°C	6.01	0.00	0.03	5.01	6,1	5.49	0.00	0.01	4.49	17,9	5.66	0.00	0.01	4.66	24,3	5.21	0.00	0.02	4.21	14,2	
		37°C	5.60	0.00	0.04	4.60	5,3	5.82	0.00	0.04	4.82	4,8	5.70	0.00	0.02	4.70	10,2	6.42	0.00	0.07	5.42	2,5	

Table S 2: Values of YO, plateau and K of the equation of exponential one-phase decay model for the viral persistence at different temperatures.

Résultats

			Free I	nucleic aci	ds		Viral particles														
			F	T-qPCR			EMA-RT-qPCR					R			Infe	ctivity					
		Y0	Plateau	к	-x log	x	YO	Plateau	к	-1 log	х	YO	Plateau	к	-1 log	х	YO	Plateau	к	-1 log	х
111/	CV-B2	-0.1998	-6	0.00046	-1.20	413.2	-0.119	-6	0.00092	-1.12	203.1	-0.2184	-6	0.00039	-1.22	486.4	0.3837	-6	0.01977	-0.62	8.6
UV	AdV 41	-0.1451	-6	0.00030	-1.15	616.9	-0.3347	-6	0.00063	-1.33	310.0	-0.1749	-6	0.00029	-1.17	657.6	0.0136	-6	0.01173	-0.99	15.5
Chlorino	CV-B2	-0.1311	-6	0.03605	-1.13	5.2	0.05647	-6	0.25540	-0.94	0.7	0.007413	-6	0.02425	-0.99	7.5	0.1593	-6	0.4211	-0.84	0.4
Chiorine	AdV 41	-0.2188	-6	0.04558	-1.22	4.2	-0.3831	-6	0.53970	-1.38	0.4	0.006495	-6	0.03326	-0.99	5.5	-0.0157	-6	1.389	-1.02	0.1
	CV-B2	-0.1998	-6	0.00046	-4.20	2554.6	-0.119	-6	0.00092	-4.12	1242.4	-0.2184	-6	0.00039	-4.22	3015.3	0.3837	-6	0.01977	-3.62	49.8
00	AdV 41	-0.1451	-6	0.00030	-4.15	3786.1	-0.3347	-6	0.00063	-4.33	1954.6	-0.1749	-6	0.00029	-4.17	4052.2	0.0136	-6	0.01173	-3.99	93.3
Chloring	CV-B2	-0.1311	-6	0.03605	-4.13	31.7	0.05647	-6	0.25540	-3.94	4.2	0.007413	-6	0.02425	-3.99	45.2	0.1593	-6	0.4211	-3.84	2.5
Chlorine	AdV 41	-0.2188	-6	0.04558	-4.22	25.8	-0.3831	-6	0.53970	-4.38	2.3	0.006495	-6	0.03326	-3.99	33.0	-0.0157	-6	1.389	-4.02	0.8

Table S 3: Values of YO, plateau and K constituting the equation of exponential one-phase decay model for the viral persistence after UV and chlorine treatments.

Résultats

Conclusion du chapitre 3

Ce travail a permis dans un premier temps d'évaluer la quantité de génomes viraux pouvant être mobilisée par une quantité maîtrisée d'agents intercalants. L'utilisation d'agents intercalants s'est avérée pertinente pour l'ensemble des types de génomes viraux testés. L'EMA a été globalement en mesure de neutraliser des quantités de génomes plus importantes que le PMA. Au vu de ces premiers résultats, la mise en place d'un prétraitement basé sur l'emploi d'agents d'intercalants pourrait être adaptée à l'analyse de l'ensemble des virus hydriques d'intérêt (entériques ou respiratoires).

Dans un second temps, les résultats de persistance virale obtenus mettent clairement en évidence la capacité importante des virus entériques humains à persister dans les eaux environnementales. En effet, les virus entériques étudiés, l'adénovirus 41 et le coxsackievirus B2, demeuraient encore infectieux après 70 jours à des températures inférieures à 20°C dans de l'eau de surface et l'eau destinée à la consommation humaine. La pertinence d'un prétraitement reposant sur des d'agents intercalants a été évaluée à la suite de l'application de traitements de désinfection. Ainsi, l'utilisation d'agents intercalants n'a pas permis de se rapprocher des données d'infectivité après un traitement aux rayons UV. Ce résultat confirme que le traitement UV mis en place n'engendrait pas de destabilisation suffisante de la capside virale pour que les molécules intercalantes puissent la traverser. Cependant, ce même type d'approche après une chloration a permis d'observer une différence inférieure à 1 log₁₀ entre les données d'amplification génomique après ce prétraitement et les données de culture cellulaire. Le traitement UV a été plus efficace contre les coxsackievirus B2 que pour les adénovirus 41 ce qui est cohérent avec les données issues de la littérature. Il a été également constaté que les acides nucléigues libres demeuraient détectables au moins 15 jours quel que soit le type d'eau et la température. De plus, même après des traitements de désinfection extrêmes tels qu'une dose UV de 400 mJ/cm² et un CT de chlore de 10, l'abattement de ces acides nucléiques libres était au maximum de 2 log₁₀. Ces résultats soulignent donc l'importance du choix de la méthode de concentration afin d'éliminer au maximum ces génomes viraux libres susceptibles d'être présents dans les échantillons environnementaux.

Le troisième et dernier constat de cette étude concerne l'évaluation du prétraitement d'agents intercalants sur des échantillons d'eau douce de surface et d'eau de sortie d'usine de potabilisation. Des génomes viraux ont été détectés dans 100% des échantillons environnementaux. L'évaluation de l'intégrité des capsides a révélé que 95% de ces génomes étaient probablement encapsidés et potentiellement infectieux. Dans le réseau de distribution d'eau potable, des génomes viraux étaient détectés dans 55% des échantillons, mais l'évaluation de l'intégrité des particules virales a révélé que ces génomes étaient vraisemblablement non encapsidés. L'apport de la biologie moléculaire permet d'envisager le suivi de la contamination virale des eaux de distribution, malgré les limites inérrantes à ces méthodes. L'absence de détection de génomes viraux renseigne sur l'absence de particules virales. En revanche, la détection de génomes est complexe à exploiter. L'utilisation d'agents

196

intercalants pour évaluer l'intégrité des particules virales a permis de lever les doutes quant au risque sanitaire associé à la détection de ces génomes viraux.

Pour conclure, l'emploi d'agents intercalants dans le cadre d'une étude environnementale est informatif quant au caractère infectieux des particules virales à partir du moment où la perte d'infectivité de ces particules est expliquée par la présence de facteurs déteriorant les capsides virales. C'est pourquoi, cette étude propose la généralisation d'un prétraitement d'agents intercalants dans le cadre d'analyses virales dans de l'eau potable produite au sein d'usine de potabilisation qui généralement mettent en place des traitements oxydatifs pour les protéines de capsides tels que l'ozonation et la chloration.

L'objectif global de ce travail de thèse 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. De nombreux processus sont à l'origine de la dynamique et de la diversité. Les variations saisonnières des charges virales dans les effluents de STEP étaient cohérentes avec les données épidémiologiques. 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. Finalement, la capacité des virus entériques à persister face à différentes contraintes environnementales a été évaluée et un outil d'analyse basé sur l'utilisation d'agents intercalants a été proposé. L'ensemble de ces résultats obtenus au cours de ce travail ont conduit à plusieurs points de discussion.

Tout d'abord, la méthode de concentration que nous avons développée 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 de 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 chacuns mis en place au niveau d'étapes clefs. Le premier contrôle permet, au travers de l'inoculation d'une quantité maîtrisée de bactériophage MS2 dans le concentrat 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. 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 influer 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.

La méthode de concentration de l'échantillon hydrique mise en place joue un rôle prépondérant dans la performance du processus, mais également sur l'efficacité de prétraitement par des agents intercalants. En effet, compte tenu de la grande diversité des populations (bactérie, bactériophage, algues, ...) constituant les écosystèmes hydriques, les virus entériques humains ne représentent qu'une part infime de la quantité globale de matériel génomique présent dans les eaux environnementales (Djikeng et al. 2009, Roux et al. 2012). Les résultats que nous avons présentés soulignent les limites quantitatives de matériel génomique mobilisable par les agents intercalants dans les conditions expérimentales définies. Ces agents intercalants ont été utilisés dans des matrices contenant exclusivement un type d'acides nucléiques, mais aucune spécificité pour un type de génome viral n'a été observée. La présence d'acides nucléiques non viraux (procaryotes ou eucaryotes) dans des matrices hydriques plus complexes que celles utilisées au laboratoire pourraient réduire de façon conséquente le champ d'application de ces agents intercalants. Une optimisation des conditions expérimentales, impliquant une augmentation de la quantité d'agents intercalants, parait être une piste de travail peu envisageable dans la mesure où même les molécules intercalantes non associées aux acides nucléiques ont la propriété de perturber et d'inhiber l'amplification génomique. De plus, cela conduirait à une augmentation importante du coût de l'analyse. Par conséquent, la méthode de concentration utilisée doit être suffisamment sélective afin de pouvoir limiter au maximum la concentration de génomes autres que ceux provenant de virus entériques. Les différentes étapes (filtration par adsorption sur membrane électropositive, floculation organique et purification par ultracentrifugation) que nous avons développées maximisent l'efficacité du processus et facilitent l'emploi des agents intercalants. Par ailleurs, il est également important de pouvoir déterminer l'impact que peut avoir le processus de concentration sur l'intégrité des capsides des virus entériques. Une déstabilisation de l'intégrité des capsides virales induite par la méthode aurait pour conséquence de sous-estimer le nombre de particules virales détectés. Toutefois, les rendements de concentration (compris entre 18% et 83% pour les virus étudiés) soulignaient le faible impact méthodologique sur l'infectivité des particules virales, et donc probablement sur l'intégrité des capsides, dans nos conditions expérimentales. Mais ce problème fait référence à une question bien plus large qui est celle de la caractérisation du degré de dégradation de la capside virale à partir duquel les virus entériques perdent leur caractère

infectieux. Cette approche expérimentale pourrait permettre d'analyser la relation entre le degré de déstabilisation de la capside protéique et la capacité d'interaction et de pénétration des virus dans les cellules cibles. Il parait également envisageable que des virus présentant une capside intègre aient pu perdre leur infectivité par une altération des protéines de surface, indispensables à l'adhésion des virus aux récepteurs présents à la surface de cellules permissives. De même, la forte dérive génétique, initiée par le taux d'erreurs inérrantes aux polymérases virales, pourraient conduire également à des virus intègres mais dépourvus de caractère infectieux. Il serait par ailleurs informatif, pour l'étude des mécanismes d'entrée non élucidés de certains virus, de savoir si des virus présentant des capsides déstabilisées seraient toujours capables d'infecter des cellules permissives. La conservation des mécanismes d'adhésion virus – récepteur est le prérequis indispensable à l'initiation du cycle viral, mais peu d'informations sont disponibles concernant le rôle de la capside virale au cours du processus infectieux, hormis la protection du génome viral.

Néanmoins, nos résultats montrent qu'un protocole de détection par des méthodes de biologie moléculaire précédé par un prétraitement basé sur l'emploi d'agents intercalants a permis d'avoir des résultats proches de ceux de la culture cellulaire après que les virus aient subi un traitement au chlore. De plus, les résultats d'analyse des eaux de sortie d'usine de potabilisation ont mis en évidence que l'utilisation d'agents intercalants 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 capside virale.

Les facteurs de persistance dans l'environnement ont également besoin d'être davantage étudiés. Il serait donc intéressant de mieux définir les rôles que peuvent jouer les interactions entre les virus entériques et la matière organique. Certaines études ont déjà démontré que l'efficacité des traitements de désinfection était dépendante de la quantité de matières organiques présentes dans l'eau devant être traitée (Emerson et al. 1982, Hijnen et al. 2006). En effet, l'association des particules virales à des matières organiques pourrait jouer un rôle protecteur en réduisant leur exposition aux agressions environnementales et favorisant ainsi la persistance virale dans l'environnement. Cependant, il est fort possible que ces virus associés à de la matière organique non colloïdale aient une tendance à sédimenter plus rapidemment. Cela conduirait finalement à une épuration de ces particules virales de la phase aqueuse vers la phase sédimentaire. L'interaction avec certaines molécules présentes dans l'environnement pourrait à l'inverse diminuer leur capacité de persistance. En effet, plusieurs études ont montré que l'ensoleillement jouait un rôle important sur la persistance virale (Carratalà et al. 2013, Fujioka and Yoneyama 2002, Nieto-Juarez and Kohn 2013). L''inactivation des virus par les radiations solaires s'expliquerait par une dégradation directe des différents composants des particules virales (capside et génome) ou/et par une dégradation indirecte qui serait liée à la formation de composés oxydatifs. Sous l'influence de la lumière du soleil, certaines matières organiques naturellement présentes dans les eaux

environnementales vont entraîner la formation de composés oxydatifs tels que le péroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'oxygène singulet (¹O₂), l'ion superoxyde (O₂⁻) et le radical hydroxyle (OH) (Blough and Zepp 1995, Cooper et al. 1989). Ainsi, Silverman et al. (2013) ont mis en évidence qu'en fonction de la nature des matières organiques présentes dans les matrices environnementales d'eau, ces matières organiques sont à la fois susceptibles d'engendrer une protection des particules virales par encombrement stérique et à l'inverse de favoriser un abattement viral lié à la lumière du soleil du fait de la formation de nombreux composés oxydatifs entrainant une dégradation de la capside virale. La caractérisation précise des matières organiques, colloïdales ou non, semble donc un prérequis indispensable à tout travaux portant sur les interactions entre les virus hydriques et la matière organique.

Les interactions avec les micro-organismes dans l'environnement peuvent également être un point essentiel à une meilleure compréhension de la persistance des virus entériques. Mattana et al. (2006) ont pour la première fois mis en évidence la capacité du coxsackievirus B3 à pouvoir être internalisé au sein d'Acanthamoeba castellanii. Cet article met également en évidence la persistance du caractère infectieux de ces virus même après être restés internalisés pendant plusieurs jours à la fois lorsque les amibes sont sous forme trophozoite et sous forme de kyste. Morales et al. (2007) ont réussi à isolé au sein d'un réseau d'eau potable, pour la première fois, des AdV humains qui étaient contenus au sein d'amibes appartenant au genre Acanthamoeba. Par la suite, Sheid et al. (2012) et Hsueh et Gibson (2015) ont respectivement mis en évidence la capacité des AdV humains et des MNV-1, qui servent généralement de substituts pour les norovirus humains, à pouvoir être internalisés puis libérés dans l'environnement tout en conservant leur pouvoir infectieux. De nombreuses études renseignent sur la capacité des amibes à persister aux traitements généralement mis en place au sein des usines de potabilisation d'eau (Delafont et al. 2013, Thomas et al. 2008, Yousuf et al. 2013). Par conséquent, ces interactions entre les amibes et les virus entériques pourraient être un facteur susceptible d'influer sur la persistance des virus entériques dans l'environnement.

Des interactions entre les bactéries et les virus entériques peuvent également influer sur la persistance virale dans l'environnement. En effet, Robinson et al. (2013) ont mis en évidence que les lipopolysaccharides (LPS) composant la paroi bactérienne favoriseraient la stabilité structurale de la capside du poliovirus sauvage suite à une élévation thermique, permettant ainsi la conservation de leur caractère infectieux. Cette étude indiquait également que la mise en contact avec des LPS favoriserait l'attachement au récepteur viral de la cellule hôte. Il serait intéressant d'étudier l'influence de ce type d'interactions entre des virus et des bactéries (ou composants bactériens) sur leur sensibilité aux traitements de désinfection, particulièrement ceux utilisés dans les filières de potabilisation et de voir si la facilitation de l'adhésion des virus aux cellules permissives par les composants bactériens, comme les LPS ou autres peptidoglycanes, pourraient conduire à une restauration d'infectivité de virus inactivés. Les canalisations du réseau de distribution ainsi que les réservoirs d'eau potable sont toujours

le site d'un développement de biofilm bactérien (Lehtola et al. 2004, Wingender and Flemming 2011). Ces biofilms représentent des environnements très riches en LPS qui pourraient être favorables à la persistance virale dans les eaux potabilisée et plus généralement dans des eaux environnementales.

Les virus entériques peuvent aussi interagir avec d'autres types d'organismes. Chang et al. (1960) ont ainsi mis en évidence que certains virus entériques (coxsackievirus A9, virus de l'hépatite E et echovirus 7) étaient capables de persister dans des nématodes qui leur fournissaient éventuellement une protection face à des conditions défavorables tels que la chloration. Les auteurs de cette étude ont pu également observer le relargage de ces particules virales dont le caractère infectieux a été préservé.

C'est donc un ensemble de facteurs biotiques et abiotiques en interaction avec les virus qu'il faut étudier pour comprendre la dynamique et la persistance des virus dans l'environnement de façon globale afin de mieux comprendre leur devenir dans les systèmes hydriques urbains tels que les STEP, les usines de potabilisation et les systèmes de distribution d'eau potable. Ces facteurs vont aussi affecter la diversité virale en interagissant plus ou moins avec les différents génotypes viraux ce qui pourrait avoir pour conséquence d'influer sur la persistance de certains génotypes.

Pour finir, l'étude de la diversité des astrovirus et des norovirus de génogroupes I et II dans les échantillons d'effluents de STEP a permis de révéler une importante diversité de génotypes, 4 génotypes pour les astrovirus humains (HAstV-1, HAstV-2, HAstV-5 et HAstV-6), 7 génotypes pour les norovirus de génogroupe I (NoV GI.1 à NoV GI.6 et NoV GI.8) et 16 génotypes pour les norovirus de génogroupe II (NoV GII.1 à NoV GII.7, NoV GII.9, NoV GII.12 à NoV GII.15 à NoV GII.17, NoV GII.20 et NoV GII.21). Sur l'ensemble de ces 27 génotypes différents, 13 génotypes ont été détectés dans une proportion inférieure à 5%. La profondeur d'analyse offerte par les méthodes de séquençage haut débit est parfaitement adaptée à l'étude de la diversité de micro-organismes. Une approche par clonage puis séquençage type Sanger n'aurait vraisemblablement pas permis d'avoir accès à une telle profondeur de diversité ou bien nécessiterait l'isolement clonal d'un grand nombre de séquences de génomes viraux. Le développement de nouvelles technologies de séquençage à très haut débit à partir d'une seule molécule, et ne nécessitant donc pas de création de banque d'amplicons au préalable, ouvre également de nouvelles perspectives, notamment pour la recherche plus large de tous les virus pathogènes pour l'Homme et potentiellement retrouvés dans les milieux hydriques. Les approches non ciblées de séquençage renseigneraient directement sur l'ensemble des micro-organismes présents. Cela permettrait d'avoir des informations moins restrictives que celles disponibles actuellement. La réalisation de ce type d'approche nécessiterait l'emploi d'amorces d'hexamères aléatoires contrairement aux amorces ciblant un type de virus qui ont été utilisées dans notre étude. Cependant, les études de

métagénomique utilisant des amorces d'hexamères aléatoires qui ont effectué ce type d'approche sur des eaux environnementales mettent clairement en évidence la faible représentativité des virus entériques par rapport à l'ensemble des organismes qui étaient présents (Alhamlan et al. 2013, Rosario et al. 2009a). Par conséquent, il est nécessaire de disposer d'une méthode de concentration qui présenterait une importante sélectivité pour les virus pathogènes pour l'Homme afin d'envisager une telle approche de séquençage haut débit.

Au cours de cette étude portant sur la diversité virale, nous voulions avoir accès à la fois aux virus circulant dans les eaux environnementales et aux virus circulant dans la population humaine raccordée au réseau d'assainissement des eaux usées. Cependant, les deux types de données ne sont vraiment comparables qu'à partir du moment où les filières de traitement des STEP n'exerceraient aucune pression de sélection sur la diversité des populations de virus entériques rejetés dans les eaux usées domestiques par l'Homme. Il serait donc nécessaire de caractériser l'impact que peuvent avoir les filières de traitement mais également l'impact du temps d'acheminement des eaux usées vers la STEP sur la diversité des génotypes de virus entériques circulants au sein de la population humaine. La caractérisation des performances des STEP pour l'élimination des micro-organismes pathogènes fait l'objet d'un nombre croissant d'études. Ces nouvelles connaissances conduisent de plus en plus à la mise en place de traitements tertiaires tels que la chloration, la filtration ou les rayons UV au niveau des STEP a tendance à se généraliser. Il existe davantage d'études concernant la résistance des virus entériques à ces traitements biocides qui mettent clairement en évidence des différences de sensibilité d'un virus entériques à un autre (Hijnen et al. 2006, Leifels et al. 2015, Tang and Sillanpää 2015, Thurston-Enriquez et al. 2003a). Ces traitements tertiaires sont installés afin de répondre à une demande d'amélioration de la qualité de l'eau traitée que ce soit pour protéger le milieu récepteur, faciliter la baignade ou promouvoir la réutilisation des eaux usées traitées. À l'heure actuelle, ces eaux usées traitées peuvent servir essentiellement à l'arrosage des espaces verts et à l'irrigation de certaines cultures (Lazarova and Bahri 2004). Quelques études portant sur les concentrations des virus entériques en sortie de STEP ayant mis en place un traitement tertiaire ont révélé que, malgré ces traitements, des particules virales demeuraient encore présentes au sein des eaux usées traitées (Katayama et al. 2008, Kitajima et al. 2014b). Par conséquent, il serait nécessaire d'effectuer des analyses de détection de virus entériques sur les produits alimentaires issus des récoltes irriguées par les eaux usées traitées. La campagne de prélèvements que nous avons mis en place a révélé l'implication majeure des STEP sur la contamination de l'environnement hydrique par des virus entériques ce qui signifie que leur éradication en sortie de STEP limiterait considérablement ce type de pollution environnementale. La généralisation de la mise en place de traitement tertiaire dans les STEP participerait donc à l'élimination de la circulation des virus entériques dans les eaux environnementales et réduirait ainsi considérablement le risque sanitaire associé à la présence de ces virus.

