

## Interactions entre dreissènes et phages ARN-F spécifiques

### Intérêt pour l'évaluation de la qualité des masses d'eau

J. Do Nascimento, M. Palos Ladeiro, M. Bonnard, A. Geffard,

UMR I-02 SEBIO, Université de Reims Champagne Ardenne

N. Boudaud,

ACTALIA

C. Lopes,

LBBE

C. Gantzer

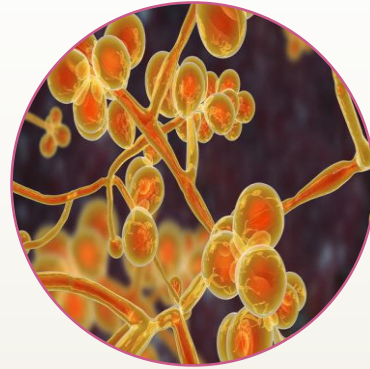
LCPME

# Contexte : la pollution fécale du milieu aquatique

► Pollution biologique des eaux par microorganismes pathogènes



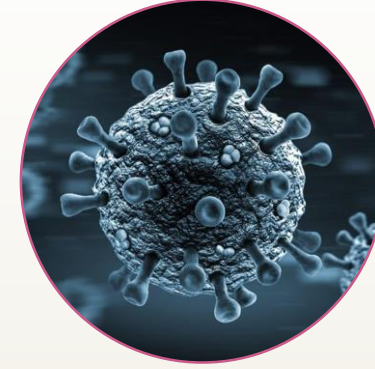
bactéries



champignons



protozoaires



virus

# Contexte : la pollution fécale du milieu aquatique

➤ Pollution biologique des eaux par microorganismes pathogènes

➤ Nombreuses épidémies d'origine hydrique causées par les **virus entériques**

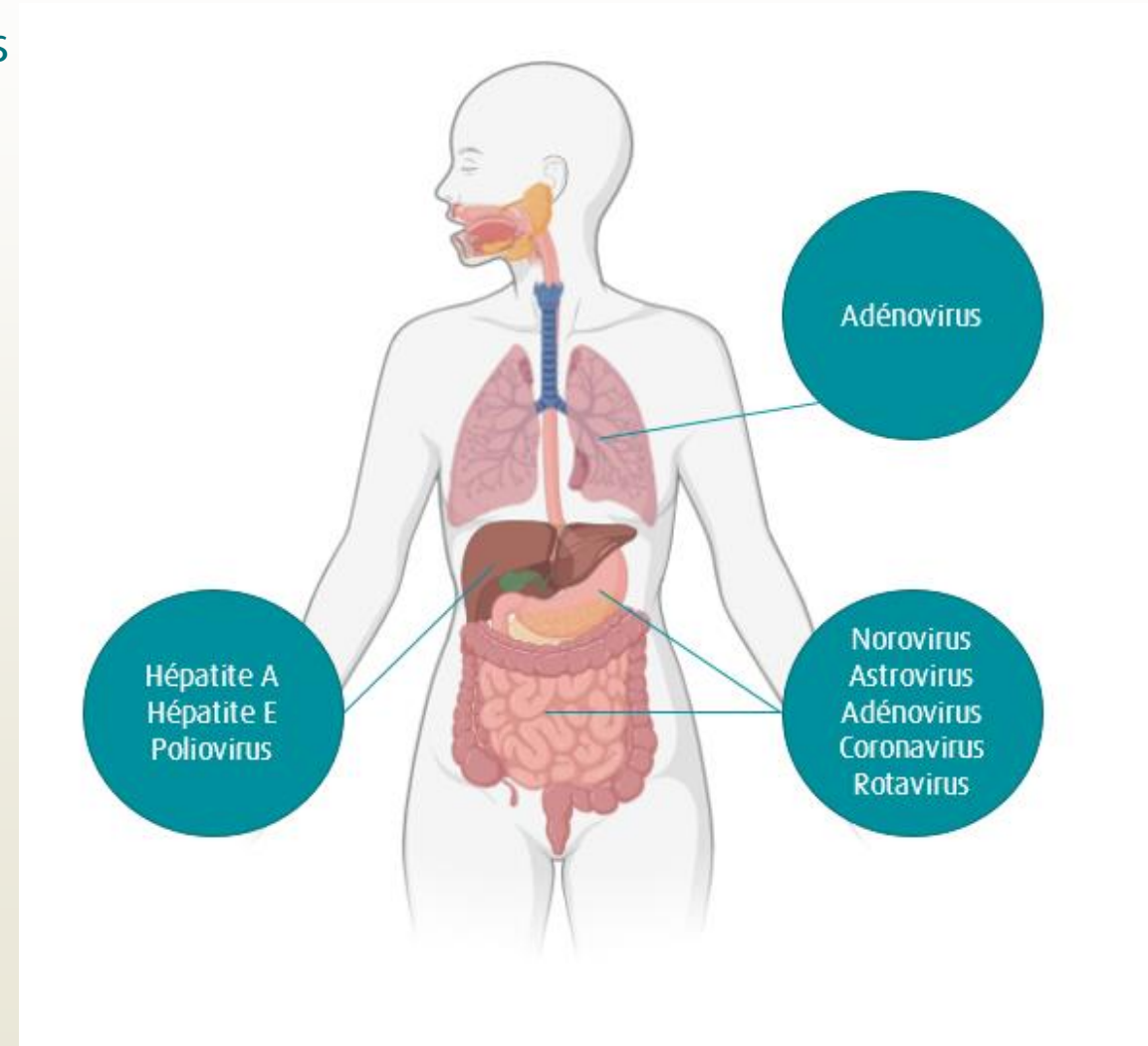
(Bosch, 1998)

➤ Nombreux sérotypes : norovirus, VHA, VHE, etc

➤ Pourquoi sont ils dangereux pour l'Homme ?

➤ Maladies variées (+/- graves) : pneumonies, polyomyélites, hépatites, **gastro-entérites**

(Le Guyader et al, 2014)



# Contexte : la pollution fécale du milieu aquatique

➤ Pollution biologique des eaux par microorganismes pathogènes

➤ Nombreuses épidémies d'origine hydrique causées par les **virus entériques**

(Bosch, 1998)

➤ Nombreux sérotypes : norovirus, VHA, VHE, etc

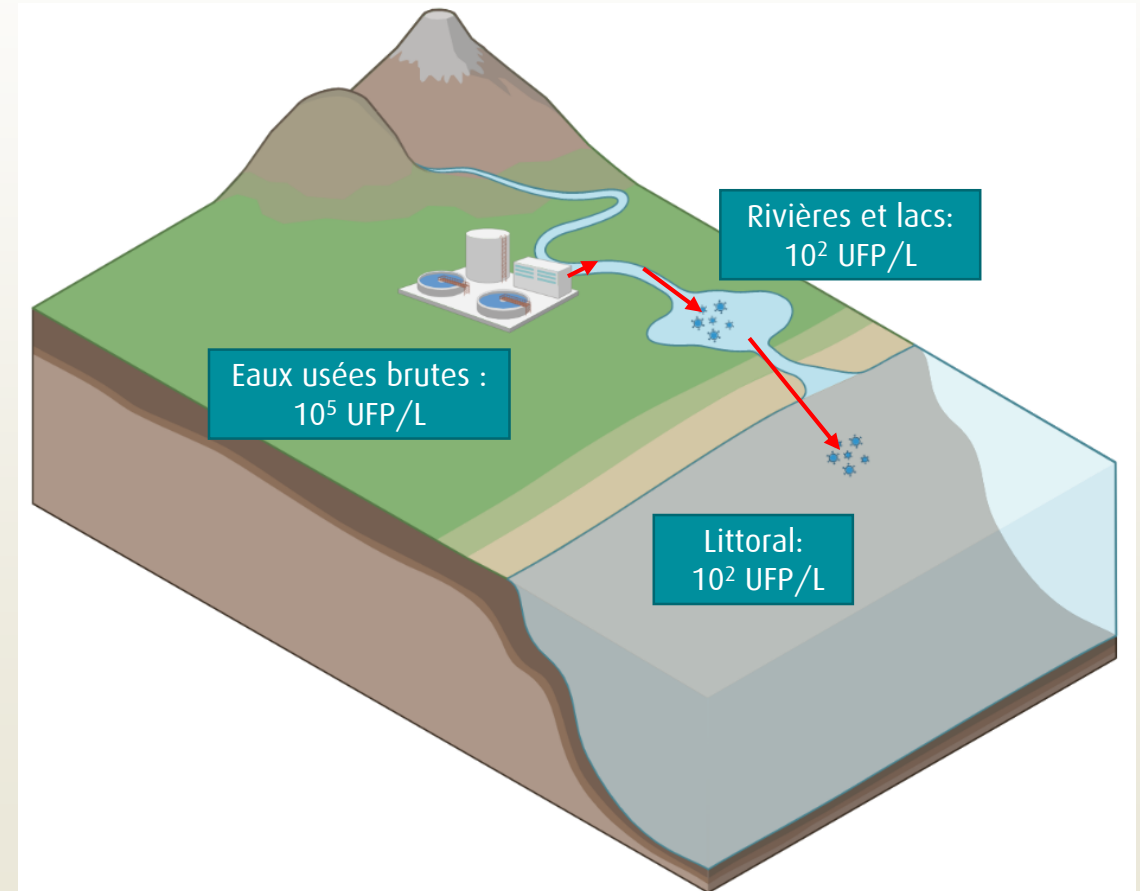
➤ Pourquoi sont ils dangereux pour l'Homme ?

