



**HAL**  
open science

## Développement d'un nouvel outil de concentration et de quantification de SARS-CoV-2 dans les eaux usées

Ghina El Soufi, Jeanne van Assche, Thomas Loustau, Christian Schwartz, Dominique Trebouet, Olivier Rohr, Maud Villain-Gambier, Clémentine Wallet

### ► To cite this version:

Ghina El Soufi, Jeanne van Assche, Thomas Loustau, Christian Schwartz, Dominique Trebouet, et al.. Développement d'un nouvel outil de concentration et de quantification de SARS-CoV-2 dans les eaux usées. CNRIUT 2023 Saint Pierre - La Réunion, Jun 2023, Saint Pierre (La Réunion), France. hal-04364118

**HAL Id: hal-04364118**

**<https://hal.science/hal-04364118v1>**

Submitted on 26 Dec 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

---

## Développement d'un nouvel outil de concentration et de quantification de SARS-CoV-2 dans les eaux usées

---

Ghina El Soufi<sup>1,2,3</sup> Jeanne Van Assche<sup>1,2</sup> Thomas Loustau<sup>1,2</sup>  
Christian Schwartz<sup>1,2</sup> Dominique Trebouet<sup>1,3</sup> Olivier Rohr<sup>1,2</sup>  
Maud Villain-Gambier<sup>1,3</sup> Clémentine Wallet<sup>1,2</sup>

ghina.elsoufi@unistra.fr      jvanassche@unistra.fr      thomas.loustau@unistra.fr  
christian.schwartz@unistra.fr      dominique.trebouet@unistra.fr      olivier.rohr@unistra.fr  
maud.villain@unistra.fr      clementine.wallet@unistra.fr

<sup>1</sup> IUT Louis Pasteur, Université de Strasbourg

<sup>2</sup> Laboratoire DHPI, UR 7292, Université de Strasbourg

<sup>3</sup> IPHC – CNRS – UMR 7178, Université de Strasbourg

**Thèmes** – *Biologie - Santé – Environnement - Bioprocédés*

**Résumé** – *La surveillance de la circulation du SARS-CoV-2 dans les eaux usées a démarré dès le début de la pandémie d'une façon exploratrice en France et dans de nombreux pays du monde. Cette surveillance permet de détecter et de suivre la propagation du virus au sein d'une population indépendamment des stratégies de dépistages. Cependant, les protocoles utilisés ne permettent pas de quantifier le contenu viral des eaux lorsque celui-ci va décroître. Le laboratoire DHPI en collaboration avec l'équipe RePSeM de l'IPHC ont élaboré une nouvelle méthode de concentration et de quantification de SARS-CoV-2 dans les eaux usées. Cette méthode peu coûteuse permet déjà de concentrer 40 fois le virus (de  $9,3 \cdot 10^2$  à  $3,8 \cdot 10^4$  d'ARN extrait en moyenne en fonction des échantillons) par rapport à la technique d'extraction classique. L'optimisation de ce protocole est encore en évolution dans le but d'obtenir un meilleur rendement (concentration de 100 fois). Les rendements varient beaucoup en fonction des stations d'épuration et des prélèvements. Une analyse plus approfondie de la composition des eaux est prévue afin de mieux comprendre les différences de taux de récupération de virus potentiellement impactés par la composition des eaux usées.*

**Mots-Clés** – *SARS-CoV-2, eaux usées, ultrafiltration, membranes*

## 1 Introduction

Au cours des dernières décennies, le nombre de nouveaux virus pathogènes humains a fortement augmenté[1]. En décembre 2019, une épidémie liée à un nouveau coronavirus (SARS-CoV-2) a été signalée en Chine, et s'est rapidement propagée dans le monde entier.

Les tests de dépistage réalisés par les patients permettent d'avoir une image limitée et sous-estimée de l'épidémie. En effet, cette stratégie ne permet pas de prendre en compte les personnes asymptomatiques et pré-symptomatiques dont la contagiosité est établie et qui contribueraient à près de la moitié des contaminations[2].