Références

Abad, F.X., Pintó, R.M. and Bosch, A. (1998) Flow cytometry detection of infectious rotaviruses in environmental and clinical samples. Appl Environ Microbiol 64(7), 2392-2396.

Abad, F.X., Pintó, R.M., Villena, C., Gajardo, R. and Bosch, A. (1997) Astrovirus survival in drinking water. Appl Environ Microbiol 63(8), 3119-3122.

Abbaszadegan, M., Stewart, P. and LeChevallier, M. (1999) A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. Appl Environ Microbiol 65(2), 444-449.

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.

Ackermann, H.-W. (2006) Classification of bacteriophages. The bacteriophages 637, 8-16. Ackermann, H.W. (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief

review. Arch Virol 146(5), 843-857.

Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B. (2013) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). Arch Virol 158(9), 2023-2030.

Agbalika, F., Hartemann, P. and Foliguet, J.M. (1984) Trypsin-treated Ma-104: a sensitive cell line for isolating enteric viruses from environmental samples. Appl Environ Microbiol 47(2), 378-380.

Aggarwal, R. (2013) Diagnosis of hepatitis E. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology 10(1), 24-33.

Aggarwal, R. and Jameel, S. (2011) Hepatitis E. Hepatology 54(6), 2218-2226.

Aggarwal, R. and Naik, S.R. (1994) Hepatitis E: intrafamilial transmission versus waterborne spread. J Hepatol 21(5), 718-723.

Ahmed, S.M., Lopman, B.A. and Levy, K. (2013) A systematic review and meta-analysis of the global seasonality of norovirus. PLoS One 8(10), e75922.

Al Nasrawi, K.K., Al Diwan, J.K., Al Hadithi, T.S. and Saleh, A.M. (2010) Viral hepatitis E outbreak in Al Sadr city, Baghdad, Iraq.

Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Ribas, F. and Girones, R. (2006) Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. Environ Sci Technol 40(23), 7416-7422.

Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Calgua, B., Huguet, J.M., Courtois, S. and Girones, R. (2009a) Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. J Virol Methods 158(1-2), 104-109.

Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L. and Girones, R. (2009b) Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants. Water Res 43(7), 2011-2019.

Alhamlan, F.S., Ederer, M.M., Brown, C.J., Coats, E.R. and Crawford, R.L. (2013) Metagenomics-based analysis of viral communities in dairy lagoon wastewater. J Microbiol Methods 92(2), 183-188.

Allain, J.P., Hsu, J., Pranmeth, M., Hanson, D., Stassinopoulos, A., Fischetti, L., Corash, L. and Lin, L. (2006) Quantification of viral inactivation by photochemical treatment with amotosalen and UV A light, using a novel polymerase chain reaction inhibition method with preamplification. Journal of Infectious Diseases 194(12), 1737-1744.

Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M.A., Dalianis, T., Ramqvist, T. and Andersson, B. (2007) Identification of a third human polyomavirus. J Virol 81(8), 4130-4136.

Am Water Works Res, F., Langlais, B., Reckhow, D.A. and Brink, D.R. (1991) Ozone in water treatment: application and engineering, CRC press.

Amar, C.F., East, C.L., Gray, J., Iturriza-Gomara, M., Maclure, E.A. and McLauchlin, J. (2007) Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English

case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 26(5), 311-323.

Ambert-Balay, K., Lorrot, M., Bon, F., Giraudon, H., Kaplon, J., Wolfer, M., Lebon, P., Gendrel, D. and Pothier, P. (2008) Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Virus Strains in Stool Samples from Community and Hospitalized Patients. Journal of Clinical Microbiology 46(4), 1252-1258.

Ammersbach, M. and Bienzle, D. (2011) Methods for assessing feline immunodeficiency virus infection, infectivity and purification. Vet Immunol Immunopathol 143(3-4), 202-214.

Anderson, A.D., Heryford, A.G., Sarisky, J.P., Higgins, C., Monroe, S.S., Beard, R.S., Newport, C.M., Cashdollar, J.L., Fout, G.S. and Robbins, D.E. (2003) A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers—Wyoming, 2001. Journal of Infectious Diseases 187(2), 303-306.

Appleton, H. and Higgins, P.G. (1975) Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. Lancet 1(7919), 1297.

Arbeli, Z. and Fuentes, C.L. (2007) Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. FEMS Microbiol Lett 272(2), 269-275.

Arnold, M., Patton, J.T. and McDonald, S.M. (2009) Culturing, Storage, and Quantification of Rotaviruses. Current Protocols in Microbiology CHAPTER, Unit-15C.13.

Atkins, A., Wellehan, J.F., Jr., Childress, A.L., Archer, L.L., Fraser, W.A. and Citino, S.B. (2009) Characterization of an outbreak of astroviral diarrhea in a group of cheetahs (Acinonyx jubatus). Vet Microbiol 136(1-2), 160-165.

Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G. and Estes, M.K. (1995) Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. Appl Environ Microbiol 61(8), 3014-3018.

Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H. and Graham, D.Y. (2008) Norwalk virus shedding after experimental human infection. Emerg Infect Dis 14(10), 1553-1557. Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J. and Graham, D.Y. (2014) Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. J Infect Dis 209(7), 1016-1022.

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.

Aw, T.G., Howe, A. and Rose, J.B. (2014) Metagenomic approaches for direct and cell culture evaluation of the virological quality of wastewater. J Virol Methods 210, 15-21.

Banyai, K., Kisfali, P., Bogdan, A., Martella, V., Melegh, B., Erdman, D. and Szucs, G. (2009) Adenovirus gastroenteritis in Hungary, 2003-2006. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 28(8), 997-999.

Banyai, K., Martella, V., Bogdan, A., Forgach, P., Jakab, F., Meleg, E., Biro, H., Melegh, B. and Szucs, G. (2008) Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. J Gen Virol 89(Pt 2), 534-539.

Barardi, C.R.M., Emslie, K.R., Vesey, G. and Williams, K.L. (1998) Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. J Virol Methods 74(1), 31-38.

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.

Baxter, C.S., Hofmann, R., Templeton, M.R., Brown, M. and Andrews, R.C. (2007) Inactivation of adenovirus types 2, 5, and 41 in drinking water by UV light, free chlorine, and monochloramine. Journal of Environmental Engineering 133(1), 95-103.

Beck, S.E., Rodriguez, R.A., Linden, K.G., Hargy, T.M., Larason, T.C. and Wright, H.B. (2014) Wavelength dependent UV inactivation and DNA damage of adenovirus as measured by cell culture infectivity and long range quantitative PCR. Environ Sci Technol 48(1), 591-598.

Begier, E.M., Oberste, M.S., Landry, M.L., Brennan, T., Mlynarski, D., Mshar, P.A., Frenette, K., Rabatsky-Ehr, T., Purviance, K. and Nepaul, A. (2008) An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. Clinical Infectious Diseases 47(5), 616-623.

Belliot, G., Laveran, H. and Monroe, S.S. (1997) Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. Arch Virol 142(7), 1323-1334.

Bennett, H.B., O'Dell, H.D., Norton, G., Shin, G., Hsu, F.C. and Meschke, J.S. (2010) Evaluation of a novel electropositive filter for the concentration of viruses from diverse water matrices. Water Sci Technol 61(2), 317-322.

Beuret, C., Kohler, D., Baumgartner, A. and Luthi, T.M. (2002) Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands. Appl Environ Microbiol 68(4), 1925-1931.

Bhattacharya, R., Sahoo, G.C., Nayak, M.K., Rajendran, K., Dutta, P., Mitra, U., Bhattacharya, M.K., Naik, T.N., Bhattacharya, S.K. and Krishnan, T. (2007) Detection of Genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. Infect Genet Evol 7(2), 229-238.

Bhattacharya, S.S., Kulka, M., Lampel, K.A., Cebula, T.A. and Goswami, B.B. (2004) Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. J Virol Methods 116(2), 181-187.

Bitton, G. (2010) Wastewater Microbiology, pp. 173-195, John Wiley & Sons, Inc.

Blacklow, N.R. and Greenberg, H.B. (1991) Viral gastroenteritis. New England Journal of Medicine 325(4), 252-264.

Blackmer, F., Reynolds, K.A., Gerba, C.P. and Pepper, I.L. (2000) Use of integrated cell culture-PCR to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. Appl Environ Microbiol 66(5), 2267-2268.

Blank, C.A., Anderson, D.A., Beard, M. and Lemon, S.M. (2000) Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. J Virol 74(14), 6476-6484.

Blomqvist, S., Savolainen, C., Råman, L., Roivainen, M. and Hovi, T. (2002) Human Rhinovirus 87 and Enterovirus 68 Represent a Unique Serotype with Rhinovirus and Enterovirus Features. Journal of Clinical Microbiology 40(11), 4218-4223.

Blough, N.V. and Zepp, R.G. (1995) Active oxygen in chemistry, pp. 280-333, Springer.

Boccia, D., Tozzi, A.E., Cotter, B., Rizzo, C., Russo, T., Buttinelli, G., Caprioli, A., Marziano, M.L. and Ruggeri, F.M. (2002) Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. Emerg Infect Dis 8(6), 563-568.

Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M. and Girones, R. (2006) Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. Appl Environ Microbiol 72(12), 7894-7896.

Bofill-Mas, S., Hundesa, A., Calgua, B., Rusinol, M., Maluquer de Motes, C. and Girones, R. (2011) Cost-effective method for microbial source tracking using specific human and animal viruses. J Vis Exp (58).

Bok, K., Abente, E.J., Realpe-Quintero, M., Mitra, T., Sosnovtsev, S.V., Kapikian, A.Z. and Green, K.Y. (2009) Evolutionary dynamics of GII.4 noroviruses over a 34-year period. J Virol 83(22), 11890-11901. Bok, K. and Green, K.Y. (2012) Norovirus Gastroenteritis in Immunocompromised Patients. New England Journal of Medicine 367(22), 2126-2132.

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

Bosch, A., Pintó, R. and Abad, F.X. (2006) Viruses in Foods. Goyal, S. (ed), pp. 151-187, Springer US. Bosch, A., Pintó, R.M. and Guix, S. (2014) Human astroviruses. Clin Microbiol Rev 27(4), 1048-1074. Bowden, S. (2010) PCR for Clinical Microbiology. Schuller, M., Sloots, T.P., James, G.S., Halliday, C.L. and Carter, I.W.J. (eds), pp. 245-248, Springer Netherlands.

Bowman, K.K., Sicard, D.M., Ford, J.M. and Hanawalt, P.C. (2000) Reduced global genomic repair of ultraviolet light-induced cyclobutane pyrimidine dimers in simian virus 40-transformed human cells. Molecular carcinogenesis 29(1), 17-24.

Bozkurt, H., D'Souza, D.H. and Davidson, P.M. (2014) A comparison of the thermal inactivation kinetics of human norovirus surrogates and hepatitis A virus in buffered cell culture medium. Food microbiology 42, 212-217.

Braeye, T., K, D.E.S., Wollants, E., van Ranst, M. and Verhaegen, J. (2015) A large community outbreak of gastroenteritis associated with consumption of drinking water contaminated by river water, Belgium, 2010. Epidemiol Infect 143(4), 711-719.

Breitenmoser, A., Fretz, R., Schmid, J., Besl, A. and Etter, R. (2011) Outbreak of acute gastroenteritis due to a washwater-contaminated water supply, Switzerland, 2008. J Water Health 9(3), 569-576. Brittain-Long, R., Nord, S., Olofsson, S., Westin, J., Anderson, L.M. and Lindh, M. (2008) Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. J Clin Virol 41(1), 53-56.

Brown, B., Oberste, M.S., Maher, K. and Pallansch, M.A. (2003) Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. J Virol 77(16), 8973-8984.

Brumback, B.G. and Wade, C.D. (1994) Simultaneous culture for adenovirus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus in same shell vial by using three-color fluorescence. Journal of Clinical Microbiology 32(9), 2289-2290.

Bucardo, F., Carlsson, B., Nordgren, J., Larson, G., Blandon, P., Vilchez, S. and Svensson, L. (2012) Susceptibility of children to sapovirus infections, Nicaragua, 2005-2006. Emerg Infect Dis 18(11), 1875-1878.

Bucardo, F., Kindberg, E., Paniagua, M., Grahn, A., Larson, G., Vildevall, M. and Svensson, L. (2009) Genetic susceptibility to symptomatic norovirus infection in Nicaragua. J Med Virol 81(4), 728-735. Buckow, R., Isbarn, S., Knorr, D., Heinz, V. and Lehmacher, A. (2008) Predictive model for inactivation of feline calicivirus, a norovirus surrogate, by heat and high hydrostatic pressure. Appl Environ Microbiol 74(4), 1030-1038.

Butler, M., Medien, A.R. and Taylor, G.R. (1985) Electrofocusing of viruses and sensitivity to disinfection. Water Science & Technology 17(10), 201-210.

Butot, S., Putallaz, T. and Sanchez, G. (2008) Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. International journal of food microbiology 126(1), 30-35. Calgua, B., Barardi, C.R.M., Bofill-Mas, S., Rodriguez-Manzano, J. and Girones, R. (2011) Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. J Virol Methods 171(1), 1-7.

Calgua, B., Carratala, A., Guerrero-Latorre, L., de Abreu Correa, A., Kohn, T., Sommer, R. and Girones, R. (2014) UVC Inactivation of dsDNA and ssRNA Viruses in Water: UV Fluences and a qPCR-Based Approach to Evaluate Decay on Viral Infectivity. Food Environ Virol.

Calgua, B., Fumian, T., Rusinol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V.A., Bofill-Mas, S., Miagostovich, M. and Girones, R. (2013a) Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. Water Res 47(8), 2797-2810.

Calgua, B., Fumian, T., Rusiñol, M., Rodriguez-Manzano, J., Mbayed, V.A., Bofill-Mas, S., Miagostovich, M. and Girones, R. (2013b) Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. Water Res 47(8), 2797-2810.

Calgua, B., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Sunen, E., Calvo, M., Bofill-Mas, S. and Girones, R. (2013c) New methods for the concentration of viruses from urban sewage using quantitative PCR. J Virol Methods 187(2), 215-221.

Cao, J., Wang, Y., Song, H., Meng, Q., Sheng, L., Bian, T., Mahemuti, W., Yierhali, A., Omata, M. and Bi, S. (2009) Hepatitis A outbreaks in China during 2006: application of molecular epidemiology. Hepatology international 3(2), 356-363.

Carducci, A., Battistini, R., Rovini, E. and Verani, M. (2009) Viral Removal by Wastewater Treatment: Monitoring of Indicators and Pathogens. Food Environ Virol 1(2), 85-91.

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. Carratalà, A., Rodriguez-Manzano, J., Hundesa, A., Rusiñol, M., Fresno, S., Cook, N. and Girones, R. (2013) Effect of temperature and sunlight on the stability of human adenoviruses and MS2 as fecal contaminants on fresh produce surfaces. Int J Food Microbiol 164(2), 128-134.

Carratala, A., Rusinol, M., Rodriguez-Manzano, J., Guerrero-Latorre, L., Sommer, R. and Girones, R. (2013) Environmental Effectors on the Inactivation of Human Adenoviruses in Water. Food Environ Virol.

Casas, N. and Suñén, E. (2002) Detection of enteroviruses, hepatitis A virus and rotaviruses in sewage by means of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay. Microbiological research 157(3), 169-176.

Cashdollar, J.L., Brinkman, N.E., Griffin, S.M., McMinn, B.R., Rhodes, E.R., Varughese, E.A., Grimm, A.C., Parshionikar, S.U., Wymer, L. and Fout, G.S. (2013) Development and evaluation of EPA method 1615 for detection of enterovirus and norovirus in water. Appl Environ Microbiol 79(1), 215-223. Caul, E.O. and Appleton, H. (1982) The electron microscopical and physical characteristics of small

round human fecal viruses: An interim scheme for classification. J Med Virol 9(4), 257-265. Chan-it, W., Thongprachum, A., Okitsu, S., Mizuguchi, M. and Ushijima, H. (2010) Epidemiology and molecular characterization of sapovirus and astrovirus in Japan, 2008-2009. Jpn J Infect Dis 63(4), 302-303.

Chan, C.M., Chan, C.W., Ma, C.K. and Chan, H.B. (2011) Norovirus as cause of benign convulsion associated with gastro-enteritis. J Paediatr Child Health 47(6), 373-377.

Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M. and Jameel, S. (2008) Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. Journal of biosciences 33(4), 451-464.

Chang, K.O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Wang, Q., Saif, L.J. and Green, K.Y. (2005) Reverse genetics system for porcine enteric calicivirus, a prototype sapovirus in the Caliciviridae. J Virol 79(3), 1409-1416.

Chanit, W., Thongprachum, A., Khamrin, P., Okitsu, S., Mizuguchi, M. and Ushijima, H. (2009) Intergenogroup Recombinant Sapovirus in Japan, 2007–2008. Emerg Infect Dis 15(7), 1084-1087. Chapron, C.D., Ballester, N.A., Fontaine, J.H., Frades, C.N. and Margolin, A.B. (2000) Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. Appl Environ Microbiol 66(6), 2520-2525.

Charles, P. (1984) Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. Adv. Appl. Microbiol 30, 133.

Chen, S.Y., Feng, Y., Chao, H.C., Lai, M.W., Huang, W.L., Lin, C.Y., Tsai, C.N., Chen, C.L. and Chiu, C.H. (2015) Emergence in Taiwan of Novel Norovirus GII.4 Variants Causing Acute Gastroenteritis and Intestinal Hemorrhage in Children. J Med Microbiol.

Chen, S.Y., Tsai, C.N., Lai, M.W., Chen, C.Y., Lin, K.L., Lin, T.Y. and Chiu, C.H. (2009) Norovirus infection as a cause of diarrhea-associated benign infantile seizures. Clin Infect Dis 48(7), 849-855.

Chhabra, P., Payne, D.C., Szilagyi, P.G., Edwards, K.M., Staat, M.A., Shirley, S.H., Wikswo, M., Nix, W.A., Lu, X., Parashar, U.D. and Vinje, J. (2013) Etiology of viral gastroenteritis in children <5 years of age in the United States, 2008-2009. J Infect Dis 208(5), 790-800.

Chiang, P.-S., Huang, M.-L., Luo, S.-T., Lin, T.-Y., Tsao, K.-C. and Lee, M.-S. (2012) Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients.

Chigor, V.N. and Okoh, A.I. (2012) Quantitative RT-PCR detection of hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and source water dams in the Eastern Cape Province of South Africa. Int J Environ Res Public Health 9(11), 4017-4032.

Choi, S. and Jiang, S.C. (2005) Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. Appl Environ Microbiol 71(11), 7426-7433.

Choi, W.S., Rodríguez, R.A. and Sobsey, M.D. (2014) Persistence of viral genomes after autoclaving. J Virol Methods 198(0), 37-40.

Chonmaitree, T., Ford, C., Sanders, C. and Lucia, H.L. (1988) Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. Journal of Clinical Microbiology 26(12), 2576-2580.

Chu, D.K., Poon, L.L., Guan, Y. and Peiris, J.S. (2008) Novel astroviruses in insectivorous bats. J Virol 82(18), 9107-9114.

Chung, P.-W., Huang, Y.-C., Chang, L.-Y., Lin, T.-Y. and Ning, H.-C. (2001) Duration of enterovirus shedding in stool. JOURNAL OF MICROBIOLOGY IMMUNOLOGY AND INFECTION 34(3), 167-170. Clarke, I.N., Estes, M.K., Green, K.Y., Hansman, G.S., Knowles, N.J., Koopmans, M.K., Matson, D.O., Meyers, G., Neill, J.D. and Radford, A. (2012) Caliciviridae, p 977–986. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, CA.

Cole, D., Long, S.C. and Sobsey, M.D. (2003) Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters. Appl Environ Microbiol 69(11), 6507-6514.

Collins, C.H. and Kennedy, D.A. (1992) The microbiological hazards of municipal and clinical wastes. Journal of Applied Bacteriology 73(1), 1-6.

Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V., Grob, J.J., Berbis, P., Lecoq, H., Harle, J.R., Berland, Y. and Raoult, D. (2010) Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, Fever, abdominal pains, and pruritus in humans. PLoS One 5(4), e10041.

Cooper, W.J., Zika, R.G., Petasne, R.G. and Fischer, A.M. (1989) Sunlight-induced photochemistry of humic substances in natural waters: major reactive species. Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants. American Chemical Society, Washington DC. 1989. p 333-362, 6 fig, 5 tab, 136 ref.

Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L. and Perelle, S. (2013) Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. BMC Microbiol 13, 216.