➤ Maladies variées (+/- graves) : pneumonies, polyomyélites, hépatites, **gastro-entérites**

(Le Guyader et al, 2014)

➤ **Résistants** et **stables** dans l'environnement

(Blatchley et al, 2007)



# Contexte : la pollution fécale du milieu aquatique

- Pollution biologique des eaux par microorganismes pathogènes

- Nombreuses épidémies d'origine hydrique causées par les **virus entériques**

(Bosch, 1998)

- Nombreux sérotypes : norovirus, VHA, VHE, etc

- Pourquoi sont ils dangereux pour l'Homme ?

- Maladies variées (+/- graves) : pneumonies, polyomyélites, hépatites, **gastro-entérites**

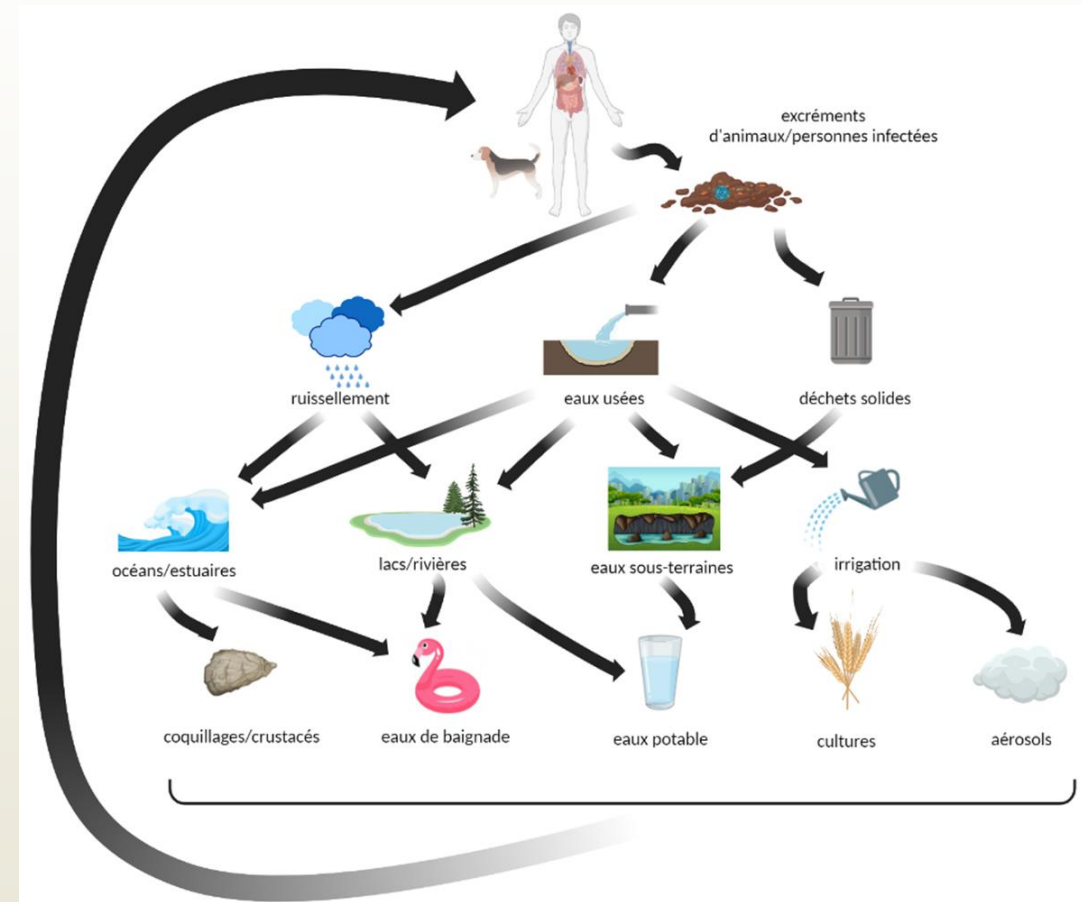
(Le Guyader et al, 2014)

- **Résistants** et **stables** dans l'environnement

(Blatchley et al, 2007)

- Transmissible facilement par **voie féco-orale** directe ou indirecte

(Morin & Picoche, 2008)



Voies de transmissions des virus entériques [1]

# Vers de nouveaux outils pour estimer le risque viral ?

[2]

- Détection complexe des virus dans l'eau sans étape de concentration

(Morin et Picoche, 2008)

- Indicateurs de contamination fécale

(Jofre, 2007)

- Indicateur bactérien réglementé *E coli* non adapté pour estimer risque viral

(Bosch, 1998)



# Vers de nouveaux outils pour estimer le risque viral ?

[2]

- Détection complexe des virus dans l'eau sans étape de concentration

(Morin et Picoche, 2008)

- Indicateurs de contamination fécale

(Jofre, 2007)

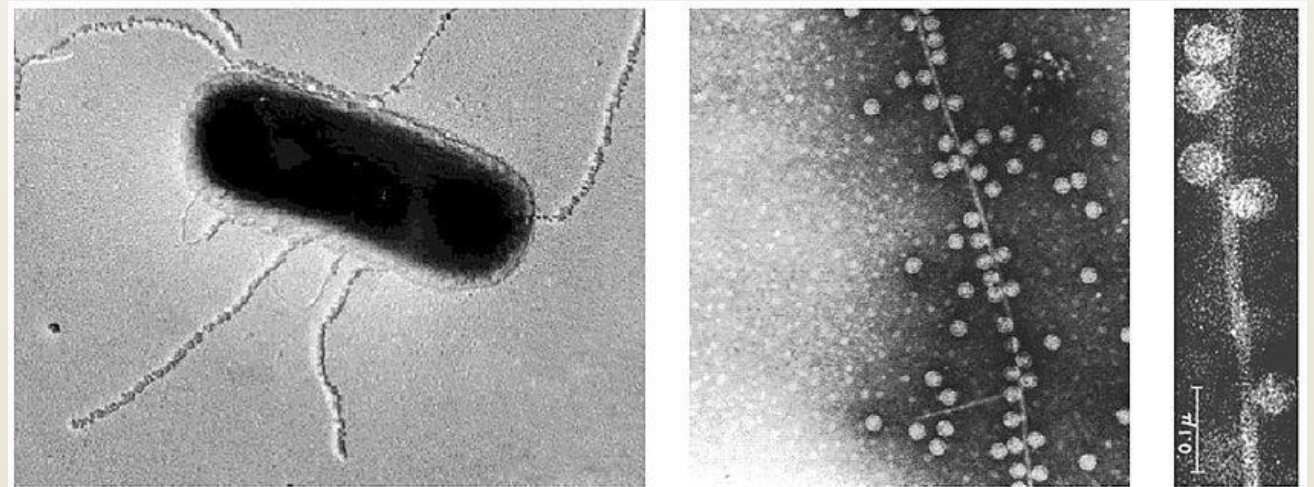
- Indicateur bactérien réglementé *E coli* non adapté pour estimer risque viral

(Bosch, 1998)

- Bactériophages ARN F spécifiques (FRNAPH) :

