

## Chapitre IV) Inactivation dans l'atmosphère des virus mise au point d'un nouveau réacteur et application au mengovirus murin

Ce chapitre donnera peut-être lieu à la publication d'une short-note :

Girardin G. et al. 2015. Inactivation of murin mengovirus and some human enteric viruses exposed to various atmospheric conditions.

IV.1.	INTRODUCTION .....	91
IV.2.	MATERIELS ET METHODES .....	95
IV.2.a.	<i>Le virus</i> .....	95
IV.2.b.	<i>Protocoles expérimentaux et plan d'expérience</i> .....	96
IV.2.b.i.	Le dispositif d'étude .....	96
IV.2.b.ii.	Protocole expérimental .....	98
IV.2.b.iii.	Plan d'expérience .....	99
IV.2.c.	<i>Modélisation des processus ; traitement des données expérimentales</i> .....	99
IV.2.d.	<i>Analyse de jeu de données expérimentales de la littérature</i> :.....	102
IV.3.	RESULTATS ET DISCUSSIONS .....	103
IV.3.a.	<i>Niveau initial d'inoculation des tubes ; tests d'homogénéité entre expériences</i> .....	103
IV.3.b.	<i>Evaluation du maintien des nombres de copies génomiques d'ARN viral</i> .....	104
IV.3.c.	<i>Inactivation des virus</i> .....	104
IV.3.d.	<i>Analyse des nombres de copies génomiques d'ARN viral</i> .....	109
IV.4.	CONCLUSION .....	111

### Résumé

Réutiliser les eaux usées en irrigation agricole aide à répondre aux besoins croissants d'eau, réduit leur décharge dans les eaux conventionnelles et participe à la fertilisation des sols. Les eaux usées d'origine domestique contiennent des virus entériques de l'homme responsables d'épidémies transmises par voies hydrique et alimentaire. Leur transmission aérienne avec maladie à la clé existe, et il a été montré récemment que des virus apportés au sol par irrigation pouvaient être aérosolisés. Plusieurs études ont traité de l'inactivation de virus soumis à diverses conditions atmosphériques, mais les résultats restent trop rares, spécifiques à chaque virus, et parfois difficiles à exploiter. Ce travail visait à évaluer l'inactivation du mengovirus murin soumis à diverses conditions atmosphériques, ainsi qu'à analyser quelques cinétiques d'inactivation accessibles dans la littérature. Nous avons conçu un réacteur atmosphérique permettant de contrôler la température et l'humidité relative de l'air, voire d'imposer une teneur en O<sub>3</sub> entrante et un rayonnement. Après comparaison de différents supports, des suivis expérimentaux ont été réalisés pour des mengovirus murins déposés au fond de tubes en polypropylène et exposés à diverses conditions de températures (15, 25 et 40°C), d'humidité relative (30, 50, 65 et 80 %), d'O<sub>3</sub> entrant (sans ou 300 ppb) et de rayonnement (sans ou avec). Pour chaque suivi, des tubes étaient prélevés à différentes dates et les virus remis en suspension dans un tampon de PBS pour dénombrement ultérieur des virus infectieux par comptage de plages de lyse et de leur ARN en RT-qPCR. Un modèle de dépendance du coefficient d'inactivation à l'humidité relative de l'air a été proposé et a permis une première analyse des données à 25°C sans rayonnement et sans O<sub>3</sub>. Travailler sur des supports en polypropylène a permis de récupérer ultérieurement tous les virus, pour des incubations sans rayonnement ni O<sub>3</sub>. A 25°C, l'inactivation est d'autant plus rapide que l'humidité relative de l'air est faible. A cette température, l'estimation du coefficient d'inactivation en fonction de l'humidité relative permet de refléter très approximativement les grandes tendances. Sa valeur maximale, entre 35 et 60 % d'humidité relative, correspondrait à un abattement de 3 log<sub>10</sub> en 16 minutes. L'extension des résultats à 15°C nécessiterait une prise en compte explicite d'effets « seuil », et ce probablement pour

la stabilité de la capsid dépendante des forces de cohésion intermoléculaires réduites par l'agitation thermique. Les coefficients d'inactivation calculés à partir des données publiées dans la littérature présentent, pour certains virus, le même type de dépendance à l'humidité relative de l'air avec des valeurs maximales toutefois plus faibles. Ils sont spécifiques à chaque virus ; pour certains virus, on peut avoir une dépendance à l'humidité très différente avec des maximums d'inactivation aux humidités fortes ou faibles.