La quantification du SARS-CoV-2 dans les eaux usées représente un outil alternatif permettant une évaluation plus globale, moins cher et fiable de la circulation du virus au sein d'une population. La plupart des protocoles utilisés pour la surveillance de SARS-CoV-2 dans les eaux usées se basent sur des extractions virales à partir des petits volumes d'échantillons. Ces protocoles ne permettent pas de quantifier le virus lorsque celui-ci est présent en faible quantité (ralentissement épidémique, dilution des eaux usées à cause de la pluviométrie etc.). De plus, l'identification par séquençage de différents variants génétiques viraux demande une certaine quantité et qualité de matériel génétique. Ainsi, il y a besoin de mettre en place un protocole de quantification du virus plus sensible, qui sera également utilisé pour suivre l'émergence de variants, et quantifier le SARS-CoV-2 dans les eaux d'entrée de station d'épuration, mais aussi à la sortie, ainsi que dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Il existe plusieurs méthodes de concentration virale décrites dans la littérature : ultrafiltration, précipitation au polyéthylène glycol, floculation, utilisation des membranes électro-négatives etc. Ces méthodes varient considérablement en termes de coût et d'accessibilité aux réactifs[3]. De plus, il a été démontré que certaines méthodes standards sont inefficaces pour récupérer les virus enveloppés à partir d'échantillons d'eaux environnementales[4].

Dans le cas du SARS-CoV-2, il n'existe pas de méthodologie standard mise au point pour sa quantification et sa détection. Les protocoles varient selon le volume ou le type d'échantillon, les conditions de stockage, la méthode de concentration, ou la méthode d'extraction d'ARN.

Dans cette étude, nous avons mis en œuvre un nouveau protocole de concentration et de quantification du SARS-CoV-2 à partir des volumes des 500 mL d'eaux usées.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Échantillons d'eaux usées

Les échantillons d'eaux usées sont prélevés sur 24 heures en entrée des stations d'épuration et conservés à 4°C. Notre laboratoire reçoit des échantillons de 11 stations différentes chaque semaine.

### 2.2 Concentration de SARS-CoV-2

Une étape de concentration par ultrafiltration frontale est effectuée avant de quantifier le virus dans les échantillons (figure 1). L'eau usée est concentrée grâce à un système Amicon® et une membrane de cellulose dont le seuil de coupure est de 10 kDa. Ce système permet de concentrer les particules virales présentes dans 500 mL d'eau usée brute en 5 mL. Le rétentât contenant les virus concentrés est récupéré et soumis ensuite à l'extraction virale.

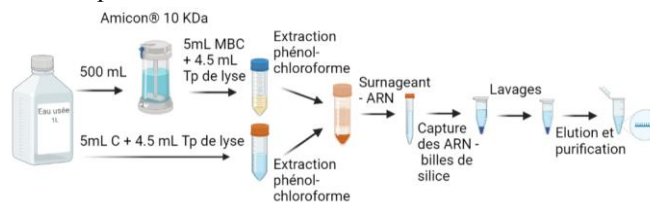


Figure 1 - Schéma du protocole expérimental

### 2.3 Extraction et purification de l'ARN viral

Ce protocole (figure 1) permet d'extraire l'ARN viral : le génome du SARS-CoV-2 à partir d'un échantillon de 5 mL d'eau usée brute (C) et/ou concentré par ultrafiltration (MBC). Ce volume de 5 mL est lysé avec un tampon composé de thiocyanate de guanidium. Une première étape de purification au phénol/chloroforme permet de se débarrasser des matières en suspension, ainsi que de la plupart des protéines et membranes cellulaires. Une deuxième étape de purification par capture des ARN sur billes de silice est ensuite réalisée. Les ARN sont enfin élués puis purifiés sur colonnes spécifiques afin d'éliminer les molécules pouvant inhiber et gêner la méthode de quantification par RT-qPCR. On passe ainsi d'un volume de 500 mL d'eau usée, à un volume de 100 µL d'ARN purifiés.

### 2.4 RT-qPCR

La RT-qPCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétro-transcrit grâce à une enzyme appelée la transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Cette rétro-transcription est suivie ensuite par une étape d'amplification d'ADN en présence des amorces et une sonde spécifique. L'amplification se déroule en présence des molécules fluorescentes dont la fluorescence augmente proportionnellement au nombre de molécules d'ADN.

### 3 Résultats

Nous avons effectué des concentrations d'eaux usées de la semaine 5 à la semaine 40 de 2022 sur 4 stations différentes. La figure 2 représente les quantités des ARN du SARS-CoV-2 extraits et quantifiés par RT-qPCR pour des échantillons d'eaux usées brutes (symbole carré bleu) et les échantillons correspondants concentrés par ultrafiltration (symbole circulaire orange). Nous avons obtenu en moyenne 41 fois plus d'ARN viral dans nos échantillons concentrés que dans les échantillons bruts ( $9,3.10^2 \pm 1,8.10^2$  d'ARN extrait en moyenne pour les échantillons C, et  $3,8.10^4 \pm 8,2.10^3$  pour les échantillons MBC).