- Proche en terme de morphologie et cinétique de survie des Norovirus
- détection dans l'eau confrontée à des limites (sans étape de concentration)

(Hartard et al, 2016)



# Vers de nouveaux outils pour estimer le risque viral ?

[2]

- Détection complexe des virus dans l'eau sans étape de concentration

(Morin et Picoche, 2008)

- Indicateurs de contamination fécale

(Jofre, 2007)

- Indicateur bactérien réglementé *E coli* non adapté pour estimer risque viral

(Bosch, 1998)

- Bactériophages ARN F spécifiques (FRNAPH) :

- Proche en terme de morphologie et cinétique de survie des Norovirus
- détection dans l'eau confrontée à des limites (sans étape de concentration)

(Hartard et al, 2016)

- *Dreissena polymorpha* : détection contamination chimique et biologique

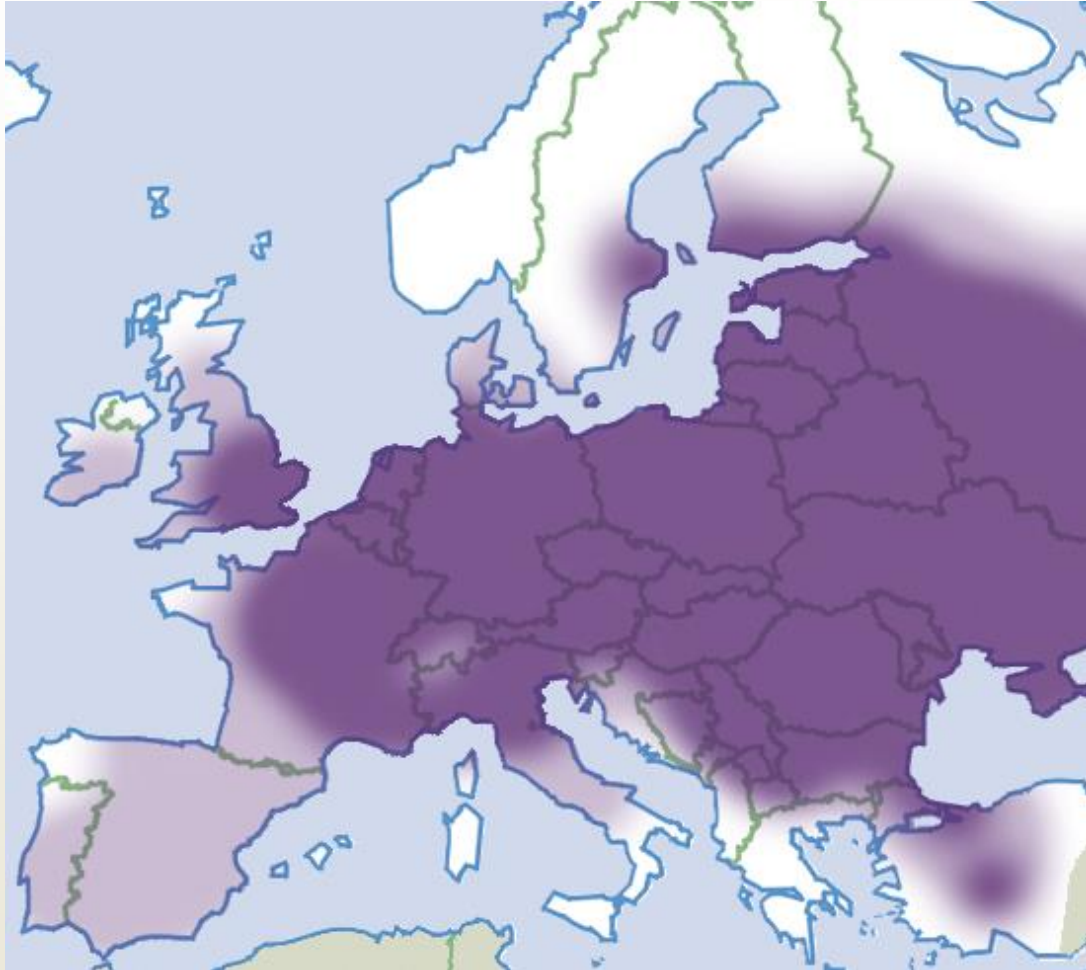
(Mezzanotte et al, 2016 ; Lý et al, 1997)



*Dreissena polymorpha* [3]

**Objectif** : évaluer la pertinence de la dreissène comme bio-intégrateur des FRNAPH et comme outil de diagnostic afin d'améliorer l'évaluation du risque viral des masses d'eau douces

# Matériel biologique et technique utilisés



## CARTE D'IDENTITÉ D'ESPÈCE



Nom : *Dreissena polymorpha*

Taille : 4 cm max

Durée de vie : 5 ans max

Origine : Mer Caspienne/ Mer Noire

Biotope : sessile, en groupes dans eaux stagnantes/rivières (profondeur max 50m)

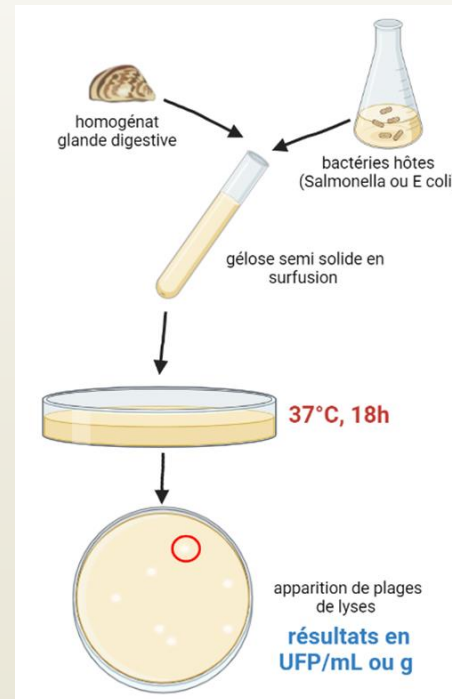
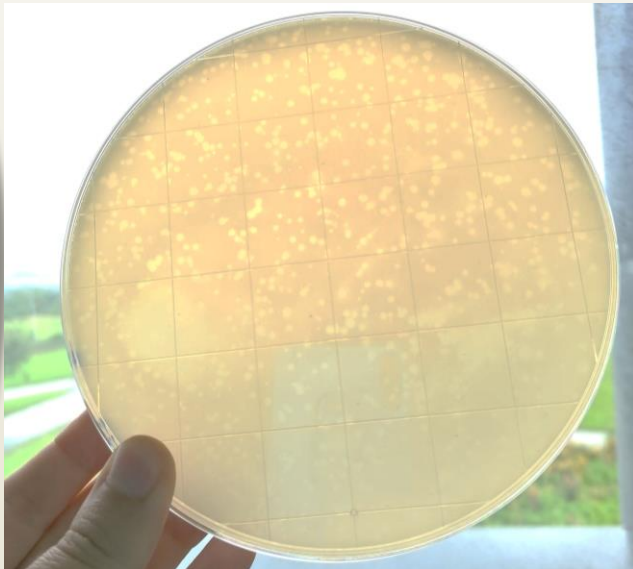
Nourriture : algues en suspension

Reproduction : juin à octobre

DREI SSENAPOLYMORPHA<<<<<<MOULE ZEBREE

# Matériel biologique et technique utilisés

- Espèce modèle : *Dreissena polymorpha* (taille > 20mm)
- Échantillons : 3 pools de 20 glandes digestives (organe d'intérêt chez les bivalves marins)
- FRNAPH modèle : génogroupes I (MS2) et II (GA)
- Méthode d'analyse : technique double couche d'agar : ISO 10705-1 appliqué aux bivalves (CEFAS, 2007) ⇒ énumération des phages infectieux



## CARTE D'IDENTITÉ D'ESPÈCE



Nom : *Dreissena polymorpha*

Taille : 4 cm max

Durée de vie : 5 ans max

Origine : Mer Caspienne/ Mer Noire

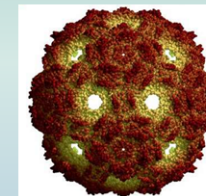
Biotope : sessile, en groupes dans eaux stagnantes/rivières (profondeur max 50m)