**Mots clés :** réutilisation des eaux usées, irrigation, air, virus, inactivation

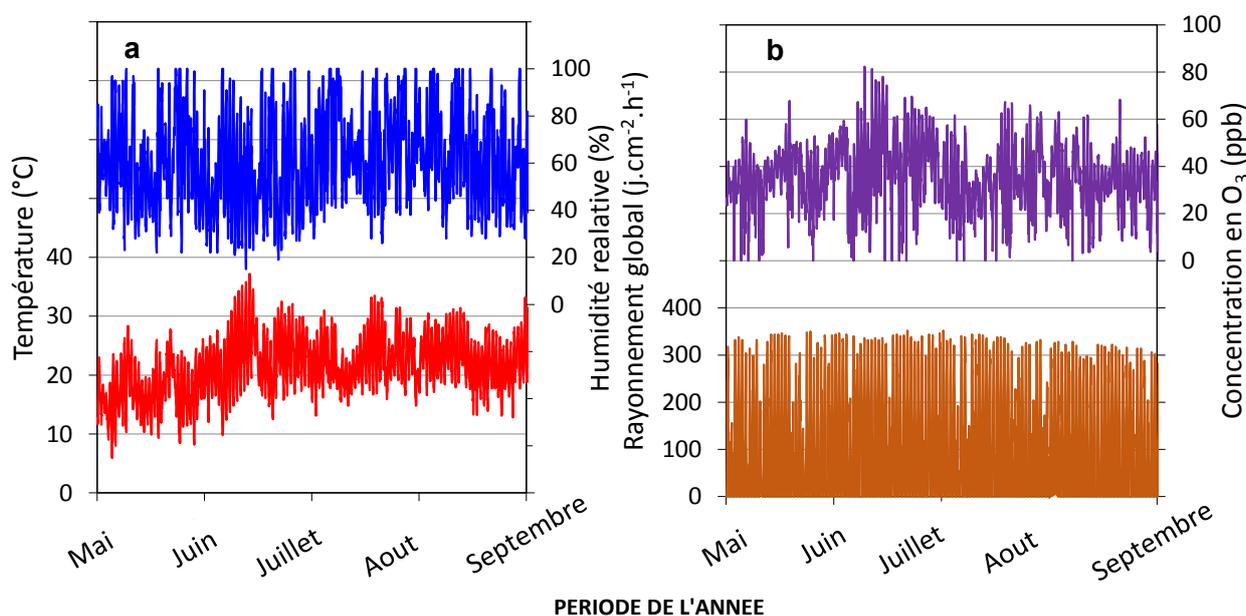
## IV.1. Introduction

A l'échelle planétaire, on assiste à des problèmes croissants de ressources en eau, en quantité et en qualité (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Ces problèmes résultent de l'accroissement de la population mondiale et de l'urbanisation (Qadir et al., 2010 ; Kennedy et al., 2012), du changement climatique planétaire (Bates et al., 2008 ; Bixio et al., 2006), de la diversification des usages de l'eau (Asano, 1998), de la surexploitation d'aquifères (Taylor et al., 2012 ; Giungato et al., 2010), et du déversement d'eaux usées insuffisamment traitées dans les eaux conventionnelles (Van der Bruggen, 2010). Déjà pratiquée dans certains pays (Renault et al., 2014 ; Bixio et al., 2008), la réutilisation d'eaux usées en irrigation permet d'exploiter cette ressource marginale, limite leur rejet dans l'environnement, et contribue à fertiliser les cultures (N, P ...) (Jiménez et al., 2010 ; Keraita et al., 2008 ; Ensink and van der Hoek, 2006). Elle présente toutefois des risques pour les productions agricoles, l'environnement et la santé (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Eu égard à la santé, les risques chimiques semblent secondaires au regard des risques microbiologiques pour les eaux usées d'origine domestique (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Les eaux usées brutes contiennent divers pathogènes, dont des virus entériques de l'homme (Pachepsky et al., 2011). Certains y sont systématiquement détectés, et leur abattement en station d'épuration est généralement faible en absence de traitement tertiaire adapté (La Rosa et al., 2010 ; Van den Berg et al., 2005). Ils sont de plus en plus souvent incriminés dans les épidémies d'origines hydrique (WHO, 2006 ; Reynolds, 2008 ; Craun et al., 2010) et alimentaire (Cook et D'Agostino, 2013). Les principaux virus incriminés sont les norovirus, les enterovirus (poliovirus, coxsackievirus, echovirus), les rotavirus, les adenovirus, et le virus de l'hépatite A (Rodríguez-Lázaro et al., 2012) ; et la commission du Codex Alimentarius a reconnu en 2012 que les virus entériques humains les plus fréquemment mentionnés comme responsables d'épidémies d'origine alimentaire sont le norovirus et le virus de l'hépatite A (CAC/GL 79-2012).