Coursaget, P., Maupas, P., Hibon, P., Lesage, G. and Hubert, M. (1980) Hepatitis A diagnosis in man: radioimmunoassay for hepatitis A antigen detection in faeces. J Med Virol 6(1), 53-60.

Craun, G.F., Brunkard, J.M., Yoder, J.S., Roberts, V.A., Carpenter, J., Wade, T., Calderon, R.L., Roberts, J.M., Beach, M.J. and Roy, S.L. (2010) Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. Clin Microbiol Rev 23(3), 507-528.

Croci, L., Ciccozzi, M., De Medici, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A. and Toti, L. (1999) Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. J Appl Microbiol 87(6), 884-888.

Croxson, M.C. and Bellamy, A.R. (1981) Extraction of rotavirus from human feces by treatment with lithium dodecyl sulfate. Appl Environ Microbiol 41(1), 255-260.

Cubitt, W.D. and Barrett, A.D. (1984) Propagation of human candidate calicivirus in cell culture. J Gen Virol 65 (Pt 6), 1123-1126.

Currier, R.L., Payne, D.C., Staat, M.A., Selvarangan, R., Shirley, S.H., Halasa, N., Boom, J.A., Englund, J.A., Szilagyi, P.G., Harrison, C.J., Klein, E.J., Weinberg, G.A., Wikswo, M.E., Parashar, U., Vinje, J. and Morrow, A.L. (2015) Innate Susceptibility to Norovirus Infections Influenced by FUT2 Genotype in a United States Pediatric Population. Clin Infect Dis.

Dahling, D.R. and Wright, B.A. (1986) Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. Appl Environ Microbiol 51(4), 790-812. Dai, X.Q., Hua, X.G., Shan, T.L., Delwart, E. and Zhao, W. (2010) Human cosavirus infections in children in China. J Clin Virol 48(3), 228-229.

Dai, Y.C., Zhang, X.F., Xia, M., Tan, M., Quigley, C., Lei, W., Fang, H., Zhong, W., Lee, B., Pang, X., Nie, J. and Jiang, X. (2015) Antigenic Relatedness of Norovirus GII.4 Variants Determined by Human Challenge Sera. PLoS One 10(4), e0124945.

Dalton, H.R., Stableforth, W., Hazeldine, S., Thurairajah, P., Ramnarace, R., Warshow, U., Ijaz, S., Ellis, V. and Bendall, R. (2008) Autochthonous hepatitis E in Southwest England: a comparison with hepatitis A. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 27(7), 579-585.

Daughenbaugh, K.F., Fraser, C.S., Hershey, J.W.B. and Hardy, M.E. (2003) The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. The EMBO journal 22(11), 2852-2859.

Davison, A.J., Benkő, M. and Harrach, B. (2003) Genetic content and evolution of adenoviruses. Journal of General Virology 84(11), 2895-2908.

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.

de Rougemont, A. (2012) Rôle des antigènes tissulaires de groupes sanguins

humains A, B, H et Lewis dans l'évolution des Norovirus

GII.4, UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

de Wit, M.A., Koopmans, M.P., Kortbeek, L.M., Wannet, W.J., Vinje, J., van Leusden, F., Bartelds, A.I. and van Duynhoven, Y.T. (2001) Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. Am J Epidemiol 154(7), 666-674.

Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L. and Héchard, Y. (2013) Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. Water Res 47(19), 6958-6965.

Dennehy, P.H., Nelson, S.M., Spangenberger, S., Noel, J.S., Monroe, S.S. and Glass, R.I. (2001) A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. J Infect Dis 184(1), 10-15.

Dey, S.K., Hoq, I., Okitsu, S., Hayakawa, S. and Ushijima, H. (2013) Prevalence, seasonality, and peak age of infection of enteric adenoviruses in Japan, 1995-2009. Epidemiol Infect 141(5), 958-960. Dey, S.K., Mizuguchi, M., Okitsu, S. and Ushijima, H. (2011) Novel recombinant sapovirus in Bangladesh. Clin Lab 57(1-2), 91-94.

Dey, S.K., Phathammavong, O., Nguyen, T.D., Thongprachum, A., Chan-It, W., Okitsu, S., Mizuguchi, M. and Ushijima, H. (2012) Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003-2009. Epidemiol Infect 140(1), 74-77.

Di Bartolo, I., Pavoni, E., Tofani, S., Consoli, M., Galuppini, E., Losio, M.N., Ruggeri, F.M. and Varisco, G. (2015) Waterborne norovirus outbreak during a summer excursion in Northern Italy. New Microbiol 38(1), 109-112.

Di Bonito, P., Libera, S.D., Petricca, S., Iaconelli, M., Accardi, L., Muscillo, M. and La Rosa, G. (2015) Frequent and abundant merkel cell polyomavirus detection in urban wastewaters in Italy. Food Environ Virol 7(1), 1-6.

Dick, A., Harrower, B., Lyon, M. and Harley, D. (2001) A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 3. Communicable diseases intelligence 25(1), 9.

Dingle, T.C., Sedlak, R.H., Cook, L. and Jerome, K.R. (2013) Tolerance of droplet-digital PCR vs realtime quantitative PCR to inhibitory substances. Clin Chem 59(11), 1670-1672.

Diniz-Mendes, L., Paula, V.S., Luz, S.L. and Niel, C. (2008) High prevalence of human Torque teno virus in streams crossing the city of Manaus, Brazilian Amazon. J Appl Microbiol 105(1), 51-58.

Diston, D., Ebdon, J.E. and Taylor, H.D. (2014) Inactivation of bacteriophage infecting Bacteroides strain GB124 using UV-B radiation. Photochem Photobiol 90(3), 622-627.

Divizia, M., Gabrieli, R., Donia, D., Macaluso, A., Bosch, A., Guix, S., Snchez, G., Villena, C., Pint, R. and Palombi, L. (2004) Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. Water Science & Technology 50(1), 57-61.

Djikeng, A., Kuzmickas, R., Anderson, N.G. and Spiro, D.J. (2009) Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. PLoS One 4(9), e7264.

Dong, Y., Kim, J. and Lewis, G.D. (2010) Evaluation of methodology for detection of human adenoviruses in wastewater, drinking water, stream water and recreational waters. J Appl Microbiol 108(3), 800-809.

Dubois, E., Agier, C., Traoré, O., Hennechart, C., Merle, G., Crucière, C. and Laveran, H. (2002) Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. Journal of Food Protection[®] 65(12), 1962-1969.

Duizer, E., Schwab, K.J., Neill, F.H., Atmar, R.L., Koopmans, M.P. and Estes, M.K. (2004) Laboratory efforts to cultivate noroviruses. J Gen Virol 85(Pt 1), 79-87.

Einarsson, E., Svärd, S.G. and Troell, K. (2015) UV irradiation responses in Giardia intestinalis. Experimental parasitology 154, 25-32.

El-Mohammady, H., Mansour, A., Shaheen, H.I., Henien, N.H., Motawea, M.S., Raafat, I., Moustafa, M., Adib-Messih, I.A., Sebeny, P.J., Young, S.Y. and Klena, J.D. (2012) Increase in the detection rate of viral and parasitic enteric pathogens among Egyptian children with acute diarrhea. J Infect Dev Ctries 6(11), 774-781.

El Bakkouri, M., Fabry, C.M., Fender, P. and Schoehn, G. (2008) Structure des adénovirus. Virologie 12(4), 275-292.

Emerson, M.A., Sproul, O.J. and Buck, C.E. (1982) Ozone inactivation of cell-associated viruses. Appl Environ Microbiol 43(3), 603-608.

Enriquez, C.E., Hurst, C.J. and Gerba, C.P. (1995) Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. Water Res 29(11), 2548-2553.

Esposito, D.H., Holman, R.C., Haberling, D.L., Tate, J.E., Podewils, L.J., Glass, R.I. and Parashar, U. (2011) Baseline estimates of diarrhea-associated mortality among United States children before rotavirus vaccine introduction. Pediatr Infect Dis J 30(11), 942-947.

Estes, M.K. and Kapikian, A.Z. (2007) Rotaviruses, p 1917–1974. Fields virology 2.

Faber, M.S., Stark, K., Behnke, S.C., Schreier, E. and Frank, C. (2009) Epidemiology of hepatitis A virus infections, Germany, 2007-2008. Emerg Infect Dis 15(11), 1760-1768.

Farkas, T., Sestak, K., Wei, C. and Jiang, X. (2008) Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. J Virol 82(11), 5408-5416.

Farkas, T., Zhong, W.M., Jing, Y., Huang, P.W., Espinosa, S.M., Martinez, N., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Pickering, L.K. and Jiang, X. (2004) Genetic diversity among sapoviruses. Arch Virol 149(7), 1309-1323.

Farrah, S.R., Gerba, C.P., Wallis, C. and Melnick, J.L. (1976) Concentration of viruses from large volumes of tap water using pleated membrane filters. Appl Environ Microbiol 31(2), 221-226.

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.

Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L.A. (2005) Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press.

Feigin, A., Ravina, I. and Shalhevet, J. (2012) Irrigation with treated sewage effluent: management for environmental protection, Springer Science & Business Media.

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y. and Moore, P.S. (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science 319(5866), 1096-1100.

Fernandez, M.D., Torres, C., Poma, H.R., Riviello-Lopez, G., Martinez, L.C., Cisterna, D.M., Rajal, V.B., Nates, S.V. and Mbayed, V.A. (2012) Environmental surveillance of norovirus in Argentina revealed distinct viral diversity patterns, seasonality and spatio-temporal diffusion processes. Sci Total Environ 437, 262-269.

Finch, G.R. and Fairbairn, N. (1991) Comparative inactivation of poliovirus type 3 and MS2 coliphage in demand-free phosphate buffer by using ozone. Appl Environ Microbiol 57(11), 3121-3126. Finkbeiner, S.R., Kirkwood, C.D. and Wang, D. (2008) Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. Virol J 5, 117.

Fino, V.R. and Kniel, K.E. (2008) UV light inactivation of hepatitis A virus, Aichi virus, and feline calicivirus on strawberries, green onions, and lettuce. Journal of Food Protection® 71(5), 908-913. Fischer, T.K., Viboud, C., Parashar, U., Malek, M., Steiner, C., Glass, R. and Simonsen, L. (2007) Hospitalizations and deaths from diarrhea and rotavirus among children <5 years of age in the United States, 1993-2003. J Infect Dis 195(8), 1117-1125.

Flaegstad, T., Ronne, K., Filipe, A.R. and Traavik, T. (1989) Prevalence of anti BK virus antibody in Portugal and Norway. Scand J Infect Dis 21(2), 145-147.

Flynn, W.T. and Saif, L.J. (1988) Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures. Journal of Clinical Microbiology 26(2), 206-212.

Fonager, J., Hindbaek, L.S. and Fischer, T.K. (2013) Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. Euro Surveill 18(9).

Fong, T.-T., Phanikumar, M.S., Xagoraraki, I. and Rose, J.B. (2010) Quantitative Detection of Human Adenoviruses in Wastewater and Combined Sewer Overflows Influencing a Michigan River. Appl Environ Microbiol 76(3), 715-723.

Fout, G.S., Martinson, B.C., Moyer, M.W. and Dahling, D.R. (2003) A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. Appl Environ Microbiol 69(6), 3158-3164.

Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. and Brown, F. (2012) Classification and Nomenclature of Viruses: Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division of the International Union of Microbiological Societies, Springer Science & Business Media.

Friesema, I.H., Vennema, H., Heijne, J.C., de Jager, C.M., Morroy, G., van den Kerkhof, J.H., de Coster, E.J., Wolters, B.A., ter Waarbeek, H.L., Fanoy, E.B., Teunis, P.F., van der Linde, R. and van Duynhoven, Y.T. (2009) Norovirus outbreaks in nursing homes: the evaluation of infection control measures. Epidemiol Infect 137(12), 1722-1733.

Friesema, I.H.M., Lugnér, 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.

Fu, H., Ikehata, K., Buchanan, I.D. and El-Din, M.G. (2007) Health effects associated with wastewater treatment, disposal, and reuse. Water environment research 79(10), 2161.

Fuentes, C., Bosch, A., Pintó, R.M. and Guix, S. (2012) Identification of human astrovirus genomelinked protein (VPg) essential for virus infectivity. J Virol 86(18), 10070-10078.

Fujioka, R. and Yoneyama, B. (2002) Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. Water Science & Technology 46(11-12), 291-295.

Fumian, T.M., Leite, J.P.G., Castello, A.A., Gaggero, A., Caillou, M.S.L.d. and Miagostovich, M.P. (2010) Detection of rotavirus A in sewage samples using multiplex qPCR and an evaluation of the ultracentrifugation and adsorption-elution methods for virus concentration. J Virol Methods 170(1– 2), 42-46.

Futch, J.C., Griffin, D.W. and Lipp, E.K. (2010) Human enteric viruses in groundwater indicate offshore transport of human sewage to coral reefs of the Upper Florida Keys. Environ Microbiol 12(4), 964-974.

Ganesh, A. and Lin, J. (2013) Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. International journal of environmental health research 23(6), 544-564.

Gantzer, C., Henny, J. and Schwartzbrod, L. (2002) Bacteroides fragilis and Escherichia coli bacteriophages in human faeces. Int J Hyg Environ Health 205(4), 325-328.

Gantzer, C., Maul, A., Audic, J.M. and Schwartzbrod, L. (1998) Detection of Infectious Enteroviruses, Enterovirus Genomes, Somatic Coliphages, and Bacteroides fragilis Phages in Treated Wastewater. Appl Environ Microbiol 64(11), 4307-4312.

Gantzer, C., Senouci, S., Maul, A., Levi, Y. and Schwartzbrod, L. (1997) Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. J Virol Methods 65(2), 265-271.

Gardner, S.D. (1973) Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.k.). Br Med J 1(5845), 77-78.

Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V. and Hulme, B. (1971) New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet 1(7712), 1253-1257.

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

Gaynor, A.M., Nissen, M.D., Whiley, D.M., Mackay, I.M., Lambert, S.B., Wu, G., Brennan, D.C., Storch, G.A., Sloots, T.P. and Wang, D. (2007) Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog 3(5), e64.

Gerba, C.P., Abd-Elmaksoud, S., Newick, H., El-Esnawy, N.A., Barakat, A. and Ghanem, H. (2015) Assessment of coliphage surrogates for testing drinking water treatment devices. Food Environ Virol 7(1), 27-31. Gerba, C.P., Farrah, S.R., Goyal, S.M., Wallis, C. and Melnick, J.L. (1978) Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater. Appl Environ Microbiol 35(3), 540-548.

Gerba, C.P., Gramos, D.M. and Nwachuku, N. (2002) Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. Appl Environ Microbiol 68(10), 5167-5169.

Gerna, G., Battaglia, M., Milenesi, G., Passarani, N., Percivalle, E. and Cattaneo, E. (1984) Serotyping of cell culture-adapted subgroup 2 human rotavirus strains by neutralization. Infection and immunity 43(2), 722-729.

Ghebremedhin, B. (2014) Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. European Journal of Microbiology & Immunology 4(1), 26-33.

Giammanco, G.M., Di Bartolo, I., Purpari, G., Costantino, C., Rotolo, V., Spoto, V., Geraci, G., Bosco, G., Petralia, A., Guercio, A., Macaluso, G., Calamusa, G., De Grazia, S., Ruggeri, F.M., Vitale, F., Maida, C.M. and Mammina, C. (2014) Investigation and control of a Norovirus outbreak of probable waterborne transmission through a municipal groundwater system. J Water Health 12(3), 452-464. Giaquinto, C. and van Damme, P. (2010) Age distribution of paediatric rotavirus gastroenteritis cases in Europe: the REVEAL study. Scand J Infect Dis 42(2), 142-147.

Gibbons, C. (2008) Concentration of adenoviruses and noroviruses from seawater with argonide nanoceram cartridge filters: Method effectiveness and occurrence in southern California recreational waters.

Gibbons, C.D., Rodriguez, R.A., Tallon, L. and Sobsey, M.D. (2010) Evaluation of positively charged alumina nanofibre cartridge filters for the primary concentration of noroviruses, adenoviruses and male-specific coliphages from seawater. J Appl Microbiol 109(2), 635-641.

Gibson, K.E. and Schwab, K.J. (2011) Detection of bacterial indicators and human and bovine enteric viruses in surface water and groundwater sources potentially impacted by animal and human wastes in Lower Yakima Valley, Washington. Appl Environ Microbiol 77(1), 355-362.

Gibson, U.E., Heid, C.A. and Williams, P.M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 6(10), 995-1001.

Gilpatrick, S.G., Schwab, K.J., Estes, M.K. and Atmar, R.L. (2000) Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of Norwalk virus. J Virol Methods 90(1), 69-78.

Gómez-Doñate, M., Payán, A., Cortés, I., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J. and Muniesa, M. (2011) Isolation of bacteriophage host strains of Bacteroides species suitable for tracking sources of animal faecal pollution in water. Environmental Microbiology 13(6), 1622-1631.

Goodridge, L., Goodridge, C., Wu, J., Griffiths, M. and Pawliszyn, J. (2004) Isoelectric point determination of norovirus virus-like particles by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection. Analytical chemistry 76(1), 48-52.

Goyer, M., Aho, L.S., Bour, J.B., Ambert-Balay, K. and Pothier, P. (2008) Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006-2007. Arch Virol 153(6), 1171-1174.

Grabow, W.O., Botma, K.L., de Villiers, J.C., Clay, C.G. and Erasmus, B. (1999) Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater/WOK Grabow...[et al.].

Grabow, W.O., Gauss-Müller, V., Prozesky, O.W. and Deinhardt, F. (1983) Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. Appl Environ Microbiol 46(3), 619-624.

Grabow, W.O.K., Puttergill, D.L. and Bosch, A. (1992) Propagation of adenovirus types 40 and 41 in the PLC/PRF/5 primary liver carcinoma cell line. J Virol Methods 37(2), 201-207.

Grady Jr, C.P.L., Daigger, G.T., Love, N.G. and Filipe, C.D.M. (2011) Biological wastewater treatment, CRC Press.

Graham, D.Y., Dufour, G.R. and Estes, M.K. (1987) Minimal infective dose of rotavirus. Arch Virol 92(3-4), 261-271.

Graham, F.L. (1987) Growth of 293 cells in suspension culture. J Gen Virol 68(Pt 3), 937-940.

Graiver, D.A., Saunders, S.E., Topliff, C.L., Kelling, C.L. and Bartelt-Hunt, S.L. (2010) Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. J Virol Methods 164(1), 51-54.

Grassi, T., Bagordo, F., Idolo, A., Lugoli, F., Gabutti, G. and De Donno, A. (2010) Rotavirus detection in environmental water samples by tangential flow ultrafiltration and RT-nested PCR. Environ Monit Assess 164(1-4), 199-205.

Green, D.H. and Lewis, G.D. (1999) Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture. Water Res 33(5), 1195-1200. Gregory, J.B., Litaker, R.W. and Noble, R.T. (2006) Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. Appl Environ Microbiol 72(6), 3960-3967.

Greig, J.D. and Lee, M.B. (2009) Enteric outbreaks in long-term care facilities and recommendations for prevention: a review. Epidemiol Infect 137(2), 145-155.

Greninger, A.L., Runckel, C., Chiu, C.Y., Haggerty, T., Parsonnet, J., Ganem, D. and DeRisi, J.L. (2009) The complete genome of klassevirus - a novel picornavirus in pediatric stool. Virol J 6, 82.

Griffin, J.S., Plummer, J.D. and Long, S.C. (2008) Torque teno virus: an improved indicator for viral pathogens in drinking waters. Virol J 5, 112.

Grimm, A.C., Cashdollar, J.L., Williams, F.P. and Fout, G.S. (2004) Development of an astrovirus RT-PCR detection assay for use with conventional, real-time, and integrated cell culture/RT-PCR. Can J Microbiol 50(4), 269-278.

Grinde, B., Jonassen, T. and Ushijima, H. (1995) Sensitive detection of group A rotaviruses by immunomagnetic separation and reverse transcription-polymerase chain reaction. J Virol Methods 55(3), 327-338.

Grøndahl-Rosado, R., Yarovitsyna, E., Trettenes, E., Myrmel, 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.

Grondahl-Rosado, R.C., Yarovitsyna, E., Trettenes, E., Myrmel, M. and Robertson, L.J. (2014) A One Year Study on the Concentrations of Norovirus and Enteric Adenoviruses in Wastewater and A Surface Drinking Water Source in Norway. Food Environ Virol.

Guix, S., Bosch, A. and Pinto, R.M. (2005a) Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects. Lett Appl Microbiol 41(2), 103-105.

Guix, S., Bosch, A. and Pintó, R.M. (2013) Astrovirus Research, pp. 97-118, Springer.

Guix, S., Caballero, S., Bosch, A. and Pintó, R.M. (2005b) Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. Virology 333(1), 124-131.

Guo, L., Xu, X., Song, J., Wang, W., Wang, J. and Hung, T. (2010) Molecular characterization of astrovirus infection in children with diarrhea in Beijing, 2005-2007. J Med Virol 82(3), 415-423. Hai, F.I., Yamamoto, K. and Lee, C.-H. (2013) Membrane Biological Reactors: Theory, Modeling, Design, Management and Applications to Wastewater Reuse, IWA Publishing.