Nourriture : algues en suspension

Reproduction : juin à octobre

DREISSENAPOLYMORPHA<<<<<<MOULEZEBREE

## CARTE D'IDENTITÉ D'INDICATEUR DE LA CONTAMINATION VIRALE



Nom : *Bactériophages ARN F spécifiques*

Origine : contamination fécale

Taille : 20 à 30 nm de diamètre

Génogroupes : I (MS2); II (GA); III (Qb), IV (FI)

Conditions de multiplication: par attachement au pili F de certaines bactéries (min 30°C)

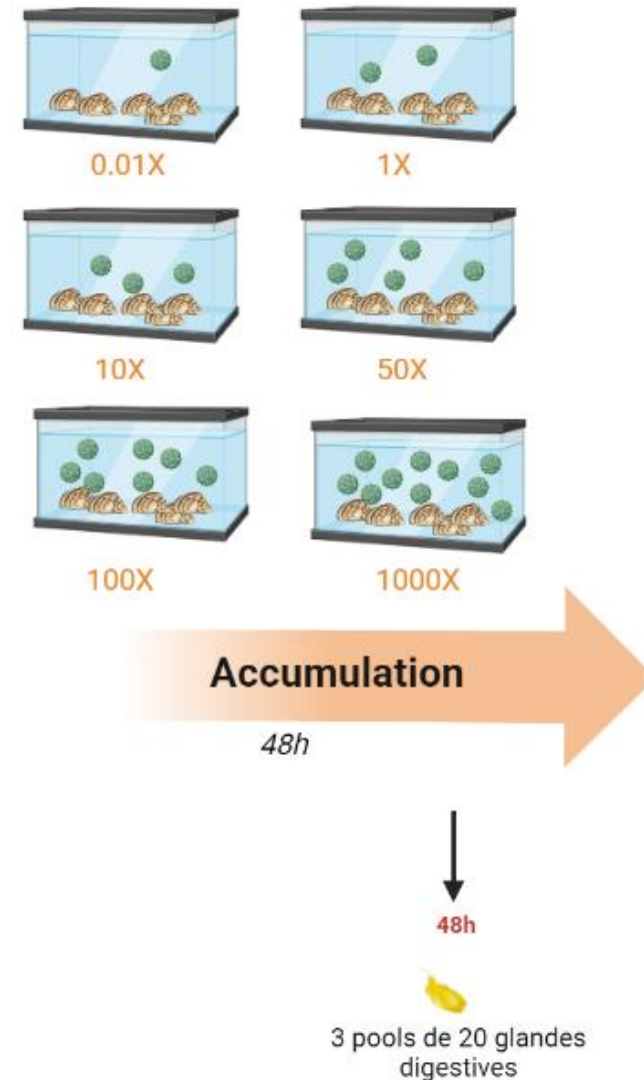
Détection : ISO 10705-1, technique de la double couche d'agar

BACTERIOPHAGESARNFSPECIFIQUE<<<<<FRNAPH

# Q1 : La dreissène accumule-t-elle les phages de façon représentative au niveau d'exposition ?

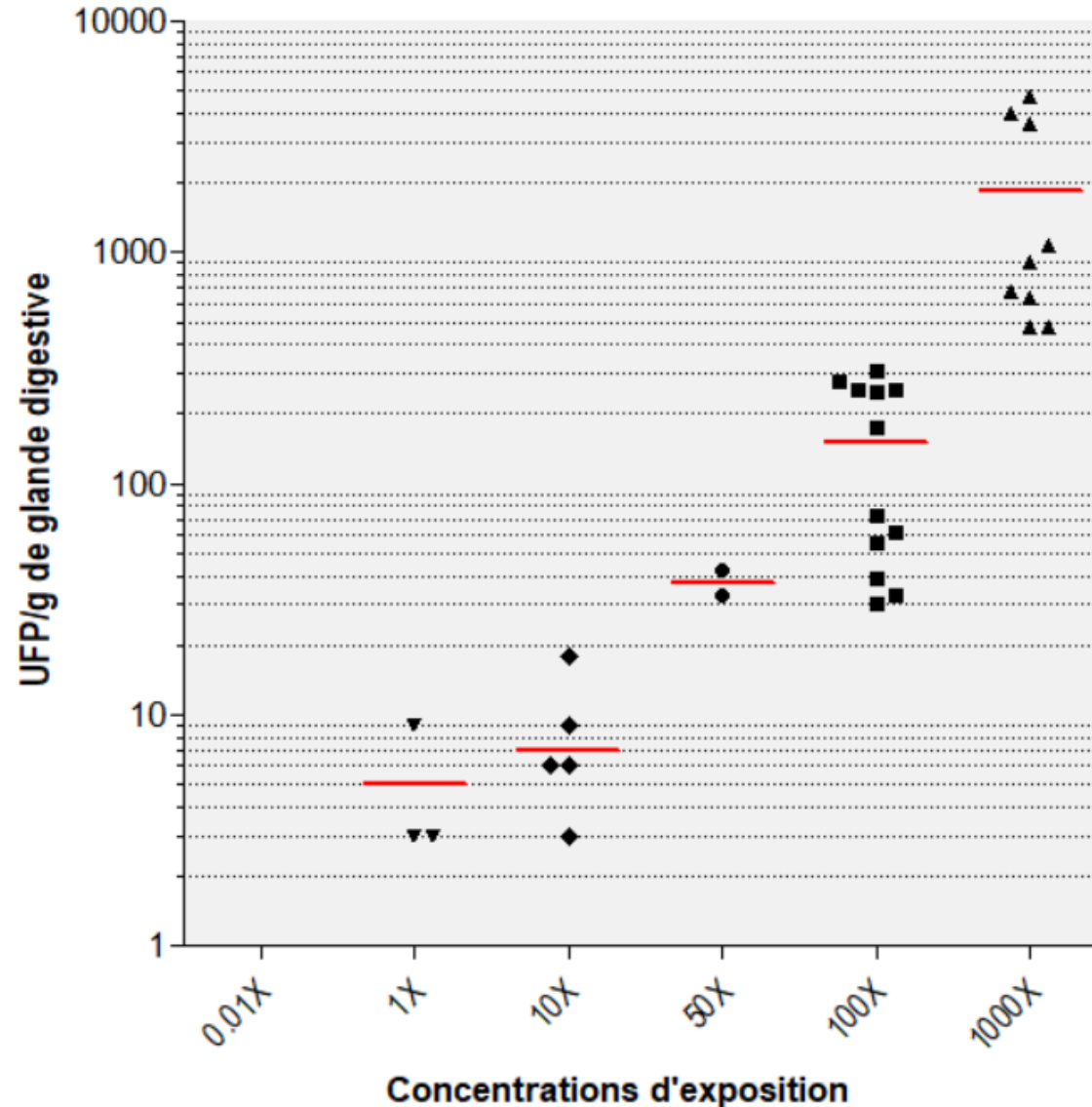
- Plusieurs expositions courtes de 48h (Capizzi Banas et al 2021) à différentes concentrations représentatives de l'environnement
- 1000X est 100 fois < concentrations dans eaux usées brutes (Havelaar et al, 1993)

solution	Concentration moyenne d'exposition : théorique ou réelle (mesurée) dans l'eau
0,01X	0,05 UFP/mL
1X	5 UFP/mL
10X	~ 10 UFP/mL
50X	~ 50 UFP/mL
100X	~ 10 <sup>2</sup> UFP/mL
1000X	~ 10 <sup>3</sup> UFP/mL