Apportés par les eaux usées lors d'irrigation, les virus entériques peuvent se déposer sur les parties aériennes des plantes ou à la surface du sol, être transportés dans le sol vers les racines des plantes, l'aquifère, atteindre des cours d'eau à proximité, ou être dispersés dans l'atmosphère. De nombreux travaux ont traité du devenir des virus dans le sol (Cao et al., 2010 ; Syngouna et Chrysikopoulos, 2010 ; Zhuang et Jin., 2008, parmi bien d'autres références), et quelques ont traité des possibilités d'internalisation de virus dans les plantes à partir des racines (DiCaprio et al., 2015 ; Hirneisen et Kniel, 2013 ; DiCaprio et al., 2012 ; Wei et al., 2011 et 2010 ; Urbanucci et al., 2009 ; Chancellor et al., 2006), ou d'attachement aux parties aériennes (Hirneisen et Kniel, 2013 ; Stine et al., 2005 ; Vega et al., 2005). En environnement intérieur, des contaminations *via* l'air par des virus entériques de l'homme avec symptômes à la clé ont été clairement démontrées au restaurant (Marks et al., 2000), à école (Marks et al., 2003) et en hôpital (Nenonen et al., 2014). Au niveau de la personne contaminée, le transfert peut alors combiner l'inhalation de virus, leur dépôt dans les voies respiratoires supérieures, et *in fine* leur déglutition avec le mucus des voies respiratoires (Nazaroff, 2011). *In situ*, la présence de virus entériques de l'homme dans l'air a été notée au voisinage des stations de traitement des eaux usées, en particulier pendant les épisodes venteux (Masclaux et al., 2014 ; Ziros et al., 2011 ; Fracchia et al., 2006 ; Carducci et al., 1995) et lors d'épandages de biosolides (Brooks et al., 2005). Nous avons montré très récemment que des virus déposés au sol pouvaient être remis en suspension dans l'atmosphère lors d'épisodes venteux (cf. chapitre III ; Girardin et al., 2015 sur le point d'être soumis). Un modèle d'évaluation quantitative des risques microbiens (QMRA), pour partie associé à une transmission

aérienne au champ, a été proposé par [Mara et al. \(2007\)](#), mais ce modèle ne prend pas explicitement en compte les phénomènes d'inactivation des virus après ré-aérosolisation.