Hammond, G., Hannan, C., Yeh, T., Fischer, K., Mauthe, G. and Straus, S.E. (1987) DNA hybridization for diagnosis of enteric adenovirus infection from directly spotted human fecal specimens. Journal of Clinical Microbiology 25(10), 1881-1885.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Uberla, K. and Wilhelm, M. (2009) Detection of human viruses in rivers of a densly-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. Water Res 43(10), 2657-2668.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K. and Wilhelm, M. (2011a) Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. Water Res 45(3), 1358-1368.

Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K. and Wilhelm, M. (2011b) Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. Int J Hyg Environ Health 214(6), 424-436.

Han, M.G., Wang, Q., Smiley, J.R., Chang, K.O. and Saif, L.J. (2005) Self-Assembly of the Recombinant Capsid Protein of a Bovine Norovirus (BoNV) into Virus-Like Particles and Evaluation of Cross-Reactivity of BoNV with Human Noroviruses. Journal of Clinical Microbiology 43(2), 778-785.
Hansman, G.S., Guntapong, R., Pongsuwanna, Y., Natori, K., Katayama, K. and Takeda, N. (2006a) Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. Arch Virol 151(3), 551-561.

Hansman, G.S., Natori, K., Oka, T., Ogawa, S., Tanaka, K., Nagata, N., Ushijima, H., Takeda, N. and Katayama, K. (2005) Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. Arch Virol 150(1), 21-36.

Hansman, G.S., Oka, T., Sakon, N. and Takeda, N. (2007) Antigenic diversity of human sapoviruses. Emerg Infect Dis 13(10), 1519-1525.

Hansman, G.S., Oka, T. and Takeda, N. (2008) Sapovirus-like particles derived from polyprotein. Virus Res 137(2), 261-265.

Hansman, G.S., Takeda, N., Katayama, K., Tu, E.T., McIver, C.J., Rawlinson, W.D. and White, P.A. (2006b) Genetic Diversity of Sapovirus in Children, Australia. Emerg Infect Dis 12(1), 141-143.

Haque, F., Banu, S.S., Ara, K., Chowdhury, I.A., Chowdhury, S.A., Kamili, S., Rahman, M. and Luby, S.P. (2015) An outbreak of hepatitis E in an urban area of Bangladesh. J Viral Hepat.

Harada, S., Oka, T., Tokuoka, E., Kiyota, N., Nishimura, K., Shimada, Y., Ueno, T., Ikezawa, S., Wakita, T., Wang, Q., Saif, L.J. and Katayama, K. (2012) A confirmation of sapovirus re-infection

gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. Arch Virol 157(10), 1999-2003.

Harada, S., Tokuoka, E., Kiyota, N., Katayama, K. and Oka, T. (2013) Phylogenetic analysis of the nonstructural and structural protein encoding region sequences, indicating successive appearance of genomically diverse sapovirus strains from gastroenteritis patients. Jpn J Infect Dis 66(5), 454-457. Haramoto, E., Fujino, S. and Otagiri, M. (2015) Distinct behaviors of infectious F-specific RNA coliphage genogroups at a wastewater treatment plant. Sci Total Environ 520, 32-38.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K. and Ohgaki, S. (2007) Quantitative analysis of human enteric adenoviruses in aquatic environments. J Appl Microbiol 103(6), 2153-2159.

Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., Yamashita, H., Nakajima, E. and Ohgaki, S. (2005) One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in wastewater treatment plants in Japan. Water Res 39(10), 2008-2013.

Haramoto, E., Katayama, H. and Ohgaki, S. (2004) Detection of Noroviruses in Tap Water in Japan by Means of a New Method for Concentrating Enteric Viruses in Large Volumes of Freshwater. Appl Environ Microbiol 70(4), 2154-2160.

Haramoto, E., Katayama, H., Utagawa, E. and Ohgaki, S. (2009) Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. J Virol Methods 160(1-2), 206-209.

Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H. and Ohgaki, S. (2010) Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. Water Res 44(6), 1747-1752.

Haramoto, E., Kitajima, M. and Otagiri, M. (2013) Development of a Reverse Transcription-Quantitative PCR Assay for Detection of Salivirus/Klassevirus. Appl Environ Microbiol 79(11), 3529-3532.

Haramoto, E. and Otagiri, M. (2014) Occurrence of Human Cosavirus in Wastewater and River Water in Japan. Food Environ Virol 6(1), 62-66.

Harrach, B., Benkö, M., Both, G.W., Brown, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Hess, M., Jones, M.S., Kajon, A. and Lehmkuhl, H.D. (2012) Family Adenoviridae, p 125–141. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Hasing, M.E., Lee, B.E., Preiksaitis, J.K., Tellier, R., Honish, L., Senthilselvan, A. and Pang, X.L. (2013) Emergence of a new norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013. J Clin Microbiol 51(7), 2204-2211. Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C. and Furumai, H. (2011) Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. Appl Environ Microbiol 77(13), 4336-4343. Hata, A., Katayama, H., Kojima, K., Sano, S., Kasuga, I., Kitajima, M. and Furumai, H. (2014) Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows. Science of the Total Environment 468, 757-763.

Hauri, A.M., Schimmelpfennig, M., Walter-Domes, M., Letz, A., Diedrich, S., Lopez-Pila, J. and Schreier, E. (2005) An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. Epidemiol Infect 133(02), 291-298.

Heim, A., Ebnet, C., Harste, G. and Pring-Åkerblom, P. (2003) Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR. J Med Virol 70(2), 228-239.

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.

Herrmann, J.E., Hudson, R.W., Perron-Henry, D.M., Kurtz, J.B. and Blacklow, N.R. (1988) Antigenic characterization of cell-cultivated astrovirus serotypes and development of astrovirus-specific monoclonal antibodies. J Infect Dis 158(1), 182-185.

Hewitt, J., Greening, G.E., Leonard, M. and Lewis, G.D. (2013) Evaluation of human adenovirus and human polyomavirus as indicators of human sewage contamination in the aquatic environment. Water Res 47(17), 6750-6761.

Hierholzer, J.C. and Killington, R.A. (1996) Virology Methods Manual. Kangro, B.W.J.M.O. (ed), pp. 25-46, Academic Press, London.

Higgins, G., Schepetiuk, S. and Ratcliff, R. (2012) Aetiological importance of viruses causing acute gastroenteritis in humans. Microbiology Australia 33(2), 49-52.

Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F. and Medema, G.J. (2006) Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water: a review. Water Res 40(1), 3-22.

Hill, V.R., Polaczyk, A.L., Hahn, D., Narayanan, J., Cromeans, T.L., Roberts, J.M. and Amburgey, J.E. (2005) Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants. Appl Environ Microbiol 71(11), 6878-6884.

Hoebe, C.J., Vennema, H., de Roda Husman, A.M. and van Duynhoven, Y.T. (2004) Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. J Infect Dis 189(4), 699-705.

Holtz, L.R., Finkbeiner, S.R., Kirkwood, C.D. and Wang, D. (2008) Identification of a novel picornavirus related to cosaviruses in a child with acute diarrhea. Virol J 5, 159.

Honjo, M.N., Minamoto, T., Matsui, K., Uchii, K., Yamanaka, H., Suzuki, A.A., Kohmatsu, Y., Iida, T. and Kawabata, Z. (2010) Quantification of cyprinid herpesvirus 3 in environmental water by using an external standard virus. Appl Environ Microbiol 76(1), 161-168.

Honkanen, H., Oikarinen, S., Pakkanen, O., Ruokoranta, T., Pulkki, M.M., Laitinen, O.H., Tauriainen, S., Korpela, S., Lappalainen, M., Vuorinen, T., Haapala, A.-M., Veijola, R., Simell, O., Ilonen, J., Knip, M. and Hyöty, H. (2013) Human enterovirus 71 strains in the background population and in hospital patients in Finland. Journal of Clinical Virology 56(4), 348-353.

Horman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Torvela, N., Heikinheimo, A. and Hanninen, M.L. (2004) Campylobacter spp., Giardia spp., Cryptosporidium spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. Appl Environ Microbiol 70(1), 87-95.

Hsu, B.M., Chen, C.H., Kung, C.M., Wan, M.T. and Shen, S.M. (2007) Evaluation of enterovirus recovery in surface water by different adsorption and elution procedures. Chemosphere 66(5), 964-969.

Hsu, F.C., Shieh, Y.S., van Duin, J., Beekwilder, M.J. and Sobsey, M.D. (1995) Genotyping male-specific RNA coliphages by hybridization with oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol 61(11), 3960-3966.

Huang, G.H. and Xu, W.B. (2013) [Recent advance in new types of human adenovirus]. Bing Du Xue Bao 29(3), 342-348.

Hurst, C.J., Dahling, D.R., Safferman, R.S. and Goyke, T. (1984) Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples. Can J Microbiol 30(10), 1253-1263.

Hurwitz, B.L., Deng, L., Poulos, B.T. and Sullivan, M.B. (2013) Evaluation of methods to concentrate and purify ocean virus communities through comparative, replicated metagenomics. Environ Microbiol 15(5), 1428-1440.

Hwang, Y.-C., Chen, W. and Yates, M.V. (2006) Use of fluorescence resonance energy transfer for rapid detection of enteroviral infection in vivo. Appl Environ Microbiol 72(5), 3710-3715.

lizuka, S., Oka, T., Tabara, K., Omura, T., Katayama, K., Takeda, N. and Noda, M. (2010) Detection of sapoviruses and noroviruses in an outbreak of gastroenteritis linked genetically to shellfish. J Med Virol 82(7), 1247-1254.

Ikner, L.A., Soto-Beltran, M. and Bright, K.R. (2011) New method using a positively charged microporous filter and ultrafiltration for concentration of viruses from tap water. Appl Environ Microbiol 77(10), 3500-3506.

Ito, S., Takeshita, S., Nezu, A., Aihara, Y., Usuku, S., Noguchi, Y. and Yokota, S. (2006) Norovirus-associated encephalopathy. Pediatr Infect Dis J 25(7), 651-652.

Iturriza-Gomara, M., Dallman, T., Banyai, K., Bottiger, B., Buesa, J., Diedrich, S., Fiore, L., Johansen, K., Koopmans, M., Korsun, N., Koukou, D., Kroneman, A., Laszlo, B., Lappalainen, M., Maunula, L.,

Marques, A.M., Matthijnssens, J., Midgley, S., Mladenova, Z., Nawaz, S., Poljsak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., Sanchez-Fauquier, A., Steyer, A., Sidaraviciute-Ivaskeviciene, I., Syriopoulou, V.,

Tran, A.N., Usonis, V., M, V.A.N.R., A, D.E.R. and Gray, J. (2011) Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. Epidemiol Infect 139(6), 895-909.

Iturriza-Gomara, M., Elliot, A.J., Dockery, C., Fleming, D.M. and Gray, J.J. (2009) Structured surveillance of infectious intestinal disease in pre-school children in the community: 'The Nappy Study'. Epidemiol Infect 137(7), 922-931.

Iturriza Gomara, M., Simpson, R., Perault, A.M., Redpath, C., Lorgelly, P., Joshi, D., Mugford, M., Hughes, C.A., Dalrymple, J., Desselberger, U. and Gray, J. (2008) Structured surveillance of infantile gastroenteritis in East Anglia, UK: incidence of infection with common viral gastroenteric pathogens. Epidemiol Infect 136(1), 23-33.

Iwakiri, A., Ganmyo, H., Yamamoto, S., Otao, K., Mikasa, M., Kizoe, S., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N. and Oka, T. (2009) Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. Arch Virol 154(4), 689-693. Jack, S., Bell, D. and Hewitt, J. (2013) Norovirus contamination of a drinking water supply at a hotel resort. N Z Med J 126(1387), 98-107.

Jacob, P., Henry, A., Meheut, G., Charni-Ben-Tabassi, N., Ingrand, V. and Helmi, K. (2015) Health risk assessment related to waterborne pathogens from the river to the tap. Int J Environ Res Public Health 12(3), 2967-2983.

Jacobsen, K.H. and Koopman, J.S. (2004) Declining hepatitis A seroprevalence: a global review and analysis. Epidemiol Infect 132(6), 1005-1022.

Jakubowski, W., Hill, W.F., Jr. and Clarke, N.A. (1975) Comparative study of four microporous filters for concentrating viruses from drinking water. Appl Microbiol 30(1), 58-65.

Jeong, A.Y., Jeong, H.S., Jo, M.Y., Jung, S.Y., Lee, M.S., Lee, J.S., Jee, Y.M., Kim, J.H. and Cheon, D.S. (2011) Molecular epidemiology and genetic diversity of human astrovirus in South Korea from 2002 to 2007. Clinical Microbiology and Infection 17(3), 404-408.

Jeong, H.S., Jeong, A. and Cheon, D.-S. (2012) Epidemiology of astrovirus infection in children. Korean journal of pediatrics 55(3), 77-82.

Jiang, X., Cubitt, W.D., Berke, T., Zhong, W., Dai, X., Nakata, S., Pickering, L.K. and Matson, D.O. (1997) Sapporo-like human caliciviruses are genetically and antigenically diverse. Arch Virol 142(9), 1813-1827.

Discussion générale - Conclusions

Jiang, X., Zhong, W., Kaplan, M., Pickering, L.K. and Matson, D.O. (1999) Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. J Virol Methods 78(1-2), 81-91.

Jiang, Y.J., Liao, G.Y., Zhao, W., Sun, M.B., Qian, Y., Bian, C.X. and Jiang, S.D. (2004) Detection of infectious hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Appl Microbiol 97(5), 1105-1112.

Jofre, J. (2009) Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? J Appl Microbiol 106(4), 1059-1069.

Johansson, P.J., Bergentoft, K., Larsson, P.A., Magnusson, G., Widell, A., Thorhagen, M. and Hedlund, K.O. (2005) A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. Scand J Infect Dis 37(3), 200-204.

Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M. and Ulrich, R.G. (2014) Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses. Infection, Genetics and Evolution 27, 212-229.

Jonassen, T.O., Monceyron, C., Lee, T.W., Kurtz, J.B. and Grinde, B. (1995) Detection of all serotypes of human astrovirus by the polymerase chain reaction. J Virol Methods 52(3), 327-334.

Jones, E.L., Gaither, M., Kramer, A. and Gerba, C.P. (2009) An analysis of water quality in the Colorado River, 2003–04; an investigation into recurring outbreaks of norovirus among rafters. Wilderness Environ Med 20(1), 6-13.

Jothikumar, N., Cliver, D.O. and Mariam, T.W. (1998) Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. Appl Environ Microbiol 64(2), 504-508.

Jubelt, B. and Lipton, H.L. (2014) Enterovirus/picornavirus infections. Handb Clin Neurol 123, 379-416.

Jurzik, L., Hamza, I.A., Puchert, W., Uberla, K. and Wilhelm, M. (2010) Chemical and microbiological parameters as possible indicators for human enteric viruses in surface water. Int J Hyg Environ Health 213(3), 210-216.

Kadoi, K. and Kadoi, B.K. (2001) Stability of feline caliciviruses in marine water maintained at different temperatures. New Microbiol 24(1), 17-21.

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

Kaneko, H., Maruko, I., Iida, T., Ohguchi, T., Aoki, K., Ohno, S. and Suzutani, T. (2008) The possibility of human adenovirus detection from the conjunctiva in asymptomatic cases during nosocomial infection. Cornea 27(5), 527-530.

Kang, G., Desai, R., Arora, R., Chitamabar, S., Naik, T.N., Krishnan, T., Deshpande, J., Gupte, M.D., Venkatasubramaniam, S., Gentsch, J.R., Parashar, U.D., Mathew, A., Anita, Sr., Ramani, S.,

Sowmynarayanan, T.V., Moses, P.D., Agarwal, I., Simon, A., Bose, A., Arora, R., Chhabra, P., Fadnis, P., Bhatt, J., Shetty, S.J., Saxena, V.K., Mathur, M., Jadhav, A., Roy, S., Mukherjee, A. and Singh, N.B. (2013) Diversity of circulating rotavirus strains in children hospitalized with diarrhea in India, 2005-2009. Vaccine 31(27), 2879-2883.

Kapoor, A., Li, L., Victoria, J., Oderinde, B., Mason, C., Pandey, P., Zaidi, S.Z. and Delwart, E. (2009) Multiple novel astrovirus species in human stool. J Gen Virol 90(Pt 12), 2965-2972.

Kapoor, A., Victoria, J., Simmonds, P., Slikas, E., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Sharif, S., Alam, M.M., Angez, M., Wang, C., Shafer, R.W., Zaidi, S. and Delwart, E. (2008) A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. Proc Natl Acad Sci U S A 105(51), 20482-20487.

Kapusinszky, B., Phan, T.G., Kapoor, A. and Delwart, E. (2012) Genetic diversity of the genus Cosavirus in the family Picornaviridae: a new species, recombination, and 26 new genotypes. PLoS One 7(5), e36685.

Karamoko, Y., Ibenyassine, K., Aitmhand, R., Idaomar, M. and Ennaji, M.M. (2005) Adenovirus detection in shellfish and urban sewage in Morocco (Casablanca region) by the polymerase chain reaction. J Virol Methods 126(1), 135-137.

Karim, M.R., Fout, G.S., Johnson, C.H., White, K.M. and Parshionikar, S.U. (2015) Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. J Virol Methods 219, 51-61.

Karim, M.R., Rhodes, E.R., Brinkman, N., Wymer, L. and Fout, G.S. (2009) New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volumes of water. Appl Environ Microbiol 75(8), 2393-2399.

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.

Katayama, H., Shimasaki, A. and Ohgaki, S. (2002) Development of a Virus Concentration Method and Its Application to Detection of Enterovirus and Norwalk Virus from Coastal Seawater. Appl Environ Microbiol 68(3), 1033-1039.

Katayama, K., Miyoshi, T., Uchino, K., Oka, T., Tanaka, T., Takeda, N. and Hansman, G.S. (2004) Novel Recombinant Sapovirus. Emerg Infect Dis 10(10), 1874-1876.

Kean, J.M., Rao, S., Wang, M. and Garcea, R.L. (2009) Seroepidemiology of human polyomaviruses. PLoS Pathog 5(3), e1000363.

Keswick, B.H., Pickering, L.K., DuPont, H.L. and Woodward, W.E. (1983) Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers. Appl Environ Microbiol 46(4), 813-816. Khamrin, P., Chaimongkol, N., Malasao, R., Suantai, B., Saikhruang, W., Kongsricharoern, T., Ukarapol, N., Okitsu, S., Shimizu, H., Hayakawa, S., Ushijima, H. and Maneekarn, N. (2012) Detection and molecular characterization of cosavirus in adults with diarrhea, Thailand. Virus Genes 44(2), 244-246. Khamrin, P. and Maneekarn, N. (2014) Detection and genetic characterization of cosavirus in a pediatric patient with diarrhea. Arch Virol 159(9), 2485-2489.

Khamrin, P., Okame, M., Thongprachum, A., Nantachit, N., Nishimura, S., Okitsu, S., Maneekarn, N. and Ushijima, H. (2011) A single-tube multiplex PCR for rapid detection in feces of 10 viruses causing diarrhea. J Virol Methods 173(2), 390-393.

Kim, J.-G., Yousef, A.E. and Dave, S. (1999) Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. Journal of Food Protection[®] 62(9), 1071-1087.

Kim, K., Katayama, H., Kitajima, M., Tohya, Y. and Ohgaki, S. (2011) Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. Water Science & Technology 63(3), 502-507.

Kitajima, M., Haramoto, E., Phanuwan, C., Katayama, H. and Ohgaki, S. (2009) Detection of genogroup IV norovirus in wastewater and river water in Japan. Lett Appl Microbiol 49(5), 655-658. Kitajima, M., Hata, A., Yamashita, T., Haramoto, E., Minagawa, H. and Katayama, H. (2013) Development of a reverse transcription-quantitative PCR system for detection and genotyping of Aichi viruses in clinical and environmental samples. Appl Environ Microbiol 79(13), 3952-3958. Kitajima, M., Iker, B.C., Pepper, I.L. and Gerba, C.P. (2014a) Relative abundance and treatment reduction of viruses during wastewater treatment processes--identification of potential viral indicators. Sci Total Environ 488-489, 290-296.

Kitajima, M., Iker, B.C., Rachmadi, A.T., Haramoto, E. and Gerba, C.P. (2014b) Quantification and Genetic Analysis of Salivirus/Klassevirus in Wastewater in Arizona, USA. Food Environ Virol 6(3), 213-216.

Kitajima, M., Oka, T., Haramoto, E., Katayama, H., Takeda, N., Katayama, K. and Ohgaki, S. (2010) Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan. Appl Environ Microbiol 76(8), 2461-2467.

Kitajima, M., Rachmadi, A., Iker, B., Haramoto, E., Pepper, I. and Gerba, C. (2015) Occurrence and genetic diversity of human cosavirus in influent and effluent of wastewater treatment plants in Arizona, United States. Arch Virol, 1-5.

Kjeldsberg, E. (1977) Small spherical viruses in faeces from gastroenteritis patients. Acta Pathol Microbiol Scand B 85b(5), 351-354.

Kluge, M., Fleck, J.D., Soliman, M.C., Luz, R.B., Fabres, R.B., Comerlato, J., Silva, J.V., Staggemeier, R., Vecchia, A.D., Capalonga, R., Oliveira, A.B., Henzel, A., Rigotto, C. and Spilki, F.R. (2014) Human

adenovirus (HAdV), human enterovirus (hEV), and genogroup A rotavirus (GARV) in tap water in southern Brazil. J Water Health 12(3), 526-532.