# Q1 : La dreissène accumule-t-elle les phages de façon représentative au niveau d'exposition ?

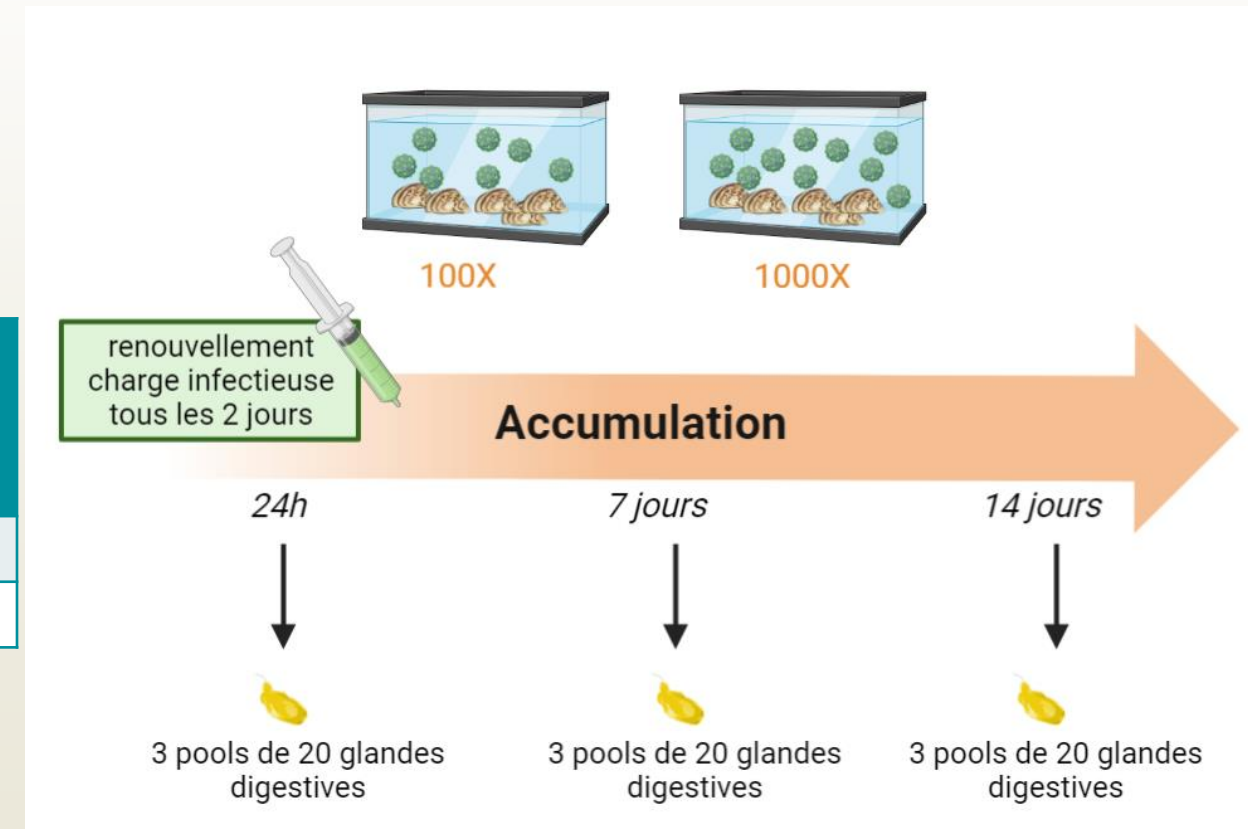
- ➔ **Accumulation rapide** : en 48h comme démontré par Capizzi Banas et al, 2021
- ➔ Accumulation **proportionnelle à la concentration d'exposition** : présence d'un gradient



## Q2 : En combien de temps la dreissène concentre-t-elle les FRNAPH infectieux en équilibre avec la concentration dans son milieu d'exposition ?

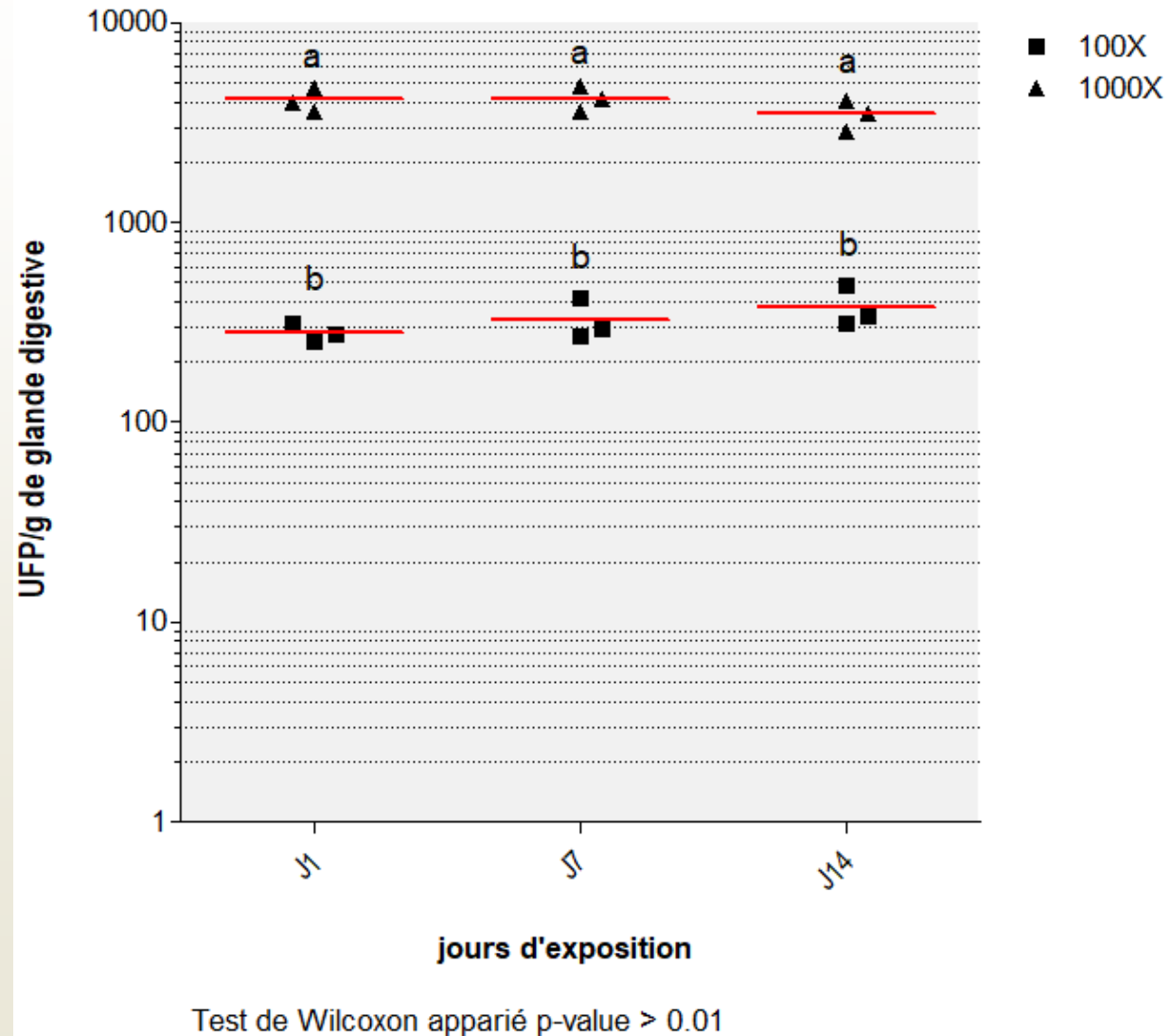
- Exposition longue de **14 jours**
- 2 fortes concentrations : 100X et 1000X
- Renouvellement du milieu (eau + charge en phages infectieux) **tous les 2 jours**
- Mesure des phages infectieux dans les dreissènes à J1, J7 et J14

solution	Concentration moyenne d'exposition
100X	$\sim 10^2$ UFP/mL
1000X	$\sim 10^3$ UFP/mL



## Q2 : En combien de temps la dreissène concentre-t-elle les FRNAPH infectieux en équilibre avec la concentration dans son milieu d'exposition ?