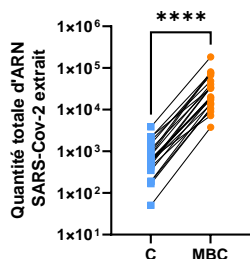


Figure 2 - La quantité totale d'ARN SARS-CoV-2 extrait augmente en moyenne 41 fois entre la fraction d'eau usée brute (C) et la fraction concentrée par ultrafiltration (MBC).

Ce qui signifie que nous avons réussi à enrichir les échantillons en ARN viral grâce à l'étape de concentration par ultrafiltration (Amicon® 10 kDa), toutefois sans atteindre l'enrichissement théorique optimal qui correspond à 100 fois. De plus nous observons une très forte disparité dans notre rendement de concentration. Les eaux usées ont des compositions très variables en fonction des zones et des infrastructures auxquelles elles sont connectées. Le rendement de récupération peut être impacté par la nature des eaux usées. La figure 3 montre le taux de récupération du SARS-CoV-2 pour différents échantillons prélevés de 4 stations d'épuration pendant différentes semaines.

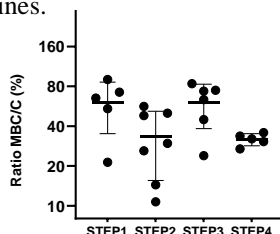


Figure 3 - Le taux de récupération du virus exprimé en ratio MBC/C (%) est variable d'une semaine à l'autre. Représentation pour des eaux prélevées de 4 stations d'épuration différentes.

Les taux sont variables selon les stations (61% en moyenne pour la STEP1, 34% pour STEP2, 61% pour STEP3 et 32% pour STEP4). Ces taux sont également variables en fonction des semaines pour une même STEP (écart-type de 26% pour STEP1, 18% pour STEP2, 22%

pour STEP3 et 3% pour STEP4). Nous avons effectué des tests de répétabilité de la méthode sur une même eau provenant de la même station. Nos résultats montrent une bonne répétabilité de notre système : concentration / purification / quantification (résultats non montrés ici). Nous pouvons supposer que d'autres facteurs influencent le taux de récupération du virus (pluviométrie, température extérieure, rejet saisonnier industriel ou agricole etc.), même si des tendances se dessinent pour certaines stations (notamment la STEP4). Pour arriver à normaliser notre technique et à la rendre quantitative, une étude est en cours pour déterminer quels paramètres physico-chimiques de l'eau usée peuvent influencer ce rendement.

### 4 Conclusions

En conclusion, nous avons mis en place un protocole permettant la détection et la quantification du SARS-CoV-2 dans les eaux usées. Ce protocole comprend trois étapes principales : Concentration par ultrafiltration (Amicon® 10 kDa), extraction de l'ARN du SARS-CoV-2 et enfin quantification de l'ARN extrait par RT-qPCR.

Concernant l'extraction de l'ARN, nous utilisons un protocole « home-made » spécifique à notre laboratoire, qui pourra être utilisé par la suite par d'autres laboratoires. Notre protocole a l'avantage d'être moins cher par comparaison aux kits commerciaux déjà existants sur le marché.

L'optimisation du protocole de la concentration et des conditions opératoires est encore en évolution dans le but d'obtenir le rendement optimal. Une analyse plus approfondie de la composition des eaux, telle que l'analyse de la composition ionique est prévue afin de mieux comprendre les différences de taux de récupération de virus potentiellement impactés par le contenu en espèces ioniques des échantillons.

### Références

- [1] K. Farkas, L. S. Hillary, S. K. Malham, J. E. McDonald, and D. L. Jones, "Wastewater and public health: the potential of wastewater surveillance for monitoring COVID-19," *Curr. Opin. Environ. Sci. Health*, vol. 17, pp. 14–20, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.coesh.2020.06.001.
- [2] X. He *et al.*, "Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19," *Nat. Med.*, vol. 26, no. 5, Art. no. 5, May 2020, doi: 10.1038/s41591-020-0869-5.
- [3] P. A. Barril *et al.*, "Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters," *Sci. Total Environ.*, vol. 756, p. 144105, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.144105.
- [4] M. Kitajima *et al.*, "SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs," *Sci. Total Environ.*, vol. 739, p. 139076, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139076.