Knowles, N.J., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T. and Stanway, G. (2012) Picornaviridae. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses, 855-880.

Knowles, W.A. (2006) Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). Adv Exp Med Biol 577, 19-45.

Kobayashi, S., Fujiwara, N., Yasui, Y., Yamashita, T., Hiramatsu, R. and Minagawa, H. (2012) A foodborne outbreak of sapovirus linked to catered box lunches in Japan. Arch Virol 157(10), 1995-1997.

Koh, S.J., Cho, H.G., Kim, B.H. and Choi, B.Y. (2011) An outbreak of gastroenteritis caused by norovirus-contaminated groundwater at a waterpark in Korea. J Korean Med Sci 26(1), 28-32. 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.

Koo, H.L. and DuPont, H.L. (2009) Noroviruses as a Potential Cause of Protracted and Lethal Disease in Immunocompromised Patients. Clinical Infectious Diseases 49(7), 1069-1071.

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

Korajkic, A., Brownell, M.J. and Harwood, V.J. (2011) Investigation of human sewage pollution and pathogen analysis at Florida Gulf coast beaches. J Appl Microbiol 110(1), 174-183.

Koroglu, M., Yakupogullari, Y., Otlu, B., Ozturk, S., Ozden, M., Ozer, A., Sener, K. and Durmaz, R. (2011) A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. New Microbiol 34(1), 17-24.

Kott, Y. (1981) Viruses and bacteriophages. Science of the Total Environment 18, 13-23. Kreader, C.A. (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Appl Environ Microbiol 62(3), 1102-1106.

Kroneman, A., Vega, E., Vennema, H., Vinje, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K. and Koopmans, M. (2013) Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. Arch Virol 158(10), 2059-2068.

Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Bottiger, B., Falkenhorst, G., Johnsen, C., von Bonsdorff, C.H., Maunula, L., Kuusi, M., Pothier, P., Gallay, A., Schreier, E., Hohne, M., Koch, J., Szucs, G., Reuter, G., Krisztalovics, K., Lynch, M.,

McKeown, P., Foley, B., Coughlan, S., Ruggeri, F.M., Di Bartolo, I., Vainio, K., Isakbaeva, E., Poljsak-Prijatelj, M., Grom, A.H., Mijovski, J.Z., Bosch, A., Buesa, J., Fauquier, A.S., Hernandez-Pezzi, G., Hedlund, K.O. and Koopmans, M. (2008) Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. J Clin Microbiol 46(9), 2959-2965.

Kurtz, J. and Lee, T. (1978) Astrovirus gastroenteritis age distribution of antibody. Med Microbiol Immunol 166(1-4), 227-230.

Kurtz, J.B., Lee, T.W., Craig, J.W. and Reed, S.E. (1979) Astrovirus infection in volunteers. J Med Virol 3(3), 221-230.

Kutsuzawa, T., Konno, T., Suzuki, H., Kapikian, A.Z., Ebina, T. and Ishida, N. (1982) Isolation of human rotavirus subgroups 1 and 2 in cell culture. Journal of Clinical Microbiology 16(4), 727-730.

L'Homme, Y., Sansregret, R., Plante-Fortier, E., Lamontagne, A.M., Ouardani, M., Lacroix, G. and Simard, C. (2009) Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. Virus Genes 39(1), 66-75.

Lai, C.C., Wang, Y.H., Wu, C.Y., Hung, C.H., Jiang, D.D. and Wu, F.T. (2013) A norovirus outbreak in a nursing home: norovirus shedding time associated with age. J Clin Virol 56(2), 96-101.

Lambertini, E., Spencer, S.K., Bertz, P.D., Loge, F.J., Kieke, B.A. and Borchardt, M.A. (2008) Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. Appl Environ Microbiol 74(10), 2990-2996.

Law, L.K. and Davidson, B.L. (2002) Adenovirus serotype 30 fiber does not mediate transduction via the coxsackie-adenovirus receptor. J Virol 76(2), 656-661.

Lazarova, V. and Bahri, A. (2004) Water reuse for irrigation: agriculture, landscapes, and turf grass, CRC Press.

Lee, C., Lee, J. and Kwon, K. (2008) Outbreak of hepatitis A in Korean military personnel. Jpn J Infect Dis 61(3), 239.

Lee, C., Lee, S.-H., Han, E. and Kim, S.-J. (2004) Use of cell culture-PCR assay based on combination of A549 and BGMK cell lines and molecular identification as a tool to monitor infectious adenoviruses and enteroviruses in river water. Appl Environ Microbiol 70(11), 6695-6705.

Lee, H., Kim, M., Lee, J.E., Lim, M., Kim, M., Kim, J.M., Jheong, W.H., Kim, J. and Ko, G. (2011a) Investigation of norovirus occurrence in groundwater in metropolitan Seoul, Korea. Sci Total Environ 409(11), 2078-2084.

Lee, H., Kim, M., Paik, S.Y., Lee, C.H., Jheong, W.H., Kim, J. and Ko, G. (2011b) Evaluation of electropositive filtration for recovering norovirus in water. J Water Health 9(1), 27-36.

Lee, L.E., Cebelinski, E.A., Fuller, C., Keene, W.E., Smith, K., Vinje, J. and Besser, J.M. (2012) Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002-2009. Emerg Infect Dis 18(5), 873-876.

Lee, M., Seo, D.J., Seo, J., Oh, H., Jeon, S.B., Ha, S.-D., Myoung, J., Choi, I.-S. and Choi, C. (2015) Detection of Viable Murine Norovirus Using the Plaque Assay and Propidium-Monoazide-combined Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. J Virol Methods.

Lee, R.M., Lessler, J., Lee, R.A., Rudolph, K.E., Reich, N.G., Perl, T.M. and Cummings, D.A. (2013) Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. BMC Infect Dis 13, 446.

Lee, S.H. and Kim, S.J. (2002) Detection of infectious enteroviruses and adenoviruses in tap water in urban areas in Korea. Water Res 36(1), 248-256.

Lehtola, M.J., Juhna, T., Miettinen, I.T., Vartiainen, T. and Martikainen, P.J. (2004) Formation of biofilms in drinking water distribution networks, a case study in two cities in Finland and Latvia. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 31(11), 489-494.

Leifels, M., Jurzik, L., Wilhelm, M. and Hamza, I.A. (2015) Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV- exposure and chlorine. Int J Hyg Environ Health.

Lewis, G.D. and Metcalf, T.G. (1988) Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. Appl Environ Microbiol 54(8), 1983-1988.

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L. and Chao, F.H. (2002a) Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. Appl Environ Microbiol 68(10), 4951-4955.

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L. and Chao, F.H. (2002b) Mechanisms of inactivation of hepatitis a virus by chlorine. Appl Environ Microbiol 68(10), 4951-4955.

Li, J.W., Xin, Z.T., Wang, X.W., Zheng, J.L. and Chao, F.H. (2004) Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus in water by chlorine dioxide. Water Res 38(6), 1514-1519.

Li, L., Victoria, J., Kapoor, A., Blinkova, O., Wang, C., Babrzadeh, F., Mason, C.J., Pandey, P., Triki, H., Bahri, O., Oderinde, B.S., Baba, M.M., Bukbuk, D.N., Besser, J.M., Bartkus, J.M. and Delwart, E.L. (2009) A novel picornavirus associated with gastroenteritis. J Virol 83(22), 12002-12006.

Li, Y., Guo, H., Xu, Z., Zhou, X., Zhang, H., Zhang, L., Miao, J. and Pan, Y. (2013) An outbreak of norovirus gastroenteritis associated with a secondary water supply system in a factory in south China. BMC Public Health 13, 283.

Liang, L., Goh, S.G., Vergara, G.G., Fang, H.M., Rezaeinejad, S., Chang, S.Y., Bayen, S., Lee, W.A., Sobsey, M.D., Rose, J.B. and Gin, K.Y. (2015) Alternative fecal indicators and their empirical relationships with enteric viruses, Salmonella enterica, and Pseudomonas aeruginosa in surface waters of a tropical urban catchment. Appl Environ Microbiol 81(3), 850-860.

Lim, M.Y., Kim, J.-M., Lee, J.E. and Ko, G. (2010) Characterization of Ozone Disinfection of Murine Norovirus. Appl Environ Microbiol 76(4), 1120-1124.

Lindesmith, L.C., Beltramello, M., Donaldson, E.F., Corti, D., Swanstrom, J., Debbink, K., Lanzavecchia, A. and Baric, R.S. (2012) Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. PLoS Pathog 8(5), e1002705.

Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Lobue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D.P., Vinje, J. and Baric, R.S. (2008) Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. PLoS Med 5(2), e31.

Lindner, J., Zehentmeier, S., Franssila, R., Barabas, S., Schroeder, J., Deml, L. and Modrow, S. (2008) CD4+ T helper cell responses against human bocavirus viral protein 2 viruslike particles in healthy adults. J Infect Dis 198(11), 1677-1684.

Liu, C., Grillner, L., Jonsson, K., Linde, A., Shen, K., Lindell, A.T., Wirgart, B.Z. and Johansen, K. (2006) Identification of viral agents associated with diarrhea in young children during a winter season in Beijing, China. J Clin Virol 35(1), 69-72.

Liu, Y., Xu, Z.Q., Zhang, Q., Jin, M., Yu, J.M., Li, J.S., Liu, N., Cui, S.X., Kong, X.Y., Wang, H., Li, H.Y., Cheng, W.X., Ma, X.J. and Duan, Z.J. (2012) Simultaneous detection of seven enteric viruses associated with acute gastroenteritis by a multiplexed Luminex-based assay. J Clin Microbiol 50(7), 2384-2389.

Locas, A., Barthe, C., Margolin, A.B. and Payment, P. (2008) Groundwater microbiological quality in Canadian drinking water municipal wells. Can J Microbiol 54(6), 472-478.

Lodder, W.J. and de Roda Husman, A.M. (2005) Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. Appl Environ Microbiol 71(3), 1453-1461.

Logan, K.B., Rees, G.E., Seeley, N.D. and Primrose, S.B. (1980) Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater: evaluation of positively charged, microporous filters. J Virol Methods 1(2), 87-97.

Longley, K.E. (1978) Turbulence factors in chlorine disinfection of wastewater. Water Res 12(10), 813-822.

Lopman, B.A., Reacher, M.H., Vipond, I.B., Hill, D., Perry, C., Halladay, T., Brown, D.W., Edmunds, W.J. and Sarangi, J. (2004a) Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002–2003. Emerg Infect Dis 10(10), 1827.

Lopman, B.A., Reacher, M.H., Vipond, I.B., Sarangi, J. and Brown, D.W. (2004b) Clinical manifestation of norovirus gastroenteritis in health care settings. Clin Infect Dis 39(3), 318-324.

Lu, L., Li, C. and Hagedorn, C.H. (2006) Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev Med Virol 16(1), 5-36.

Lu, Q.B., Huang, D.D., Zhao, J., Wang, H.Y., Zhang, X.A., Xu, H.M., Qu, F., Liu, W. and Cao, W.C. (2015) An increasing prevalence of recombinant GII norovirus in pediatric patients with diarrhea during 2010-2013 in China. Infect Genet Evol 31, 48-52.

Lu, X.D., Cui, L.L., Ma, Y., Zu, R.Q., Shen, T., Li, J.Q., Yao, J.X., Shan, J., Xie, Q., Shi, C. and Zeng, G. (2012) [A viral meningitis outbreak associated with Echo30 in drinking water]. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 33(10), 1067-1071.

Luchs, A. and Timenetsky Mdo, C. (2014) G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. J Gen Virol 95(Pt 3), 627-641.

Lukashov, V.V. and Goudsmit, J. (2002) Evolutionary relationships among Astroviridae. Journal of General Virology 83(6), 1397-1405.

Lukasik, J., Scott, T.M., Andryshak, D. and Farrah, S.R. (2000) Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. Appl Environ Microbiol 66(7), 2914-2920.

Ma, J.F., Naranjo, J. and Gerba, C.P. (1994a) Evaluation of MK filters for recovery of enteroviruses from tap water. Appl Environ Microbiol 60(6), 1974-1977.

Ma, J.F., Straub, T.M., Pepper, I.L. and Gerba, C.P. (1994b) Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. Appl Environ Microbiol 60(11), 4203-4206.

Machado, F.T., Baur, V.C., Gagliardi, L.J.P. and Pereira, M.M. (2012) Assessment of burden of virus agents in an urban sewage treatment plant in Rio de Janeiro, Brazil.

Madeley, C.R. and Cosgrove, B.P. (1975) Letter: Viruses in infantile gastroenteritis. Lancet 2(7925), 124.

Mans, J., Murray, T.Y. and Taylor, M.B. (2014) Novel norovirus recombinants detected in South Africa. Virol J 11, 168.

Manzara, S., Muscillo, M., La Rosa, G., Marianelli, C., Cattani, P. and Fadda, G. (2002) Molecular identification and typing of enteroviruses isolated from clinical specimens. Journal of Clinical Microbiology 40(12), 4554-4560.

Martella, V., Medici, M.C., Terio, V., Catella, C., Bozzo, G., Tummolo, F., Calderaro, A., Bonura, F., Di Franco, M., Banyai, K., Giammanco, G.M. and De Grazia, S. (2013) Lineage diversification and recombination in type-4 human astroviruses. Infect Genet Evol 20, 330-335.

Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Collins, J., Goyal, S., Ciarlet, M. and Matthijnssens, J. (2013) Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. Virology 446(1-2), 189-198.

Marthaler, D., Rossow, K., Gramer, M., Collins, J., Goyal, S., Tsunemitsu, H., Kuga, K., Suzuki, T., Ciarlet, M. and Matthijnssens, J. (2012) Detection of substantial porcine group B rotavirus genetic diversity in the United States, resulting in a modified classification proposal for G genotypes. Virology 433(1), 85-96.

Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L. and Perelle, S. (2014) Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food. Int J Food Microbiol 176, 1-8.

Masachessi, G., Martinez, L.C., Giordano, M.O., Barril, P.A., Isa, B.M., Ferreyra, L., Villareal, D., Carello, M., Asis, C. and Nates, S.V. (2007) Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. Arch Virol 152(5), 989-998.

Masclaux, F.G., Hotz, P., Friedli, D., Savova-Bianchi, D. and Oppliger, A. (2013) High occurrence of hepatitis E virus in samples from wastewater treatment plants in Switzerland and comparison with other enteric viruses. Water Res 47(14), 5101-5109.

Mathijs, E., Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Denayer, S., Mauroy, A., Scipioni, A., Daube, G., Dierick, K. and Herman, L. (2012) A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses. Food Environ Virol 4(4), 131-152.

Matsui, S.M., Kim, J.P., Greenberg, H.B., Su, W., Sun, Q., Johnson, P.C., DuPont, H.L., Oshiro, L.S. and Reyes, G.R. (1991) The isolation and characterization of a Norwalk virus-specific cDNA. J Clin Invest 87(4), 1456-1461.

Matthews, J.E., Dickey, B.W., Miller, R.D., Felzer, J.R., Dawson, B.P., Lee, A.S., Rocks, J.J., Kiel, J., Montes, J.S., Moe, C.L., Eisenberg, J.N. and Leon, J.S. (2012) The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. Epidemiol Infect 140(7), 1161-1172.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Banyai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gomara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Parreno, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U. and Van Ranst, M. (2011) Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). Arch Virol 156(8), 1397-1413.

Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M. and Johne, R. (2012) VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. Arch Virol 157(6), 1177-1182.

Maunula, L., Kalso, S., Von Bonsdorff, C.H. and Pönkä, A. (2004) Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. Epidemiol Infect 132(04), 737-743.

Maunula, L., Klemola, P., Kauppinen, A., Söderberg, K., Nguyen, T., Pitkänen, T., Kaijalainen, S., Simonen, M.L., Miettinen, I.T. and Lappalainen, M. (2009) Enteric viruses in a large waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Finland. Food Environ Virol 1(1), 31-36.

McIntyre, C.L., Knowles, N.J. and Simmonds, P. (2013) Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. J Gen Virol 94(Pt 8), 1791-1806. McMinn, B.R. and Korajkic, A. (2015) A small volume procedure for viral concentration from water. J Vis Exp (96).

McMinn, B.R., Korajkic, A. and Ashbolt, N.J. (2014) Evaluation of Bacteroides fragilis GB-124 bacteriophages as novel human-associated faecal indicators in the United States. Lett Appl Microbiol 59(1), 115-121.

McQuaig, S.M., Scott, T.M., Harwood, V.J., Farrah, S.R. and Lukasik, J.O. (2006) Detection of humanderived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. Appl Environ Microbiol 72(12), 7567-7574.

Medici, M.C., Tummolo, F., Martella, V., Banyai, K., Bonerba, E., Chezzi, C., Arcangeletti, M.C., De Conto, F. and Calderaro, A. (2015) Genetic heterogeneity and recombination in type-3 human astroviruses. Infection, Genetics and Evolution 32(0), 156-160.

Medici, M.C., Tummolo, F., Martella, V., Giammanco, G.M., De Grazia, S., Arcangeletti, M.C., De Conto, F., Chezzi, C. and Calderaro, A. (2014) Novel recombinant GII.P16_GII.13 and GII.P16_GII.3 norovirus strains in Italy. Virus Res 188, 142-145.

Meliopoulos, V. and Schultz-Cherry, S. (2013) Astrovirus Research, pp. 65-77, Springer.

Mellou, K., Katsioulis, A., Potamiti-Komi, M., Pournaras, S., Kyritsi, M., Katsiaflaka, A., Kallimani, A., Kokkinos, P., Petinaki, E., Sideroglou, T., Georgakopoulou, T., Vantarakis, A. and Hadjichristodoulou, C. (2014) A large waterborne gastroenteritis outbreak in central Greece, March 2012: challenges for the investigation and management. Epidemiol Infect 142(1), 40-50.

Melnick, J.L., Safferman, R., Rao, V.C., Goyal, S., Berg, G., Dahling, D.R., Wright, B.A., Akin, E., Stetler, R., Sorber, C. and et al. (1984) Round robin investigation of methods for the recovery of poliovirus from drinking water. Appl Environ Microbiol 47(1), 144-150.

Mendez-Toss, M., Romero-Guido, P., Munguia, M.E., Mendez, E. and Arias, C.F. (2000) Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. J Gen Virol 81(Pt 12), 2891-2897.

Meng, Q.S. and Gerba, C.P. (1996) Comparative inactivation of enteric adenoviruses, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. Water Res 30(11), 2665-2668.

Menut, C., Beril, C. and Schwartzbrod, L. (1993) Poliovirus recovery from tap water after concentration over glass powder and glass wool. Water Science & Technology 27(3-4), 291-294. Metcalf, T.G. (1961) Use of membrane filters to facilitate the recovery of virus from aqueous suspensions. Appl Microbiol 9, 376-379.

Michen, B. and Graule, T. (2010) Isoelectric points of viruses. J Appl Microbiol 109(2), 388-397. Mikalsen, A.B., Nilsen, P., Frøystad-Saugen, M., Lindmo, K., Eliassen, T.M., Rode, M. and Evensen, Ø. (2014) Characterization of a Novel Calicivirus Causing Systemic Infection in Atlantic Salmon (Salmo salar L.): Proposal for a New Genus of Caliciviridae. PLoS One 9(9), e107132.

Mikula, C., Springer, B., Reichart, S., Bierbacher, K., Lichtenschopf, A. and Hoehne, M. (2010) Sapovirus in adults in rehabilitation center, upper Austria. Emerg Infect Dis 16(7), 1186-1187. Mirand, A., Henquell, C., Archimbaud, C., Ughetto, S., Antona, D., Bailly, J.L. and Peigue-Lafeuille, H. (2012) Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study. Clinical Microbiology and Infection 18(5), E110-E118.

Mitchell, D.K., Matson, D.O., Cubitt, W.D., Jackson, L.J., Willcocks, M.M., Pickering, L.K. and Carter, M.J. (1999) Prevalence of antibodies to astrovirus types 1 and 3 in children and adolescents in Norfolk, Virginia. Pediatr Infect Dis J 18(3), 249-254.

Mitchell, D.K., Monroe, S.S., Jiang, X., Matson, D.O., Glass, R.I. and Pickering, L.K. (1995) Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. J Infect Dis 172(6), 1437-1444.

Mitchell, D.K., Van, R., Morrow, A.L., Monroe, S.S., Glass, R.I. and Pickering, L.K. (1993) Outbreaks of astrovirus gastroenteritis in day care centers. J Pediatr 123(5), 725-732.

Miura, T., Parnaudeau, S., Grodzki, M., Okabe, S., Atmar, R.L. and Le Guyader, F.S. (2013) Environmental detection of genogroup I, II, and IV noroviruses by using a generic real-time reverse transcription-PCR assay. Appl Environ Microbiol 79(21), 6585-6592.

Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M.A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K. and Hino, S. (1999) Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. J Virol 73(5), 3582-3586.

Miyoshi, M., Yoshizumi, S., Kanda, N., Karino, T., Nagano, H., Kudo, S., Okano, M. and Ishida, S. (2010) Different genotypic sapoviruses detected in two simultaneous outbreaks of gastroenteritis among schoolchildren in the same school district in Hokkaido, Japan. Jpn J Infect Dis 63(1), 75-78.

Mohd Hanafiah, K., Jacobsen, K.H. and Wiersma, S.T. (2011) Challenges to mapping the health risk of hepatitis A virus infection. International Journal of Health Geographics 10, 57-57.