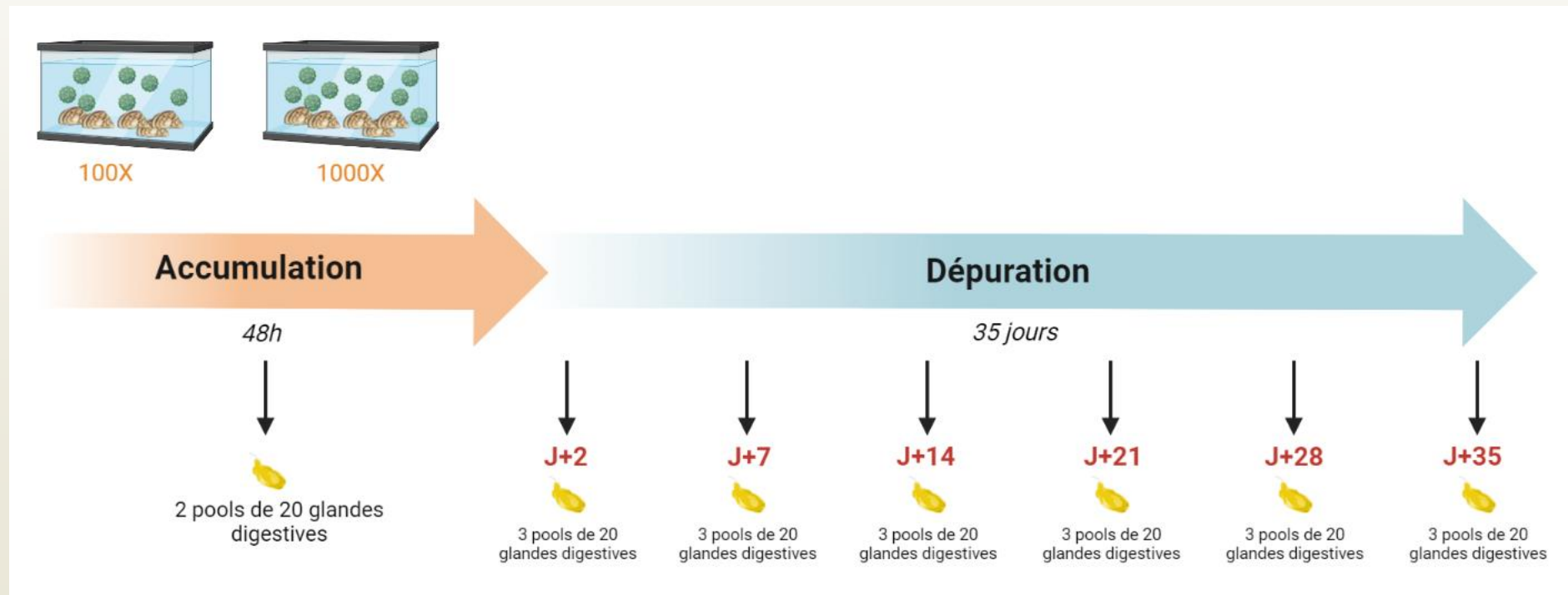
- ➔ Mise à l'équilibre rapide : 24h
- ➔ Accumulation dépendante de la dose d'exposition
- ➔ Concentration stable dans le temps (pas de différence significative)



# Q3 : Quelle est la cinétique de dépuración des FRNAPH infectieux chez la dreissène ?

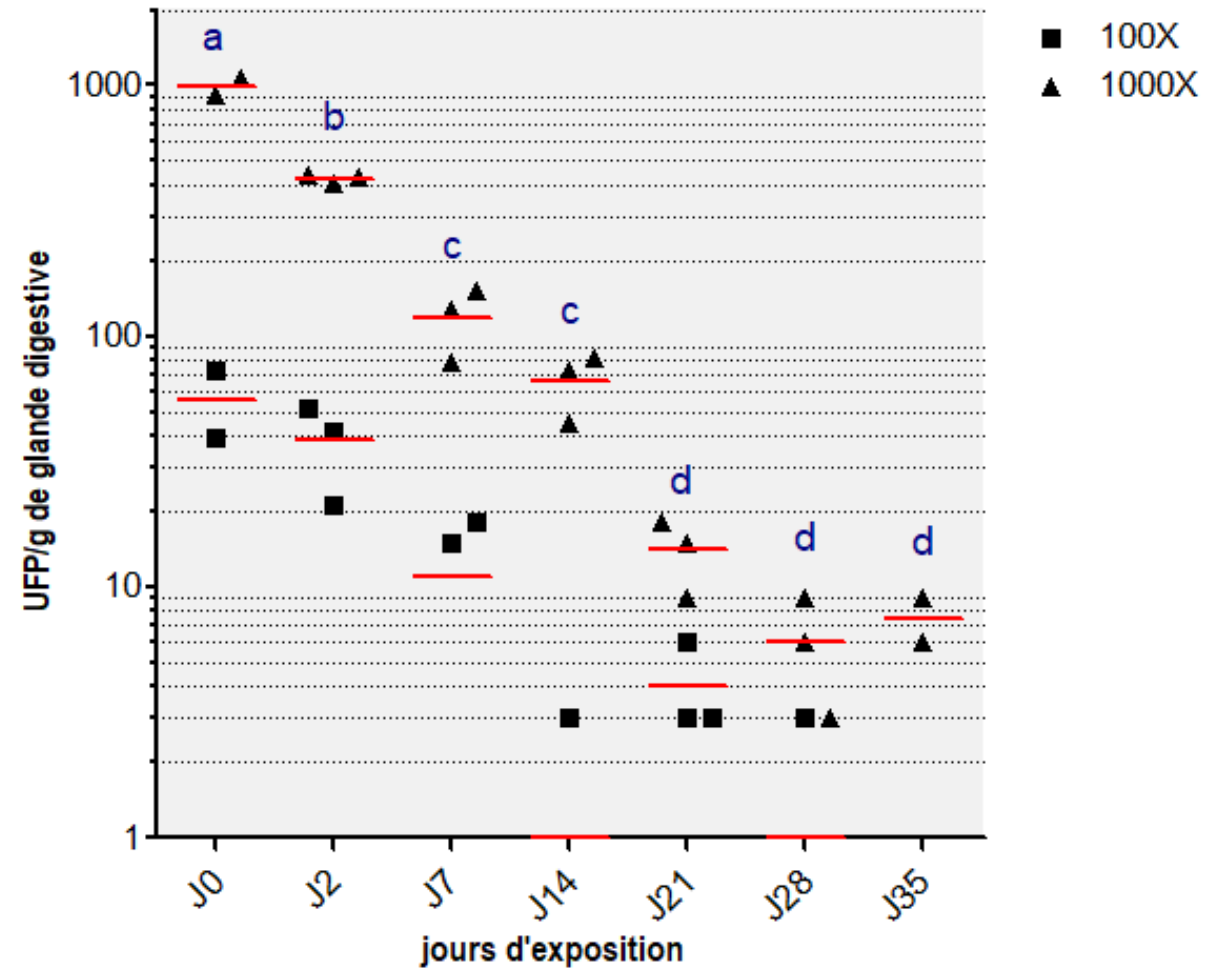
- Exposition courte de 48h
- 2 fortes concentrations : 100X et 1000X
- Mesure des phages infectieux dans les dreissènes : 48h après exposition; J2, J7, J14, J21, J28 et J35 après mise en dépuración

solution	Concentration moyenne d'exposition
100X	$\sim 10^2$ UFP/mL
1000X	$\sim 10^3$ UFP/mL



# Q3 : Quelle est la cinétique de dépuration des FRNAPH infectieux chez la dreissène ?

- Organismes reflètent la charge d'exposition
- Phase de dépuration lente par rapport à phase d'accumulation rapide (48h) : plusieurs jours
- Dreissènes capables de conserver la charge infectieuse dans le temps dépendamment de la dose d'exposition



Test de Wilcoxon apparié 1000X p-value < 0.01

# Q4 : Qu'observe-t-on quand la dreissène est exposée *in situ* à différents sites le long de la Seine ?

► Encagements dreissènes « free phages » : 3 semaines sur 5 sites, 3 cours d'eau (Ile de France):