On relie généralement l'inactivation des virus dans l'atmosphère à l'humidité relative de l'air et à sa température, aux rayonnements UV, et à l'O<sub>3</sub>. En Provence à Avignon pendant la saison où les agriculteurs irriguent, l'humidité relative de l'air peut osciller entre environ 20 % par temps sec et des valeurs proches de la saturation lors de pluies, d'orages ou d'irrigations ; les températures peuvent osciller entre environ 10 et 40°C (Figure IV.1a). De la même façon, le rayonnement solaire global arrivant au sol semble atteindre en journée 340 J.h<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup> avec des fluctuations liées aux alternances jour-nuit et à la présence d'épisodes nuageux ; la teneur en O<sub>3</sub> fluctue entre un peu moins de 10 ppb jusqu'à 80 ppb (Figure IV.1b).



**Figure IV.1 :** Données météorologiques pour Avignon (84, France) entre mai et août 2014. (a) Température et humidité relative de l'air sous abris au niveau du Domaine Saint-Paul de l'INRA ; (b) Concentration en O<sub>3</sub> au niveau de la mairie d'Avignon mesurée par le réseau AirPACA et rayonnement global au niveau de du Domaine Saint-Paul de l'INRA.

Les travaux relatifs à l'inactivation de virus entériques de l'homme ou de virus modèles exposés à différentes conditions atmosphériques ont été basés sur des suivis d'infectiosité de virus mis en suspension dans l'air par des nébuliseurs, des atomiseurs ou des pulvérisateurs plus classiques dans des réacteurs ouverts ([McDevitt et al., 2012](#) ; [McDevitt et al., 2007](#) ; [Walker et al., 2007](#) ; [Jensen, 1964](#)) ou fermés ([Zhao et al., 2012](#) ; [Liu et al., 2012](#) ; [Tseng et Li, 2006](#) ; [Ijaz et Sattar, 1985a et b](#) ; [Sattar et al., 1984](#) ; [Adams et al., 1982](#) ; [Mik et al., 1977](#) ; [Akers et al., 1973](#) ; [Akers et al., 1968](#) ; [De Jong et Winkler, 1968](#) ; [Akers et al., 1966](#)), ou après dépôt de très petites quantités de suspension virale sur des supports variés ([Bae et al., 2014](#) ; [Hirneisen et Kniel, 2013](#) ; [Cannon et al., 2013](#) ; [Kim et al., 2012](#) ; [Jean et al., 2011](#) ; [Casanova et al., 2010](#) ; [D'Souza et al. 2006](#) ; [Stine et al., 2005](#) ; [Kukavica-Ibrulj et al., 2004](#) ; [Mbithi et al., 1991](#) ; [Abad et al., 2001, 1994](#) ; [Sattar et al., 1986](#) ; [Moe et Shirley, 1982](#)). Ces suivis allaient *a priori* au-delà d'une phase de « stabilisation initiale » du système ([Ijaz et al, 1985b](#) ; [Sattar et al., 1984](#) ; [Adams et al., 1982](#)) incluant au minimum l'évaporation de l'essentiel de l'eau des

microgouttelettes, voire éventuellement leur dépôt et l'attachement non réversible d'une partie des virus apportés sur les parois des réacteurs pour les virus en suspension, ou sur les supports pour les virus déposés.