Molenkamp, R., van der Ham, A., Schinkel, J. and Beld, M. (2007) Simultaneous detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche LightCycler480: Application in viral molecular diagnostics. J Virol Methods 141(2), 205-211.

Möller, W.J. (1964) Determination of diffusion coefficients and molecular weights of ribonucleic acids and viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 51(3), 501.

Monceyron, C. and Grinde, B. (1994) Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. J Virol Methods 46(2), 157-166.

Monica, B., Ramani, S., Banerjee, I., Primrose, B., Iturriza-Gomara, M., Gallimore, C.I., Brown, D.W., M, F., Moses, P.D., Gray, J.J. and Kang, G. (2007) Human caliciviruses in symptomatic and

asymptomatic infections in children in Vellore, South India. J Med Virol 79(5), 544-551.

Monis, P., King, B. and Keegan, A. (2014) Cryptosporidium: parasite and disease, pp. 515-552, Springer.

Moreno, L., Aznar, R. and Sanchez, G. (2015) Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. Int J Food Microbiol 201, 1-6.

Motamedifar, M., Amini, E. and Shirazi, P.T. (2013) Frequency of rotavirus and adenovirus gastroenteritis among children in Shiraz, Iran. Iranian Red Crescent Medical Journal 15(8), 729. Mouly D, V.E., Vincent N (2013) Épidémie de gastro-entérites aiguës d'origine hydrique à Pleaux, Cantal. Institut de veille sanitaire, 41 p.

Mukhopadhya, I., Sarkar, R., Menon, V.K., Babji, S., Paul, A., Rajendran, P., Sowmyanarayanan, T.V., Moses, P.D., Iturriza-Gomara, M., Gray, J.J. and Kang, G. (2013) Rotavirus shedding in symptomatic and asymptomatic children using reverse transcription-quantitative PCR. J Med Virol 85(9), 1661-1668.

Murata, T., Katsushima, N., Mizuta, K., Muraki, Y., Hongo, S. and Matsuzaki, Y. (2007) Prolonged norovirus shedding in infants <or=6 months of age with gastroenteritis. Pediatr Infect Dis J 26(1), 46-49.

Murray, J.P. and Parks, G.A. (1980).

Mustafa, H., Bishop, R.F. and Palombo, E.A. (2001) The biology and epidemiology of human astroviruses. Reviews in Medical Microbiology 12(2), 75-85.

Mwenda, J.M., Ntoto, K.M., Abebe, A., Enweronu-Laryea, C., Amina, I., McHomvu, J., Kisakye, A., Mpabalwani, E.M., Pazvakavambwa, I., Armah, G.E., Seheri, L.M., Kiulia, N.M., Page, N., Widdowson, M.A. and Steele, A.D. (2010) Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea in selected African countries: preliminary results from the African Rotavirus Surveillance Network. J Infect Dis 202 Suppl, S5-s11.

Myrmel, M., Rimstad, E. and Wasteson, Y. (2000) Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. Int J Food Microbiol 62(1), 17-26.

Naficy, A.B., Rao, M.R., Holmes, J.L., Abu-Elyazeed, R., Savarino, S.J., Wierzba, T.F., Frenck, R.W., Monroe, S.S., Glass, R.I. and Clemens, J.D. (2000) Astrovirus diarrhea in Egyptian children. J Infect Dis 182(3), 685-690.

Nakata, S., Estes, M.K. and Chiba, S. (1988) Detection of human calicivirus antigen and antibody by enzyme-linked immunosorbent assays. J Clin Microbiol 26(10), 2001-2005.

Nakata, S., Honma, S., Numata, K., Kogawa, K., Ukae, S., Adachi, N., Jiang, X., Estes, M.K., Gatheru, Z., Tukei, P.M. and Chiba, S. (1998) Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. J Clin Microbiol 36(11), 3160-3163. Nasser, A.M., Battagelli, D. and Sobsey, M.D. (1992) Isoelectric focusing of hepatitis A virus in sucrose gradients. Israel J. Med. Sci 28, 73.

Nenonen, N.P., Hannoun, C., Larsson, C.U. and Bergstrom, T. (2012) Marked genomic diversity of norovirus genogroup I strains in a waterborne outbreak. Appl Environ Microbiol 78(6), 1846-1852. Nermut, M.V. and Steven, A.C. (1987) Animal virus structure, Elsevier.

Ng, T.F., Marine, R., Wang, C., Simmonds, P., Kapusinszky, B., Bodhidatta, L., Oderinde, B.S., Wommack, K.E. and Delwart, E. (2012) High variety of known and new RNA and DNA viruses of diverse origins in untreated sewage. J Virol 86(22), 12161-12175.

Nguyen, T.A., Hoang, L., Pham le, D., Hoang, K.T., Mizuguchi, M., Okitsu, S. and Ushijima, H. (2008) Identification of human astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in the Southern Part of Vietnam during 2005-2006. J Med Virol 80(2), 298-305.

Ni, Z., Xiang, F., Huang, H., Wang, G. and Li, F. (2015) Isolation and genetic characterization of enterovirus in patients with febrile rash illness. Biomedical Reports 3(3), 375-378.

Nicand, E., Teyssou, R. and Buisson, Y. (1998) Le risque fécal viral en 1998. Virologie 2(2), 103-116. Nielsen, A.C.Y., Gyhrs, M.L., Nielsen, L.P., Pedersen, C. and Böttiger, B. (2013) Gastroenteritis and the novel picornaviruses aichi virus, cosavirus, saffold virus, and salivirus in young children. Journal of Clinical Virology 57(3), 239-242.

Nieto-Juarez, J.I. and Kohn, T. (2013) Virus removal and inactivation by iron (hydr) oxide-mediated Fenton-like processes under sunlight and in the dark. Photochemical & Photobiological Sciences 12(9), 1596-1605.

Nieuwstad, T.J., Havelaar, A.H. and van Olphen, M. (1991) Hydraulic and microbiological characterization of reactors for ultraviolet disinfection of secondary wastewater effluent. Water Res 25(7), 775-783.

Nishimura, Y. and Shimizu, H. (2012) Cellular receptors for human enterovirus species A. Front Microbiol 3.

Noel, J.S., Lee, T.W., Kurtz, J.B., Glass, R.I. and Monroe, S.S. (1995) Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. J Clin Microbiol 33(4), 797-801. Nordgren, J., Matussek, A., Mattsson, A., Svensson, L. and Lindgren, P.E. (2009) Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. Water Res 43(4), 1117-1125.

Nuanualsuwan, S. and Cliver, D.O. (2002) Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. J Virol Methods 104(2), 217-225.

Nuanualsuwan, S. and Cliver, D.O. (2003) Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. Appl Environ Microbiol 69(1), 350-357.

Numata, K., Hardy, M.E., Nakata, S., Chiba, S. and Estes, M.K. (1997) Molecular characterization of morphologically typical human calicivirus Sapporo. Arch Virol 142(8), 1537-1552.

O'Ryan, M.L., Lucero, Y., Prado, V., Santolaya, M.E., Rabello, M., Solis, Y., Berríos, D., O'Ryan-Soriano, M.A., Cortés, H. and Mamani, N. (2009) Symptomatic and asymptomatic rotavirus and norovirus infections during infancy in a Chilean birth cohort. Pediatr Infect Dis J 28(10), 879-884.

Oberste, M.S., Maher, K., Nix, W.A., Michele, S.M., Uddin, M., Schnurr, D., al-Busaidy, S., Akoua-Koffi, C. and Pallansch, M.A. (2007) Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79–88, EV97, and EV100–101, members of the species Human Enterovirus B. Virus Res 128(1), 34-42.

Obinata, K., Okumura, A., Nakazawa, T., Kamata, A., Niizuma, T., Kinoshita, K. and Shimizu, T. (2010) Norovirus encephalopathy in a previously healthy child. Pediatr Infect Dis J 29(11), 1057-1059.

Odoom, J.K., Forrest, L., Dunn, G., Osei-Kwasi, M., Obodai, E., Arthur-Quarm, J., Barnor, J., Minor, P.D. and Martin, J. (2012) Interruption of Poliovirus Transmission in Ghana: Molecular Epidemiology of Wild-Type 1 Poliovirus Isolated from 1995 to 2008. Journal of Infectious Diseases 206(7), 1111-1120.

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

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

Oh, D.Y., Silva, P.A., Hauroeder, B., Diedrich, S., Cardoso, D.D. and Schreier, E. (2006) Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. Arch Virol 151(6), 1199-1206.

Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., Mise, K., Murakami, K., Wakita, T. and Katayama, K. (2012) Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. Arch Virol 157(2), 349-352.

Oka, T., Murakami, K., Wakita, T. and Katayama, K. (2011) Comparative site-directed mutagenesis in the catalytic amino acid triad in calicivirus proteases. Microbiol Immunol 55(2), 108-114.

Oka, T., Yamamoto, M., Miyashita, K., Ogawa, S., Katayama, K., Wakita, T. and Takeda, N. (2009a) Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. Microbiol Immunol 53(1), 49-52.

Oka, T., Yokoyama, M., Katayama, K., Tsunemitsu, H., Yamamoto, M., Miyashita, K., Ogawa, S., Motomura, K., Mori, H., Nakamura, H., Wakita, T., Takeda, N. and Sato, H. (2009b) Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. Virology 394(1), 119-129.

Okada, M., Shinozaki, K., Ogawa, T. and Kaiho, I. (2002) Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. Arch Virol 147(7), 1445-1451.

Okada, M., Yamashita, Y., Oseto, M., Ogawa, T., Kaiho, I. and Shinozaki, K. (2006a) Genetic variability in the sapovirus capsid protein. Virus Genes 33(2), 157-161.

Okada, M., Yamashita, Y., Oseto, M. and Shinozaki, K. (2006b) The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. Arch Virol 151(12), 2503-2509.

Okamoto, H. (2011) Hepatitis E virus cell culture models. Virus Res 161(1), 65-77.

Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y. and Yoshikawa, A. (2002) Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias. J Gen Virol 83(Pt 6), 1291-1297.

Oliveira, D.B., Campos, R.K., Soares, M.S., Barros, R.B., Batista, T.C.A., Ferreira, P.C.P., Bonjardim, C.A., Trindade, G.S., Abrahão, J.S. and Kroon, E.G. (2014) Outbreak of herpangina in the Brazilian Amazon in 2009 caused by Enterovirus B. Arch Virol 159(5), 1155-1157.

Olivieri, A., Eisenberg, D., Soller, J., Eisenberg, J., Cooper, R., Tchobanoglous, G., Trussell, R. and Gagliardo, P. (1999) Estimation of pathogen removal in an advanced water treatment facility using Monto Carlo simulation. Water Science and Technology 40(4–5), 223-233.

Oller, I., Malato, S. and Sánchez-Pérez, J.A. (2011) Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination—a review. Science of the Total Environment 409(20), 4141-4166.

Olszewski, J., Winona, L. and Oshima, K.H. (2005) Comparison of 2 ultrafiltration systems for the concentration of seeded viruses from environmental waters. Can J Microbiol 51(4), 295-303. Padgett, B.L. and Walker, D.L. (1973) Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis 127(4), 467-470. Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J. and Dessel, B.H. (1971) Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet 1(7712), 1257-1260.

Park, S., Oh, S., Cho, S., Lee, J., Ryu, S., Song, M., Jung, H., Park, S., Park, G., Choi, S., Chae, Y. and Kim, H. (2012) Genetic characterization of sapovirus detected in hospitalized children with acute gastroenteritis in Korea. Clin Lab 58(11-12), 1219-1224.

Park, S.Y., Bae, S.C. and Ha, S.D. (2015) Heat inactivation of a norovirus surrogate in cell culture lysate, abalone meat, and abalone viscera. Food Environ Virol 7(1), 58-66.

Parrino, T.A., Schreiber, D.S., Trier, J.S., Kapikian, A.Z. and Blacklow, N.R. (1977) Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. New England Journal of Medicine 297(2), 86-89. Parry, J.V. and Mortimer, P.P. (1984) The heat sensitivity of hepatitis A virus determined by a simple tissue culture method. J Med Virol 14(3), 277-283.

Parshionikar, S., Laseke, I. and Fout, G.S. (2010) Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples. Appl Environ Microbiol 76(13), 4318-4326.

Patel, M.M., Hall, A.J., Vinje, J. and Parashar, U.D. (2009) Noroviruses: a comprehensive review. J Clin Virol 44(1), 1-8.

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.

Patel, N.C., Hertel, P.M., Estes, M.K., de la Morena, M., Petru, A.M., Noroski, L.M., Revell, P.A., Hanson, I.C., Paul, M.E., Rosenblatt, H.M. and Abramson, S.L. (2010) Vaccine-acquired rotavirus in infants with severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 362(4), 314-319.

Pativada, M., Nataraju, S.M., Ganesh, B., Rajendran, K., Ramamurthy, T., Ganguly, S., Bhattacharya, M.K., Ghosh, M., Kobayashi, N. and Krishnan, T. (2012) Emerging trends in the epidemiology of human astrovirus infection among infants, children and adults hospitalized with acute watery diarrhea in Kolkata, India. Infect Genet Evol 12(8), 1685-1693.

Payan, A., Ebdon, J., Taylor, H., Gantzer, C., Ottoson, J., Papageorgiou, G.T., Blanch, A.R., Lucena, F., Jofre, J. and Muniesa, M. (2005) Method for isolation of Bacteroides bacteriophage host strains suitable for tracking sources of fecal pollution in water. Appl Environ Microbiol 71(9), 5659-5662. Payment, P., Gerba, C.P., Wallis, C. and Melnick, J.L. (1976) Methods for concentrating viruses from large volumes of estuarine water on pleated membranes. Water Res 10(10), 893-896.

Payment, P. and Trudel, M. (1979) Efficiency of several micro-fiber glass filters for recovery of poliovirus from tape water. Appl Environ Microbiol 38(3), 365-368.

Payment, P. and Trudel, M. (1988) Wound fiberglass depth filters as a less expensive approach for the concentration of viruses from water. Can J Microbiol 34(3), 271-272.

Perez-Mendez, A., Chandler, J.C., Bisha, B. and Goodridge, L.D. (2014) Concentration of enteric viruses from tap water using an anion exchange resin-based method. J Virol Methods 206, 95-98. Phan, T.G., Okame, M., Nguyen, T.A., Maneekarn, N., Nishio, O., Okitsu, S. and Ushijima, H. (2004) Human astrovirus, norovirus (GI, GII), and sapovirus infections in Pakistani children with diarrhea. J Med Virol 73(2), 256-261.

Phillips, G., Lopman, B., Rodrigues, L.C. and Tam, C.C. (2010) Asymptomatic rotavirus infections in England: prevalence, characteristics, and risk factors. Am J Epidemiol, kwq050.

Phillips, G., Lopman, B., Tam, C.C., Iturriza-Gomara, M., Brown, D. and Gray, J. (2009) Diagnosing norovirus-associated infectious intestinal disease using viral load. BMC Infect Dis 9, 63.

Pianetti, A., Baffone, W., Citterio, B., Casaroli, A., Bruscolini, F. and Salvaggio, L. (2000) Presence of enteroviruses and reoviruses in the waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. Epidemiol Infect 125(02), 455-462.

Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. and Girones, R. (1998) Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. Appl Environ Microbiol 64(9), 3376-3382.

Pinto, R.M., Diez, J.M. and Bosch, A. (1994) Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses. J Med Virol 44(3), 310-315.

Podewils, L.J., Zanardi Blevins, L., Hagenbuch, M., Itani, D., Burns, A., Otto, C., Blanton, L., Adams, S., Monroe, S.S. and Beach, M.J. (2007) Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. Epidemiol Infect 135(05), 827-833.

Polaczyk, A.L., Narayanan, J., Cromeans, T.L., Hahn, D., Roberts, J.M., Amburgey, J.E. and Hill, V.R. (2008) Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. J Microbiol Methods 73(2), 92-99.

Prata, C., Ribeiro, A., Cunha, A., Gomes, N.C. and Almeida, A. (2012) Ultracentrifugation as a direct method to concentrate viruses in environmental waters: virus-like particle enumeration as a new approach to determine the efficiency of recovery. J Environ Monit 14(1), 64-70.

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.

Prinja, S., Kumar, S., Reddy, G.M.M., Ratho, R.K. and Kumar, R. (2008) Investigation of viral hepatitis E outbreak in a town in Haryana.

Puig, A., Queralt, N., Jofre, J. and Araujo, R. (1999) Diversity of bacteroides fragilis strains in their capacity to recover phages from human and animal wastes and from fecally polluted wastewater. Appl Environ Microbiol 65(4), 1772-1776.

Puig, M., Jofre, J., Lucena, F., Allard, A., Wadell, G. and Girones, R. (1994) Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. Appl Environ Microbiol 60(8), 2963-2970.

Rachakonda, G., Choudekar, A., Parveen, S., Bhatnagar, S., Patwari, A. and Broor, S. (2008) Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children with acute sporadic gastroenteritis in New Delhi, India. J Clin Virol 43(1), 42-48.

Rahman, R., Alum, A., Ryu, H. and Abbaszadegan, M. (2009) Identification of microbial faecal sources in the New River in the United States-Mexican border region. J Water Health 7(2), 267-275.

Rajal, V.B., McSwain, B.S., Thompson, D.E., Leutenegger, C.M., Kildare, B.J. and Wuertz, S. (2007) Validation of hollow fiber ultrafiltration and real-time PCR using bacteriophage PP7 as surrogate for the quantification of viruses from water samples. Water Res 41(7), 1411-1422.

Ramesh, M.N. (1999) Food preservation by heat treatment. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-, 95-172.

Rao, N.U. and Labzoffsky, N.A. (1969) A simple method for the detection of low concentration of viruses in large volumes of water by the membrane filter technique. Can J Microbiol 15(5), 399-403. Räsänen, S., Lappalainen, S., Kaikkonen, S., Hämäläinen, M., Salminen, M. and Vesikari, T. (2010) Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. Epidemiol Infect 138(09), 1227-1234.

Ren, Z., Kong, Y., Wang, J., Wang, Q., Huang, A. and Xu, H. (2013) Etiological study of enteric viruses and the genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus, and astrovirus in children with diarrhea in Chongqing, China. BMC Infect Dis 13(1), 412.

Reynolds, K.A. (2004) Integrated cell culture/PCR for detection of enteric viruses in environmental samples. Methods Mol Biol 268, 69-78.

Reynolds, K.A., Gerba, C.P. and Pepper, I.L. (1996) Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. Appl Environ Microbiol 62(4), 1424-1427.

Rezaei, M., Sohrabi, A., Edalat, R., Siadat, S.D., Gomari, H., Rezaei, M. and Gilani, S.M. (2012) Molecular Epidemiology of Acute Gastroenteritis Caused by Subgenus F (40, 41) Enteric Adenoviruses in Inpatient Children. Lab Medicine 43(1), 10-15.

Rezaeinejad, S., Vergara, G.G., Woo, C.H., Lim, T.T., Sobsey, M.D. and Gin, K.Y. (2014) Surveillance of enteric viruses and coliphages in a tropical urban catchment. Water Res 58, 122-131.

Rezig, D., Farhat, E.B., Touzi, H., Meddeb, Z., Salah, A.B. and Triki, H. (2015) Prevalence of human cosaviruses in Tunisia, North Africa. J Med Virol 87(6), 940-943.

Rezig, D., Touzi, H., Meddeb, Z. and Triki, H. (2014) Cytopathic effect of Human cosavirus (HCoSV) on primary cell cultures of human embryonic lung MRC5. J Virol Methods 207, 12-15.

Ribes, J.M., Montava, R., Tellez-Castillo, C.J., Fernandez-Jimenez, M. and Buesa, J. (2010) Seroprevalence of Aichi virus in a Spanish population from 2007 to 2008. Clin Vaccine Immunol 17(4), 545-549.

Richards, G.P. (1999) Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. J Food Prot 62(6), 691-697.

Richardson, S.D., Plewa, M.J., Wagner, E.D., Schoeny, R. and DeMarini, D.M. (2007) Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking

water: a review and roadmap for research. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 636(1), 178-242.

Ridinger, D.N., Spendlove, R.S., Barnett, B.B., George, D.B. and Roth, J.C. (1982) Evaluation of cell lines and immunofluorescence and plaque assay procedures for quantifying reoviruses in sewage. Appl Environ Microbiol 43(4), 740-746.

Riera-Montes, M., Brus Sjolander, K., Allestam, G., Hallin, E., Hedlund, K.O. and Lofdahl, M. (2011) Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. Epidemiol Infect 139(12), 1928-1935.

Rigotto, C., Hanley, K., Rochelle, P.A., De Leon, R., Barardi, C.R. and Yates, M.V. (2011) Survival of adenovirus types 2 and 41 in surface and ground waters measured by a plaque assay. Environ Sci Technol 45(9), 4145-4150.

Risebro, H.L. and Hunter, P.R. (2007) Surveillance of waterborne disease in European member states: a qualitative study. J Water Health 5(1), 19.

Rockx, B., De Wit, M., Vennema, H., Vinje, J., De Bruin, E., Van Duynhoven, Y. and Koopmans, M. (2002) Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. Clin Infect Dis 35(3), 246-253.

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).