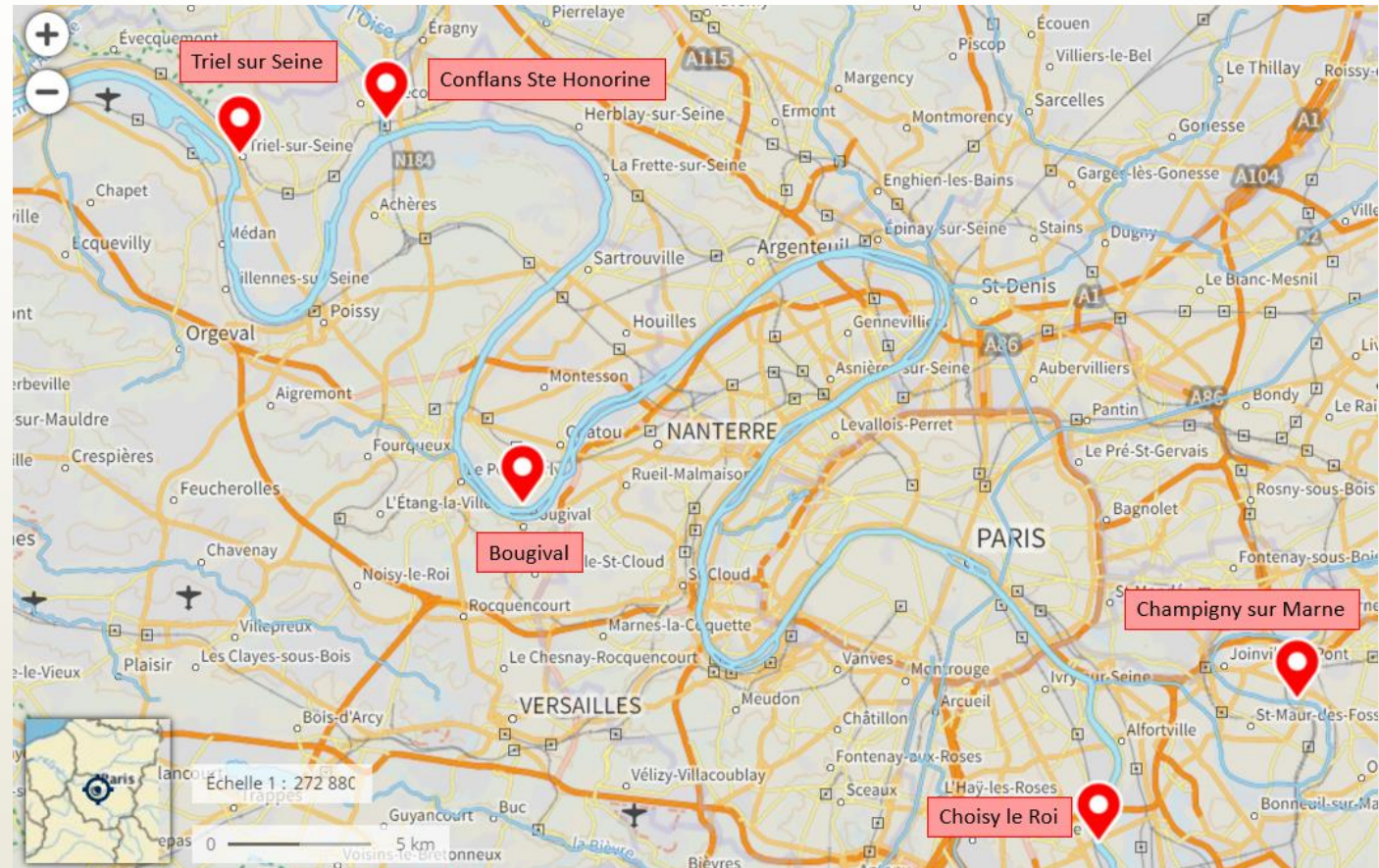
► La Marne

► L'Oise

► La Seine

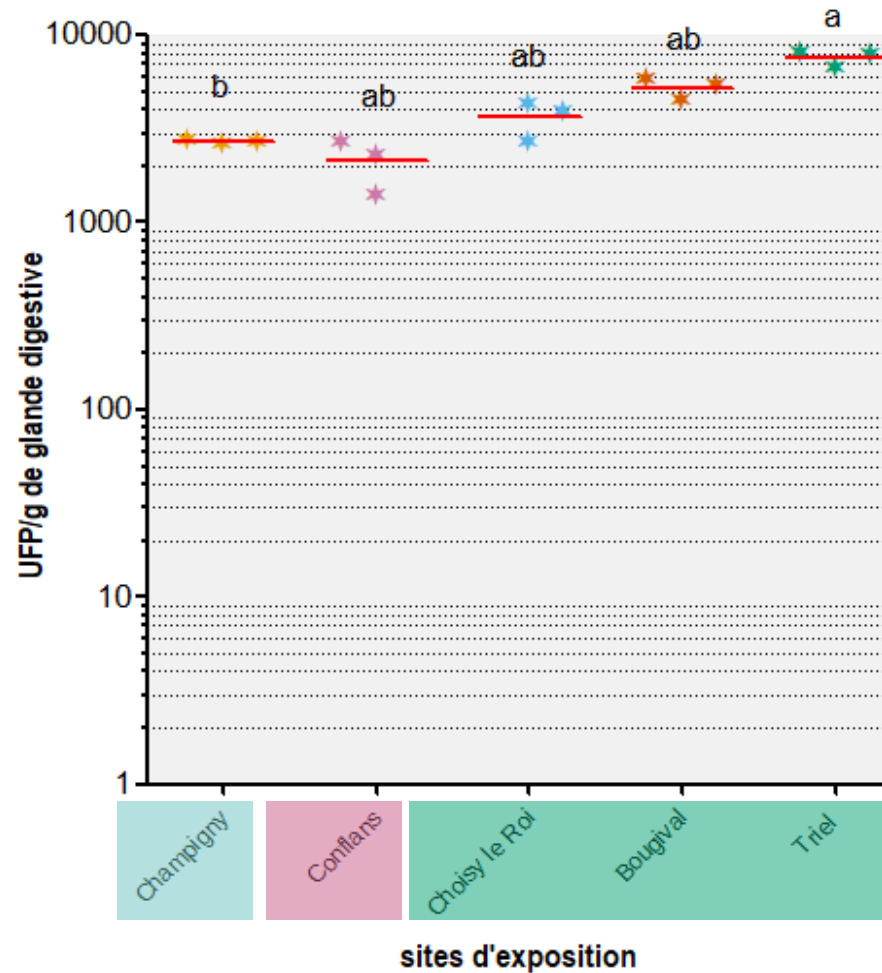
► Période : octobre 2021

	Champigny sur Marne	Choisy le Roi	Bougival	Conflans Ste Honorine	Triel
Bougival	58,6 km	52 km			
Conflans Ste Honorine	81,6 km	75 km	23 km		
Triel	94,6 km	88 km	36 km	13 km	

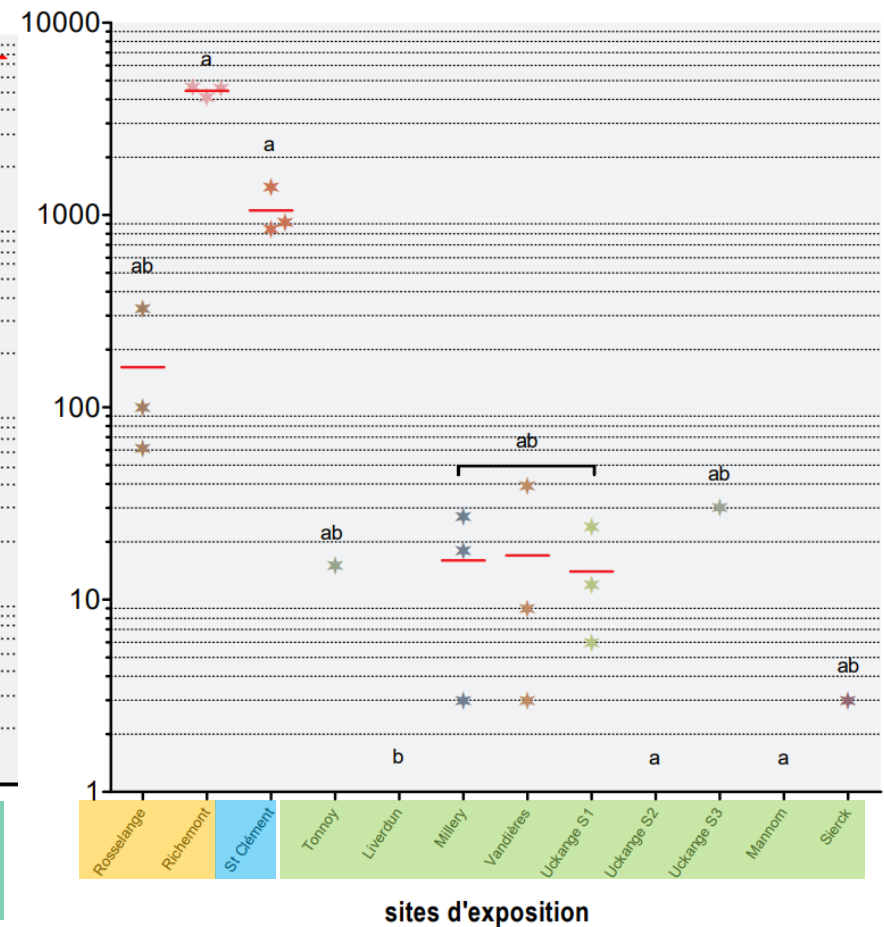


# Q4 : Qu'observe-t-on quand la dreissène est exposée *in situ* à différents sites le long de la Seine ?

- Seine très chargée en FRNAPH infectieux
- Apports des affluents Marne et Oise non négligeable
  - Comparaison sites du projet Bioessai (même méthode et même période)
  - Variabilité des résultats selon les sites : amplitude des concentrations très différentes