Rodriguez-Lazaro, D., Cook, N., Ruggeri, F.M., Sellwood, J., Nasser, A., Nascimento, M.S., D'Agostino, M., Santos, R., Saiz, J.C., Rzezutka, A., Bosch, A., Girones, R., Carducci, A., Muscillo, M., Kovac, K., Diez-Valcarce, M., Vantarakis, A., von Bonsdorff, C.H., de Roda Husman, A.M., Hernandez, M. and van der Poel, W.H. (2012) Virus hazards from food, water and other contaminated environments. FEMS Microbiol Rev 36(4), 786-814.

Rodríguez, R.A., Bounty, S. and Linden, K.G. (2013) Long-range quantitative PCR for determining inactivation of adenovirus 2 by ultraviolet light. J Appl Microbiol 114(6), 1854-1865.

Roingeard, P. (2008) Viral detection by electron microscopy: past, present and future. Biol Cell 100(8), 491-501.

Romero, J.R. (1999) Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses: overview and clinical utility in pediatric enteroviral infections. Archives of pathology & laboratory medicine 123(12), 1161.

Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y.W., Ruan, Y. and Breitbart, M. (2009a) Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. Environ Microbiol 11(11), 2806-2820.

Rosario, K., Symonds, E.M., Sinigalliano, C., Stewart, J. and Breitbart, M. (2009b) Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. Appl Environ Microbiol 75(22), 7261-7267.

Rose, J.B., Singh, S.N., Gerba, C.P. and Kelley, L.M. (1984) Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. Appl Environ Microbiol 47(5), 989-992.

Roux, S., Enault, F., Robin, A., Ravet, V., Personnic, S., Theil, S., Colombet, J., Sime-Ngando, T. and Debroas, D. (2012) Assessing the diversity and specificity of two freshwater viral communities through metagenomics. PLoS One 7(3), e33641-e33641.

Roy, D., Wong, P.K., Engelbrecht, R.S. and Chian, E.S. (1981) Mechanism of enteroviral inactivation by ozone. Appl Environ Microbiol 41(3), 718-723.

Rueckert, R.R. and Pallansch, M.A. (1981) Preparation and characterization of encephalomyocarditis (EMC) virus. Methods Enzymol 78(Pt A), 315-325.

S, D.E.G., Martella, V., Chironna, M., Bonura, F., Tummolo, F., Calderaro, A., Moschidou, P., Giammanco, G.M. and Medici, M.C. (2013) Nationwide surveillance study of human astrovirus infections in an Italian paediatric population. Epidemiol Infect 141(3), 524-528.

Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H.L., Walsh, A., Ramsay, M. and Morgan, D. (2009) Hepatitis E outbreak on cruise ship. Emerg Infect Dis 15(11), 1738.

Saif, L.J. and Thiel, K. (1989) Viral diarrheas of man and animals, CRC Press.

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. Saito, K., Ushijima, H., Nishio, O., Oseto, M., Motohiro, H., Ueda, Y., Takagi, M., Nakaya, S., Ando, T., Glass, R. and et al. (1995) Detection of astroviruses from stool samples in Japan using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. Microbiol Immunol 39(10), 825-828. Sakai, Y., Nakata, S., Honma, S., Tatsumi, M., Numata-Kinoshita, K. and Chiba, S. (2001) Clinical severity of Norwalk virus and Sapporo virus gastroenteritis in children in Hokkaido, Japan. Pediatr Infect Dis J 20(9), 849-853.

Sang, S., Zhao, Z., Suo, J., Xing, Y., Jia, N., Gao, Y., Xie, L., Du, M., Liu, B., Ren, S. and Liu, Y. (2014) Report of recombinant norovirus GII.g/GII.12 in Beijing, China. PLoS One 9(2), e88210. Sano, D., Perez-Sautu, U., Guix, S., Pinto, R.M., Miura, T., Okabe, S. and Bosch, A. (2011) Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. Appl Environ Microbiol 77(3), 1111-1114.

Sano, D., Pintó, R.M., Omura, T. and Bosch, A. (2009) Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. Environ Sci Technol 44(2), 808-812.

Santos, N. and Hoshino, Y. (2005) Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. Rev Med Virol 15(1), 29-56.

Santos, N., Mendes, G.S., Silva, R.C., Pena, G.A., Rojas, M., Amorim, A.R. and Lima, D.P. (2015) Salivirus and Aichivirus A infections in children with gastroenteritis in Brazil. Clin Microbiol Infect. Sarguna, P., Rao, A. and Sudha Ramana, K.N. (2007) Outbreak of acute viral hepatitis due to hepatitis E virus in Hyderabad.

Sarrette, B.A., Danglot, C.D. and Vilagines, R. (1977) A new and simple method for recuperation of enteroviruses from water. Water Res 11(4), 355-358.

Sartorius, B., Andersson, Y., Velicko, I., De Jong, B., Lofdahl, M., Hedlund, K.O., Allestam, G., Wangsell, C., Bergstedt, O., Horal, P., Ulleryd, P. and Soderstrom, A. (2007) Outbreak of norovirus in Vastra Gotaland associated with recreational activities at two lakes during August 2004. Scand J Infect Dis 39(4), 323-331.

Scarcella, C., Carasi, S., Cadoria, F., Macchi, L., Pavan, A., Salamana, M., Alborali, G.L., Losio, M.M., Boni, P. and Lavazza, A. (2009) An outbreak of viral gastroenteritis linked to municipal water supply, Lombardy, Italy, June 2009. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin 14(29), 506-513.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L. and Johne, R. (2012) PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol 113(5), 1014-1026.

Schuffenecker, I., Mirand, A., Antona, D., Henquell, C., Chomel, J.-J., Archimbaud, C., Billaud, G., Peigue-Lafeuille, H., Lina, B. and Bailly, J.-L. (2011) Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000–2009. Journal of Clinical Virology 50(1), 50-56.

Schultz, A.C., Perelle, S., Di Pasquale, S., Kovac, K., De Medici, D., Fach, P., Sommer, H.M. and Hoorfar, J. (2011) Collaborative validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water. Int J Food Microbiol 145 Suppl 1, S158-166.

Sdiri-Loulizi, K., Gharbi-Khelifi, H., de Rougemont, A., Hassine, M., Chouchane, S., Sakly, N., Pothier, P., Guediche, M.N., Aouni, M. and Ambert-Balay, K. (2009) Molecular epidemiology of human astrovirus and adenovirus serotypes 40/41 strains related to acute diarrhea in Tunisian children. J Med Virol 81(11), 1895-1902.

Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S. and Moe, C.L. (2011) Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water. Appl Environ Microbiol 77(19), 6884-6888.

Sezen, F., Aval, E., Agkurt, T., Yilmaz, S., Temel, F., Gulesen, R., Korukluoglu, G., Sucakli, M.B., Torunoglu, M.A. and Zhu, B.P. (2015) A large multi-pathogen gastroenteritis outbreak caused by drinking contaminated water from antique neighbourhood fountains, Erzurum city, Turkey, December 2012. Epidemiol Infect 143(4), 704-710.

Shan, T., Wang, C., Cui, L., Yu, Y., Delwart, E., Zhao, W., Zhu, C., Lan, D., Dai, X. and Hua, X. (2010) Picornavirus salivirus/klassevirus in children with diarrhea, China. Emerg Infect Dis 16(8), 1303-1305. Shen, J.C., Lin, J.F., Gao, J., Yao, W.T., Wen, D., Liu, G.T., Han, J.K., Ma, H.L., Zhang, L.J. and Zhu, B.P. (2011) [A norovirus-borne outbreak caused by contaminated bottled spring water in a school, Zhejiang province]. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 32(8), 800-803.

Shin, G.-A. and Sobsey, M.D. (2003) Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water. Appl Environ Microbiol 69(7), 3975-3978.

Shin, G.-A. and Sobsey, M.D. (2008) Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. Water Res 42(17), 4562-4568.

Shirato-Horikoshi, H., Ogawa, S., Wakita, T., Takeda, N. and Hansman, G.S. (2007) Binding activity of norovirus and sapovirus to histo-blood group antigens. Arch Virol 152(3), 457-461.

Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R.J. and Koopmans, M. (2007) Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. J Virol 81(18), 9932-9941.

Silva, H., Santos, S.O., Lima, A., Silveira-Lacerda, E., Anunciação, C. and Garcíazapata, M.A. (2011) Correlation Analysis of the Seasonality of Adenovirus Gene Detection and Water Quality Parameters Based on Yearly Monitoring. Water Quality, Exposure and Health 3(2), 101-107.

Sima, L.C., Schaeffer, J., Le Saux, J.-C., Parnaudeau, S., Elimelech, M. and Le Guyader, F.S. (2011) Calicivirus Removal in a Membrane Bioreactor Wastewater Treatment Plant. Appl Environ Microbiol 77(15), 5170-5177.

Simmonds, P., Karakasiliotis, I., Bailey, D., Chaudhry, Y., Evans, D.J. and Goodfellow, I.G. (2008) Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. Nucleic acids research 36(8), 2530-2546.

Simmons, F.J. and Xagoraraki, I. (2011) Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. Water Res 45(12), 3590-3598.

Simonet, J. and Gantzer, C. (2006a) Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. J Appl Microbiol 100(4), 862-870.

Simonet, J. and Gantzer, C. (2006b) Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. Appl Environ Microbiol 72(12), 7671-7677.

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.

Siqueira, A.A., Santelli, A., Alencar, L.R., Dantas, M.P., Dimech, C.P.N., Carmo, G.M.I., Santos, D.A., Alves, R.M.S., Lucena, M.B.F. and Morais, M. (2010) Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death due to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005. International Journal of Infectious Diseases 14(10), e898-e903.

Sirikanchana, K., Wangkahad, B. and Mongkolsuk, S. (2014) The capability of non-native strains of Bacteroides bacteria to detect bacteriophages as faecal indicators in a tropical area. J Appl Microbiol 117(6), 1820-1829.

Smith, C.M. and Hill, V.R. (2009) Dead-end hollow-fiber ultrafiltration for recovery of diverse microbes from water. Appl Environ Microbiol 75(16), 5284-5289.

Smith, D.B., Purdy, M.A. and Simmonds, P. (2013) Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. J Virol 87(8), 4161-4169.

Smith, E.M. and Gerba, C.P. (1982) Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. Appl Environ Microbiol 43(6), 1440-1450.

Snooks, M.J., Bhat, P., Mackenzie, J., Counihan, N.A., Vaughan, N. and Anderson, D.A. (2008) Vectorial entry and release of hepatitis A virus in polarized human hepatocytes. J Virol 82(17), 8733-8742.

Sobsey, M.D. and Glass, J.S. (1980) Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. Appl Environ Microbiol 40(2), 201-210.

Sobsey, M.D. and Glass, J.S. (1984) Influence of water quality on enteric virus concentration by microporous filter methods. Appl Environ Microbiol 47(5), 956-960.

Sobsey, M.D., Glass, J.S., Jacobs, R.R. and Rutala, W.A. (1980) Modifications of the tentative standard method for improved virus recovery efficiency. Journal (American Water Works Association), 350-355.

Sobsey, M.D. and Jones, B.L. (1979) Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters. Appl Environ Microbiol 37(3), 588-595.

Sobsey, M.D. and Meschke, J.S. (2003) Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. Report for the World Health Organization, Geneva, Switzerland, 70.

Sobsey, M.D., Moore, R.S. and Glass, J.S. (1981) Evaluating adsorbent filter performance for enteric virus concentrations in tap water. Journal (American Water Works Association), 542-548.

Sobsey, M.D., Wallis, C., Henderson, M. and Melnick, J.L. (1973) Concentration of Enteroviruses from Large Volumes of Water. Applied Microbiology 26(4), 529-534.

Somani, S.K., Aggarwal, R., Naik, S.R., Srivastava, S. and Naik, S. (2003) A serological study of intrafamilial spread from patients with sporadic hepatitis E virus infection. J Viral Hepat 10(6), 446-449.

Spellman, F.R. (2013) Handbook of water and wastewater treatment plant operations, CRC Press. Steyer, A., Gutierrez-Aguirre, I., Racki, N., Beigot Glaser, S., Brajer Humar, B., Strazar, M., Skrjanc, I., Poljsak-Prijatelj, M., Ravnikar, M. and Rupnik, M. (2015) The Detection Rate of Enteric Viruses and Clostridium difficile in a Waste Water Treatment Plant Effluent. Food Environ Virol.

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.

Stocker, A., Souza, B.F., Ribeiro, T.C., Netto, E.M., Araujo, L.O., Correa, J.I., Almeida, P.S., de Mattos, A.P., Ribeiro Hda, C., Jr., Pedral-Sampaio, D.B., Drosten, C. and Drexler, J.F. (2012) Cosavirus infection in persons with and without gastroenteritis, Brazil. Emerg Infect Dis 18(4), 656-659.

Straub, T., Bartholomew, R., Valdez, C., Valentine, N., Dohnalkova, A., Ozanich, R., Bruckner-Lea, C. and Call, D. (2011) Human norovirus infection of Caco-2 cells grown as a three-dimensional tissue structure. J Water Health 9(2), 225-240.

Straub, T.M., Honer zu Bentrup, K., Orosz-Coghlan, P., Dohnalkova, A., Mayer, B.K., Bartholomew, R.A., Valdez, C.O., Bruckner-Lea, C.J., Gerba, C.P., Abbaszadegan, M. and Nickerson, C.A. (2007) In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. Emerg Infect Dis 13(3), 396-403.

Stuart, R.L., Tan, K., Mahar, J.E., Kirkwood, C.D., Andrew Ramsden, C., Andrianopoulos, N., Jolley, D., Bawden, K., Doherty, R., Kotsanas, D., Bradford, J. and Buttery, J.P. (2010) An outbreak of necrotizing enterocolitis associated with norovirus genotype GII.3. Pediatr Infect Dis J 29(7), 644-647.

Suttle, C.A. (1993) Enumeration and Isolation of Viruses. Handbook of methods in aquatic microbial ecology, 121.

Svraka, S., Duizer, E., Vennema, H., de Bruin, E., van der Veer, B., Dorresteijn, B. and Koopmans, M. (2007) Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. J Clin Microbiol 45(5), 1389-1394.

Svraka, S., Vennema, H., van der Veer, B., Hedlund, K.O., Thorhagen, M., Siebenga, J., Duizer, E. and Koopmans, M. (2010) Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe. J Clin Microbiol 48(6), 2191-2198.

Swain, S.K., Baral, P., Hutin, Y.J., Rao, T.V., Murhekar, M. and Gupte, M.D. (2010) A hepatitis E outbreak caused by a temporary interruption in a municipal water treatment system, Baripada, Orissa, India, 2004. Trans R Soc Trop Med Hyg 104(1), 66-69.

Symonds, E.M., Griffin, D.W. and Breitbart, M. (2009) Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. Appl Environ Microbiol 75(5), 1402-1409.

Symonds, E.M., Verbyla, M.E., Lukasik, J.O., Kafle, R.C., Breitbart, M. and Mihelcic, J.R. (2014) A case study of enteric virus removal and insights into the associated risk of water reuse for two wastewater treatment pond systems in Bolivia. Water Res 65, 257-270.

Tallon, L.A., Love, D.C., Moore, Z.S. and Sobsey, M.D. (2008) Recovery and sequence analysis of hepatitis a virus from springwater implicated in an outbreak of acute viral hepatitis. Appl Environ Microbiol 74(19), 6158-6160.

Tam, C.C., O'Brien, S.J., Tompkins, D.S., Bolton, F.J., Berry, L., Dodds, J., Choudhury, D., Halstead, F., Iturriza-Gomara, M., Mather, K., Rait, G., Ridge, A., Rodrigues, L.C., Wain, J., Wood, B. and Gray, J.J. (2012) Changes in causes of acute gastroenteritis in the United Kingdom over 15 years: microbiologic findings from 2 prospective, population-based studies of infectious intestinal disease. Clin Infect Dis 54(9), 1275-1286.

Tan, C.Y.Q., Gonfrier, G., Ninove, L., Zandotti, C., Dubot-Pérès, A., de Lamballerie, X. and Charrel, R.N. (2012) Screening and detection of human enterovirus 71 infection by a real-time RT-PCR assay in Marseille, France, 2009–2011. Clinical Microbiology and Infection 18(4), E77-E80.

Tang, W.Z. and Sillanpää, M. (2015) Virus Sensitivity Index of UV disinfection. Environmental technology 36(11), 1464-1475.

Tartera, C., Bosch, A. and Jofre, J. (1988) The inactivation of bacteriophages infecting Bacteroides fragilis by chlorine treatment and UV-irradiation. FEMS Microbiology Letters 56(3), 313-316. Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Steele, A.D., Duque, J. and Parashar, U.D. (2012) 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases 12(2), 136-141.

Tei, S., Kitajima, N., Ohara, S., Inoue, Y., Miki, M., Yamatani, T., Yamabe, H., Mishiro, S. and Kinoshita, Y. (2004) Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: An ageand sex-matched case-control study. J Med Virol 74(1), 67-70.

ter Waarbeek, H.L., Dukers-Muijrers, N.H., Vennema, H. and Hoebe, C.J. (2010) Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. J Clin Virol 47(3), 268-272.

Thomas, V., Loret, J.-F., Jousset, M. and Greub, G. (2008) Biodiversity of amoebae and amoebaeresisting bacteria in a drinking water treatment plant. Environmental Microbiology 10(10), 2728-2745.

Thompson, S.S., Jackson, J.L., Suva-Castillo, M., Yanko, W.A., El Jack, Z., Kuo, J., Chen, C.L., Williams, F.P. and Schnurr, D.P. (2003) Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. Water Environ Res 75(2), 163-170.

Thorven, M., Grahn, A., Hedlund, K.O., Johansson, H., Wahlfrid, C., Larson, G. and Svensson, L. (2005) A homozygous nonsense mutation (428G-->A) in the human secretor (FUT2) gene provides resistance to symptomatic norovirus (GGII) infections. J Virol 79(24), 15351-15355.

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J. and Gerba, C.P. (2003a) Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. Appl Environ Microbiol 69(7), 3979-3985.

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J. and Gerba, C.P. (2005) Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. Water Res 39(15), 3650-3656.

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Riley, K. and Gerba, C.P. (2003b) Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. Appl Environ Microbiol 69(1), 577-582. Todd, S., Page, N.A., Duncan Steele, A., Peenze, I. and Cunliffe, N.A. (2010) Rotavirus strain types circulating in Africa: Review of studies published during 1997-2006. J Infect Dis 202 Suppl, S34-42. Tome-Amat, J., Fleischer, L., Parker, S., Bardliving, C. and Batt, C. (2014) Secreted production of assembled Norovirus virus-like particles from Pichia pastoris. Microbial Cell Factories 13(1), 134. Tongling, S., Chunmei, W., Li, C., Ying, Y., Eric, D., Wei, Z., Caixia, Z., Daoliang, L., Xiuqiang, D. and Xiu, G.H. (2010) Picornavirus Salivirus/Klassevirus in Children with Diarrhea, China. Emerging Infectious Disease journal 16(8), 1303.

Trilisky, E.I. and Lenhoff, A.M. (2007) Sorption processes in ion-exchange chromatography of viruses. Journal of Chromatography A 1142(1), 2-12.

Trivedi, T.K., DeSalvo, T., Lee, L., Palumbo, A., Moll, M., Curns, A., Hall, A.J., Patel, M., Parashar, U.D. and Lopman, B.A. (2012) Hospitalizations and mortality associated with norovirus outbreaks in nursing homes, 2009-2010. Jama 308(16), 1668-1675.

Tsao, K.-C., Huang, C.-G., Huang, Y.-L., Chen, F.-C., Huang, P.-N., Huang, Y.-C., Lin, T.-Y., Shih, S.-R. and Chang, S.-C. (2010) Epidemiologic features and virus isolation of enteroviruses in Northern Taiwan during 2000–2008. J Virol Methods 165(2), 330-332.

Učakar, V., Grilc, E. and Jeraj, I. (2012) An investigation of a waterborne outbreak caused by microbiological contamination of the drinking water supply system. Slovenian Journal of Public Health 51(2), 112-119.

Urasawa, T., Urasawa, S. and Taniguchi, K. (1981) Sequential Passages of Human Rotavirus in MA-104 Cells. Microbiol Immunol 25(10), 1025-1035.

Vaidya, S.R., Chitambar, S.D. and Arankalle, V.A. (2002) Polymerase chain reaction-based prevalence of hepatitis A, hepatitis E and TT viruses in sewage from an endemic area. J Hepatol 37(1), 131-136. van Alphen, L.B., Dorléans, F., Schultz, A.C., Fonager, J., Ethelberg, S., Dalgaard, C., Adelhardt, M., Engberg, J.H., Fischer, T.K. and Lassen, S.G. (2014) The Application of New Molecular Methods in the Investigation of a Waterborne Outbreak of Norovirus in Denmark, 2012. PLoS One 9(9), e105053. van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J.S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinje, J., White, P.A. and Koopmans, M. (2013) Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. Euro Surveill 18(1), 8-9.