Kruskal Wallis p-value =  $2.915 \times 10^{-6}$



Kruskal Wallis p-value = 0.0004235

n=3

# Combo dreissènes/phages : un outil prometteur ?

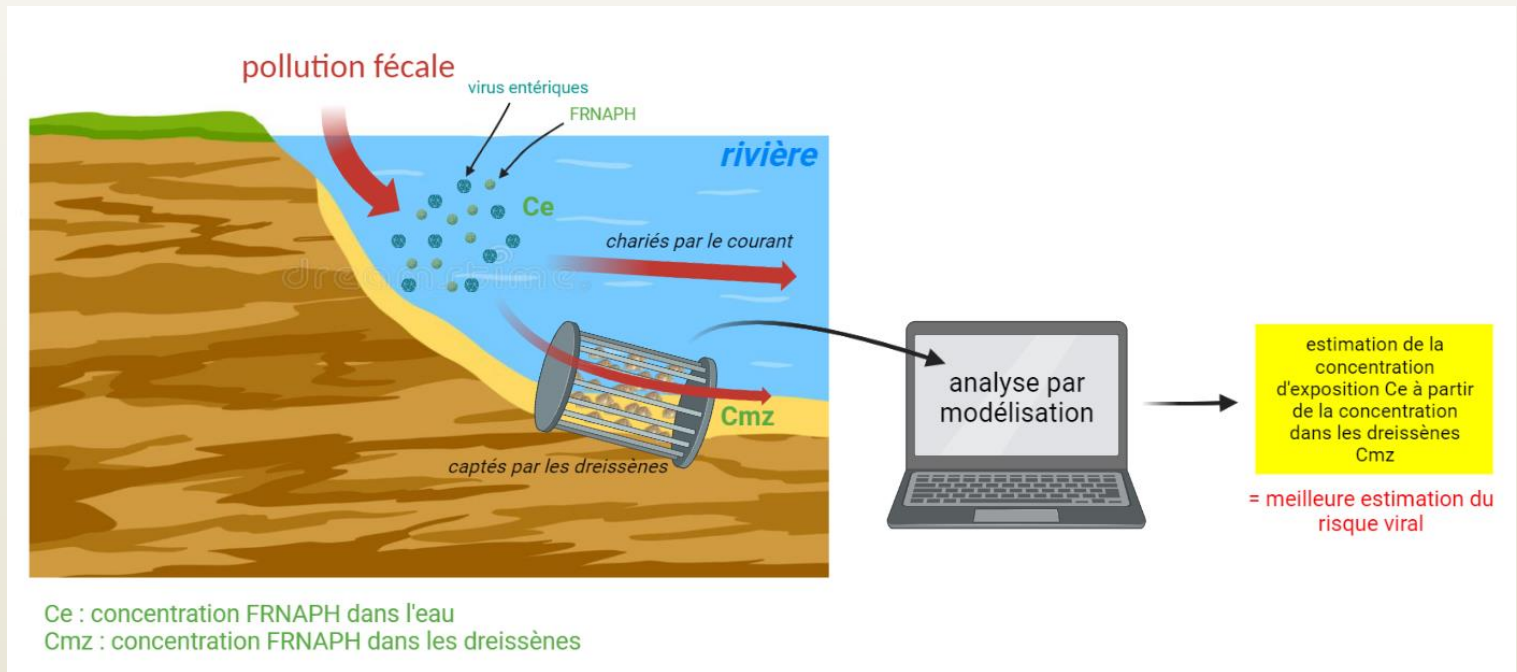
- *Dreissena polymorpha* capable d'accumuler FRNAPH infectieux en conditions laboratoire et terrain
- **Accumulation rapide** des FRNAPH infectieux (en laboratoire) : **en 48h** comme montré par *Capizzi Banas et al, 2021*
- Charge infectieux de FRNAPH **intégrée dans le temps** par la dreissène en conditions laboratoire et terrain



*Dreissena polymorpha* : outil pertinent pour une meilleure détection et suivi des indicateurs FRNAPH présents dans l'eau

# Vers une meilleure estimation du risque viral des masses d'eau

- Plus d'expositions en conditions contrastées
- Recherche du **génom**e de FRNAPH : **source tracking**
- Recherche du **génom**e de Norovirus : corrélation entre la présence du pathogène et de l'indicateur
- Proposer un modèle reflétant lien charge FRNAPH dans dreissènes/niveau de contamination de l'eau : intérêt **Biosurveillance**



# Merci de votre attention

<https://www.lafranceagricole.fr/la-tete-ailleurs/coblence-entre-rhin-et-moselle-1,0,438779829.html>

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Meurthe\\_\(rivi%C3%A8re\)#/media/Fichier:Neige34\\_IMG.JPG](https://fr.wikipedia.org/wiki/Meurthe_(rivi%C3%A8re)#/media/Fichier:Neige34_IMG.JPG)

[https://www.researchgate.net/figure/Bacteriophages-ARN-F-specifiques-adheres-a-la-surface-des-pili-sexuels-dune-bacterie\\_fig4\\_324583936](https://www.researchgate.net/figure/Bacteriophages-ARN-F-specifiques-adheres-a-la-surface-des-pili-sexuels-dune-bacterie_fig4_324583936)

Ackerman, J. D. (1999). Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*): implications for trophic dynamics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(9), 1551-1561.

Blatchley III, E. R., Gong, W. L., Alleman, J. E., Rose, J. B., Huffman, D. E., Otaki, M., & Lisle, J. T. (2007). Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. *Water Environment Research*, 79(1), 81-92.

Bosch, A. (1998). Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *Int Microbiol*, 1(3), 191-6.

Capizzi-Banas, S., Palos Ladeiro, M., Bastien, F., Bonnard, I., Boudaud, N., Gantzer, C., & Geffard, A. (2021). The Utility of *Dreissena polymorpha* for Assessing the Viral Contamination of Rivers by Measuring the Accumulation of F-Specific RNA Bacteriophages. *Water*, 13(7), 904.

CEFAS, 2007. Enumeration of Male-Specific RNA Bacteriophages in Bivalve Molluscan Shellfish. Weymouth, UK.

Hartard, C., Banas, S., Loutreul, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., & Gantzer, C. (2016). Relevance of F-specific RNA bacteriophages in assessing human norovirus risk in shellfish and environmental waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5709-5719.

Havelaar, A. H., Van Olphen, M., & Drost, Y. C. (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in freshwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 2956-2962.

Jofre, J. (2007). Indicators of waterborne enteric viruses. *Perspectives in Medical Virology*, 17, 227-249.

Le Guyader, F. S., Ollivier, J., Le Saux, J. C., & Garry, P. (2014). Les virus entériques humains et l'eau. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2014(459), 41-49.

Lý, K. T. Q., Tin, C. N. T., Hàng, T. C. N., Marketing, K. D., Bản, B. M. V., Cáo, L. V. B., ... & Mềm, K. N. (1997). Intestinal Fish Parasites as Heavy Metal Bioindicators: A Comparison Between *Acanthocephalus lucii* (Palaeacanthocephala) and the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*-Ngu Nghiep. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 59, 14-21.

Mezzanotte, V., Marazzi, F., Bissa, M., Pacchioni, S., Binelli, A., Parolini, M., ... & Radaelli, A., 2016. Removal of enteric viruses and *Escherichia coli* from municipal treated effluent by zebra mussels. *Science of the Total Environment*, 539, 395-400.

Morin, T., & Picoche, B. (2008). Virus entériques: connaissances actuelles et moyens de maîtrise dans l'industrie agro-alimentaire. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 161(2), 111-118.