Van Damme, P., Giaquinto, C., Huet, F., Gothefors, L., Maxwell, M. and Van der Wielen, M. (2007) Multicenter prospective study of the burden of rotavirus acute gastroenteritis in Europe, 2004-2005: the REVEAL study. J Infect Dis 195 Suppl 1, S4-s16.

van der Sanden, S., van Eek, J., Martin, D.P., van der Avoort, H., Vennema, H. and Koopmans, M. (2011) Detection of recombination breakpoints in the genomes of human enterovirus 71 strains isolated in the Netherlands in epidemic and non-epidemic years, 1963–2010. Infection, Genetics and Evolution 11(5), 886-894.

van Doorn, L.-J., Kleter, B., Hoefnagel, E., Stainier, I., Poliszczak, A., Colau, B. and Quint, W. (2009) Detection and genotyping of human rotavirus VP4 and VP7 genes by reverse transcriptase PCR and reverse hybridization. Journal of Clinical Microbiology 47(9), 2704-2712.

van Maarseveen, N.M., Wessels, E., de Brouwer, C.S., Vossen, A.C. and Claas, E.C. (2010) Diagnosis of viral gastroenteritis by simultaneous detection of Adenovirus group F, Astrovirus, Rotavirus group A, Norovirus genogroups I and II, and Sapovirus in two internally controlled multiplex real-time PCR assays. J Clin Virol 49(3), 205-210.

van Zyl, W.B., Williams, P.J., Grabow, W.O. and Taylor, M.B. (2004) Application of a molecular method for the detection of group A rotaviruses in raw and treated water. Water Sci Technol 50(1), 223-228.

Vantarakis, A.C. and Papapetropoulou, M. (1998) Detection of enteroviruses and adenoviruses in coastal waters of SW Greece by nested polymerase chain reaction. Water Res 32(8), 2365-2372. Vasilyev, E.V., Trofimov, D.Y., Tonevitsky, A.G., Ilinsky, V.V., Korostin, D.O. and Rebrikov, D.V. (2009) Torque Teno Virus (TTV) distribution in healthy Russian population. Virol J 6, 134.

Vaughn, J.M., Chen, Y.-S., Novotny, J.F. and Strout, D. (1990) Effects of ozone treatment on the infectivity of hepatitis A virus. Can J Microbiol 36(8), 557-560.

Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Lindburg, K. and Morales, D. (1987) Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. Appl Environ Microbiol 53(9), 2218-2221.

Verani, M., Casini, B., Battistini, R., Pizzi, F., Rovini, E. and Carducci, A. (2006) One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in river water in Italy. Water Sci Technol 54(3), 191-195. Verhoef, L., Hewitt, J., Barclay, L., Ahmed, S., Lake, R., Hall, A.J., Lopman, B., Kroneman, A. and Vennema, H. (2015) Norovirus Genotype Profiles Associated with Foodborne Transmission, 1999 ?" 2012. Emerg Infect Dis 21(4), 592.

Versalovic, J., Carroll, K.C., Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. and Warnock, D.W. (2011) Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition, American Society of Microbiology.

Victoria, M., Fumian, T.M., Rocha, M.S., Dalmao, F., Leite, J.P., Girones, R. and Miagostovich, M.P. (2014a) Gastroenteric virus dissemination and influence of rainfall events in urban beaches in Brazil. J Appl Microbiol 117(4), 1210-1218.

Victoria, M., Tort, L.F.L., García, M., Lizasoain, A., Maya, L., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P., Cristina, J. and Colina, R. (2014b) Assessment of Gastroenteric Viruses from Wastewater Directly Discharged into Uruguay River, Uruguay. Food Environ Virol 6(2), 116-124.

Vilaginès, P., Sarrette, B., Husson, G. and Vilagines, R. (1993) Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. Water Science & Technology 27(3-4), 299-306.

Villalva, C., Touriol, C., Seurat, P., Trempat, P., Delsol, G. and Brousset, P. (2001) Increased yield of PCR products by addition of T4 gene 32 protein to the SMART PCR cDNA synthesis system. Biotechniques 31(1), 81-83, 86.

Villena, C., Gabrieli, R., Pinto, R.M., Guix, S., Donia, D., Buonomo, E., Palombi, L., Cenko, F., Bino, S. and Bosch, A. (2003) A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. Epidemiol Infect 131(03), 1105-1110.

Vinje, J., Green, J., Lewis, D.C., Gallimore, C.I., Brown, D.W. and Koopmans, M.P. (2000) Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". Arch Virol 145(2), 223-241.

Vogt, T.M., Wise, M.E., Bell, B.P. and Finelli, L. (2008) Declining hepatitis A mortality in the United States during the era of hepatitis A vaccination. J Infect Dis 197(9), 1282-1288.

Wallis, C., Henderson, M. and Melnick, J.L. (1972) Enterovirus concentration on cellulose membranes. Appl Microbiol 23(3), 476-480.

Wallis, C. and Melnick, J.L. (1967) Concentration of enteroviruses on membrane filters. J Virol 1(3), 472-477.

Walter, J.E., Mitchell, D.K., Guerrero, M.L., Berke, T., Matson, D.O., Monroe, S.S., Pickering, L.K. and Ruiz-Palacios, G. (2001) Molecular epidemiology of human astrovirus diarrhea among children from a periurban community of Mexico City. J Infect Dis 183(5), 681-686.

Wang, C.H., Tschen, S.Y. and Flehmig, B. (1995) Antigenicity of hepatitis A virus after ultra-violet inactivation. Vaccine 13(9), 835-840.

Wang, Q.H., Han, M.G., Funk, J.A., Bowman, G., Janies, D.A. and Saif, L.J. (2005) Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. J Clin Microbiol 43(12), 5963-5972.

Ward, R.L., Bernstein, D.I., Young, E.C., Sherwood, J.R., Knowlton, D.R. and Schiff, G.M. (1986) Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. J Infect Dis 154(5), 871-880.

Wasley, A., Fiore, A. and Bell, B.P. (2006) Hepatitis A in the Era of Vaccination. Epidemiologic Reviews 28(1), 101-111.

Weidenkopf, S.J. (1958) Inactivation of type 1 poliomyelitis virus with chlorine. Virology 5(1), 56-67. Werber, D., Laušević, D., Mugoša, B., Vratnica, Z., Ivanović-Nikolić, L., Žižić, L., Alexandre-Bird, A., Fiore, L., Ruggeri, F.M. and Di Bartolo, I. (2009) Massive outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of municipal drinking water in a European capital city. Epidemiol Infect 137(12), 1713-1720.

White, P.A. (2014) Evolution of norovirus. Clin Microbiol Infect 20(8), 741-745.

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.

Willcocks, M.M., Carter, M.J., Laidler, F.R. and Madeley, C.R. (1990) Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. Arch Virol 113(1-2), 73-81.

Wingender, J. and Flemming, H.-C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. Int J Hyg Environ Health 214(6), 417-423.

Winona, L.J., Ommani, A.W., Olszewski, J., Nuzzo, J.B. and Oshima, K.H. (2001) Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems. Can J Microbiol 47(11), 1033-1041.

Wold, W.S.M. and Horwitz, M.S. (2007) Adenoviruses, p 2395–2436. Fields virology 2. Wolf, S., Reetz, J., Hoffmann, K., Grundel, A., Schwarz, B.A., Hanel, I. and Otto, P.H. (2012) Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. Arch Virol 157(8), 1499-1507. Wolf, S., Reetz, J. and Otto, P. (2011) Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. Arch Virol 156(7), 1143-1150.

Wolf, S., Rivera-Aban, M. and Greening, G.E. (2009) Long-range reverse transcription as a useful tool to assess the genomic integrity of norovirus. Food Environ Virol 1(3-4), 129-136.

Wolfaardt, M., Kiulia, N.M., Mwenda, J.M. and Taylor, M.B. (2011) Evidence of a recombinant wildtype human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. J Clin Microbiol 49(2), 728-731.

Wommack, K.E., Hill, R.T., Muller, T.A. and Colwell, R.R. (1996) Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. Appl Environ Microbiol 62(4), 1336-1341.

Wood, D.J. and Hull, B. (1999) L20B cells simplify culture of polioviruses from clinical samples. J Med Virol 58(2), 188-192.

Wood, S.R., Sharp, I.R., Caul, E.O., Paul, I., Bailey, A.S., Hawkins, M., Pugh, S., Treharne, J. and Stevenson, S. (1997) Rapid detection and serotyping of adenovirus by direct immunofluorescence. J Med Virol 51(3), 198-201.

Wu, C.-Y., Wang, H.-C., Wang, K.-T., Weng, S.-C., Chang, W.-H., Shih, D.Y.-C., Lo, C.-F. and Wang, D.-Y. (2013) Neutralization of five subgenotypes of Enterovirus 71 by Taiwanese human plasma and Taiwanese plasma derived intravenous immunoglobulin. Biologicals 41(3), 154-157.

Wu, F.T., Oka, T., Takeda, N., Katayama, K., Hansman, G.S., Muo, C.H., Liang, S.Y., Hung, C.H., Dah-Shyong Jiang, D., Hsin Chang, J., Yang, J.Y., Wu, H.S. and Yang, C.F. (2008) Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. Emerg Infect Dis 14(7), 1169-1171.

Wyn-Jones, A.P., Carducci, A., Cook, N., D'Agostino, M., Divizia, M., Fleischer, J., Gantzer, C., Gawler, A., Girones, R. and Höller, C. (2011) Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. Water Res 45(3), 1025-1038.

Xing, L., Li, T.-C., Mayazaki, N., Simon, M.N., Wall, J.S., Moore, M., Wang, C.-Y., Takeda, N., Wakita, T., Miyamura, T. and Cheng, R.H. (2010) Structure of Hepatitis E Virion-sized Particle Reveals an RNA-dependent Viral Assembly Pathway. Journal of Biological Chemistry 285(43), 33175-33183.

Yahya, M., Hmaied, F., Jebri, S., Jofre, J. and Hamdi, M. (2015) Bacteriophages as indicators of human and animal faecal contamination in raw and treated wastewaters from Tunisia. J Appl Microbiol 118(5), 1217-1225.

Yamashita, T., Kobayashi, S., Sakae, K., Nakata, S., Chiba, S., Ishihara, Y. and Isomura, S. (1991) Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. J Infect Dis 164(5), 954-957.

Yamashita, T., Sakae, K., Ishihara, Y., Isomura, S. and Utagawa, E. (1993) Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. J Clin Microbiol 31(11), 2938-2943.

Yamashita, T., Sakae, K., Kobayashi, S., Ishihara, Y., Miyake, T., Mubina, A. and Isomura, S. (1995) Isolation of cytopathic small round virus (Aichi virus) from Pakistani children and Japanese travelers from Southeast Asia. Microbiol Immunol 39(6), 433-435.

Yamashita, T., Sakae, K., Tsuzuki, H., Suzuki, Y., Ishikawa, N., Takeda, N., Miyamura, T. and Yamazaki, S. (1998) Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. J Virol 72(10), 8408-8412. Yamashita, T., Sugiyama, M., Tsuzuki, H., Sakae, K., Suzuki, Y. and Miyazaki, Y. (2000) Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the Picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. J Clin Microbiol 38(8), 2955-2961. Yamashita, Y., Ootsuka, Y., Kondo, R., Oseto, M., Doi, M., Miyamoto, T., Ueda, T., Kondo, H., Tanaka,

T., Wakita, T., Katayama, K., Takeda, N. and Oka, T. (2010) Molecular characterization of Sapovirus detected in a gastroenteritis outbreak at a wedding hall. J Med Virol 82(4), 720-726.

Ye, X.Y., Ming, X., Zhang, Y.L., Xiao, W.Q., Huang, X.N., Cao, Y.G. and Gu, K.D. (2012) Real-time PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China. Curr Microbiol 65(3), 244-253.

Yeats, J., Smuts, H., Serfontein, C.J. and Kannemeyer, J. (2005) Investigation into a school enterovirus outbreak using PCR detection and serotype identification based on the 5' non-coding region. Epidemiol Infect 133(06), 1123-1130.

Yeh, H.-Y., Hwang, Y.-C., Yates, M.V., Mulchandani, A. and Chen, W. (2008a) Detection of hepatitis A virus by using a combined cell culture-molecular beacon assay. Appl Environ Microbiol 74(7), 2239-2243.

Yeh, H.-Y., Yates, M.V., Mulchandani, A. and Chen, W. (2008b) Visualizing the dynamics of viral replication in living cells via Tat peptide delivery of nuclease-resistant molecular beacons. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(45), 17522-17525.

Yoder, J.S., Blackburn, B.G., Craun, G.F., Hill, V., Levy, D.A., Chen, N., Lee, S.H., Calderon, R.L. and Beach, M.J. (2004) Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water—United States, 2001–2002. MMWR Surveill Summ 53(8), 1-22.

Yokoyama, M., Oka, T., Kojima, H., Nagano, T., Okabe, T., Katayama, K., Wakita, T., Kanda, T. and Sato, H. (2012) Structural basis for specific recognition of substrates by sapovirus protease. Front Microbiol 3, 312.

Yoshida, T., Kasuo, S., Azegami, Y., Uchiyama, Y., Satsumabayashi, K., Shiraishi, T., Katayama, K., Wakita, T., Takeda, N. and Oka, T. (2009) Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. J Clin Virol 45(1), 67-71. Yotsuyanagi, H., Koike, K., Yasuda, K., Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Kurokawa, K. and Iino, S. (1996) Prolonged fecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. Hepatology 24(1), 10-13.

Yousuf, F.A., Siddiqui, R., Subhani, F. and Khan, N.A. (2013) Status of free-living amoebae (Acanthamoeba spp., Naegleria fowleri, Balamuthia mandrillaris) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. J Water Health 11(2), 371-375.

Zakhour, M., Maalouf, H., Di Bartolo, I., Haugarreau, L., Le Guyader, F.S., Ruvoen-Clouet, N., Le Saux, J.C., Ruggeri, F.M., Pommepuy, M. and Le Pendu, J. (2010) Bovine norovirus: carbohydrate ligand, environmental contamination, and potential cross-species transmission via oysters. Appl Environ Microbiol 76(19), 6404-6411.

Zhang, L.J., Wang, X.J., Bai, J.M., Fang, G., Liu, L.G., Zhang, Y. and Fontaine, R.E. (2009a) An outbreak of hepatitis A in recently vaccinated students from ice snacks made from contaminated well water. Epidemiol Infect 137(3), 428-433.

Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W.H., Run, J.Q., Wei, C.L., Soh, S.W., Hibberd, M.L., Liu, E.T., Rohwer, F. and Ruan, Y. (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. PLoS Biol 4(1), e3.

Zhang, Y., Tan, X.-J., Wang, H.-Y., Yan, D.-M., Zhu, S.-L., Wang, D.-Y., Ji, F., Wang, X.-J., Gao, Y.-J., Chen, L., An, H.-Q., Li, D.-X., Wang, S.-W., Xu, A.-Q., Wang, Z.-J. and Xu, W.-B. (2009b) An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. Journal of Clinical Virology 44(4), 262-267.

Zheng, D.P., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I. and Monroe, S.S. (2006) Norovirus classification and proposed strain nomenclature. Virology 346(2), 312-323.

Zheng, D.P., Widdowson, M.A., Glass, R.I. and Vinje, J. (2010) Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. J Clin Microbiol 48(1), 168-177.

Zhou, X., Li, H., Sun, L., Mo, Y., Chen, S., Wu, X., Liang, J., Zheng, H., Ke, C., Varma, J.K., Klena, J.D., Chen, Q., Zou, L. and Yang, X. (2012) Epidemiological and molecular analysis of a waterborne outbreak of norovirus GII.4. Epidemiol Infect 140(12), 2282-2289.

Zintz, C., Bok, K., Parada, E., Barnes-Eley, M., Berke, T., Staat, M.A., Azimi, P., Jiang, X. and Matson, D.O. (2005) Prevalence and genetic characterization of caliciviruses among children hospitalized for acute gastroenteritis in the United States. Infect Genet Evol 5(3), 281-290.

Résumé

Les virus entériques sont l'une des principales causes d'épidémies de gastroentérites chez l'Homme. Ces virus sont essentiellement excrétés dans les selles et sont donc observés en grande quantité au sein des eaux usées. L'abattement viral est très variable en fonction des types de traitements mis en place dans les stations d'épurations (STEP). Malgré ces traitements, la grande majorité des STEP rejettent d'importantes quantités de virus entériques dans l'environnement.

L'objectif de ce travail a été d'apporter des éléments de réponse concernant la circulation des virus entériques humains dans un environnement hydrique urbain. Pour cela, des méthodes d'analyse ont été mises au point afin de permettre la détection d'un large panel de virus entériques dans différentes matrices hydriques susceptibles d'être étudiées dans l'environnement. Trois contrôles ont été développés afin de vérifier le bon déroulement de cette méthode et donc de valider les résultats obtenus.

Une campagne d'échantillonnage a été réalisée au niveau d'un tronçon de la Seine impacté par les affluents naturels et des effluents de STEP. La prise en compte des débits au niveau des différents points de prélèvement a permis de calculer les flux viraux qui correspondent à la quantité de virus circulant en un point au cours d'une unité de temps. Cette approche a permis de démontrer la contribution majeure des effluents de STEP dans la contamination virale du milieu récepteur. Parmi l'ensemble des virus entériques recherchés, les adénovirus, les norovirus, les astrovirus et les rotavirus présentaient les charges virales les plus importantes dans les effluents de STEP et dans les eaux de surface. Leurs quantités au sein de ces matrices d'eau étaient les plus importantes durant la période hivernale ce qui était cohérent avec les données épidémiologiques. Un lien étroit entre l'état sanitaire de la population humaine reliée au réseau d'assainissement et la concentration en virus entériques des effluents de STEP et des eaux de surface a pu être établi.

Sur ces mêmes prélèvements, l'étude de la diversité des astrovirus et des norovirus de génogroupes I et II a été réalisée par pyroséquençage. Cette approche a permis d'établir un profil des différents génotypes circulant dans les effluents de STEP. Au regard des données épidémiologiques recueillies sur la même période par le Centre National de Référence des virus entériques, un grand nombre de génotypes communs ont pu être observés entre ces deux jeux de données. Ce constat met en évidence le caractère informatif de l'analyse des effluents de STEP qui fournit un profil relativement pertinent des virus entériques circulant dans l'environnement mais aussi dans la population humaine.

La présence de virus entériques présente dans les eaux de surface, ressources utilisées pour la potabilisation, est un réel problème de santé publique. C'est pourquoi la dernière partie de ce travail s'intéresse à évaluer leur persistance dans l'eau de surface et l'eau destinée à la consommation humaine, mais aussi face à des traitements de désinfection, fréquemment utilisés dans les usines de potabilisation et parfois en sortie de STEP. L'absence de modèle cellulaire pour la plupart de ces virus nous a conduits à développer une approche basée sur l'emploi d'agents intercalants permettant d'évaluer l'intégrité de la capside des particules virales détectées par PCR en temps réel. L'utilisation de ces agents intercalants s'est avérée pertinente à partir du moment où les conditions conduisent à une dégradation des capsides virales. Par conséquent, leur emploi sur des échantillons d'eau potabilisée a permis une meilleure estimation du risque sanitaire associé à la consommation de l'eau produite.

En conclusion, ce travail propose des méthodes d'analyse qui ont permis de mettre en exergue les relations existantes entre la circulation des virus entériques dans l'environnement et l'état sanitaire de la population humaine.

Abstract

Enteric viruses are a major cause of gastroenteritis outbreaks in humans. These viruses are mainly excreted in the faeces and are therefore observed in large amounts in wastewater. Depending on the types of treatments, virus removal from effluent may vary from one wastewater treatment plants (WWTP) to another. Despite these treatments, most of the WWTP releases significant quantities of enteric viruses in the environment.

The aim of this study was to better understand the circulation of human enteric viruses in urban rivers. For this purpose methods have been developed to enable the detection of a broad panel of enteric viruses in various water matrices that may be collected from the environment. Since there is important inhibition observed in this type of water samples, three controls were developed to verify the success of this method, from the sample concentration to the PCR quantification, and thus to validate the results.

A sampling campaign was carried out at the Seine River section (Paris area) affected by its natural tributaries and WWTP effluents. The river and effluent flows at the different sampling points were used to calculate the viral flows as the amount of virus circulating at a point during a time unit. This approach has demonstrated the major implication WWTP effluents in the viral contamination of the Seine River. Among all the targeted enteric viruses, adenoviruses, norovirus, astrovirus and rotavirus showed the most significant viral loads in WWTP effluents and consequently in river waters. Their quantities in WWTP effluents and surface water were the most important during the winter period which was consistent with the epidemiological data from the French Reference Center for enteric viruses. A close connection between the health status of the Parisian population and enteric virus concentration in WWTP effluents and in the Seine River could be established.

The study of the diversity of astrovirus and norovirus of genogroups I and II was carried out by pyrosequencing on WWTP effluent and Seine river samples to develop a profile of the different genotypes circulating in the environment. Many common genotypes were observed between the effluent dataset and the epidemiological data collected over the same period by the French Reference Center. These results highlight the complementarity of the two datasets, and the fact that WWTP effluents provide a relevant profile of enteric viruses circulating in the environment but also in the human population.

The amount of enteric viruses present in drinking water resources such as surface waters is a real public health problem. Therefore, it is important to evaluate viral persistence in surface waters during tertiary treatment and in drinking water, but also the viral persistence after usual disinfection treatments such chlorination and ultraviolet treatment. The absence of cell model for culture of most enteric viruses, has led us to develop a method using intercalating dyes to assess the capsid integrity of the viral particles quantified by real time PCR. The use of these intercalating agents was relevant when the environmental conditions and disinfection treatments caused a degradation of the viral capsid. Consequently, their use for the analysis of water samples from drinking water plants allowed to prevent an overestimation of the risk of transmission to humans by the consumption of tap water.

In conclusion, this work provides development of analysis methods highlighting the relationships between the circulation of infectious enteric viruses in the environment and the health status of the human population.