Distinguer dans les diminutions en nombre de virus infectieux l'inactivation *sensu stricto* des virus de leur immobilisation sur des surfaces solides (non réversible avec les procédures expérimentales mises en œuvre) est alors essentiel. La correction des estimations d'inactivation par l'estimation de l'immobilisation des virus a parfois été directe grâce à l'utilisation de traceurs (Zhao et al., 2012 ; Sattar et al., 1984 ; Adams et al., 1982 ; Mik et al., 1977). Le génome des virus est le meilleur des traceurs tant que l'ARN ou l'ADN n'est pas altéré (voire seulement la zone reconnue par la sonde utilisée en (RT-) qPCR dans les conditions environnementales testées, mais seuls Zhao et al. (2012) ont utilisé ce traceur. Les autres travaux ayant eu recours à des traceurs pour corriger les estimations d'inactivation sont pour la plupart antérieurs au développement des applications de la biologie moléculaire à la virologie environnementale (Metcalf et al., 1995) ; les traceurs étaient alors des traceurs colorés – uranine (Zhao et al., 2012) ou rhodamine-B (Sattar et al., 1984) –, ou des traceurs microbiens – *Bacillus subtilis* var. Niger (Adams et al., 1982 ; Mik et al., 1977) –, bien que leur devenir pendant la phase de "stabilisation initiale" soit très certainement différent de celui des virus étudiés, et varie avec le traceur retenu (Zhao et al., 2012). La distinction entre inactivation et immobilisation des virus a parfois été indirecte avec distinction d'une phase initiale d'abattement très important du nombre de virus infectieux supposée liée à l'immobilisation de virus pendant la « stabilisation initiale » du système, et d'une phase ultérieure avec abattement souvent moins marqué semblant suivre une loi exponentielle et supposé lié à l'inactivation (Zhao et al., 2012 ; Moe et Shirley, 1982 ; Adams et al., 1982 ; De Jong et Winkler, 1968). Lorsqu'elle est appliquée à des virus déposés sur des supports, la deuxième étape peut malheureusement voir évoluer l'immobilisation des virus ; Girard et al. (2010) ont ainsi montré que des virus déposés sur un support en acier inoxydable semblent attachés de plus en plus fortement dans le temps. D'autres travaux permettraient une distinction entre phase de "stabilisation initiale" du système et phase d'inactivation lente, même si cette distinction n'a pas été faite explicitement (Bae et al., 2014 ; Casanova et al., 2010 ; D'Souza et al. 2006 ; Abad et al., 1994 ; Mbithi et al., 1991 ; Sattar et al., 1986 ; Ijaz et al, 1985a et b; Sattar et al., 1984 ; Akers et al., 1966). Malheureusement, plusieurs travaux sur l'inactivation des virus en suspension dans des réacteurs atmosphériques fermés (Liu et al., 2012 ; Tseng et Li, 2006 ; Mik et al., 1977) ou déposés sur des supports (Kukavica-Ibrulj et al., 2004) semblent difficiles à exploiter tant la distinction entre inactivation et immobilisation semble délicate à faire pour expliquer les abattements expérimentaux de nombres de virus infectieux.

Les suivis d'inactivation en réacteurs ouverts ont un statut un peu spécial (McDevitt et al., 2012 ; McDevitt et al., 2007 ; Walker et al., 2007 ; Jensen, 1964). Avec des temps de séjours très courts (de moins d'1 s à 16 s), ils ont été utilisés pour caractériser des procédés d'assainissement/stérilisation très rapides de l'air avec utilisation de rayonnement UV-C, notamment de longueur d'onde proche de 254 nm, à forte intensité (de 0.1 et 26 J.m<sup>-2</sup>) bien que restant faibles au regard des doses préconisées pour détruire 99.99 % des virus (Lazarova, 2004). Si les rayonnements UV-C sont les plus efficaces pour altérer l'ADN et l'ARN avec des absorptions maximales de l'ADN aux alentours de 256 nm et de 200 nm (Veligura et al., 2005), les rayonnements solaires à ces longueurs d'onde sont absorbés par l'O<sub>2</sub>, l'O<sub>3</sub> et d'autres constituants traces dans les hautes couches de l'atmosphère (le seuil au-delà duquel ils arrivent au sol se situe généralement entre 290 et 295 nm). Les suivis d'inactivation de virus en suspension en réacteurs fermés ou sur supports ont notamment montré que l'inactivation du poliovirus (De Jong et Winkler, 1968), du reovirus (Adams et al., 1982) et du rotavirus (Moe et Shirley, 1982) est maximale à des humidités relatives intermédiaires, aux alentours de 40-70 %. D'autres auteurs ont noté des résultats contrastés, avec une inactivation minimale aux humidités intermédiaires pour le rotavirus

(Ijaz et al., 1985b ; Sattar et al., 1984) et le poliovirus (Ijaz et al., 1985a). Les taux d'inactivation maximum mentionnés varient fortement : d'environ  $0.02 \log_{10}.h^{-1}$  pour le rotavirus (Moe et Shirley, 1982) à plus de  $3 \log_{10}.h^{-1}$  pour le Gumboro vaccine virus (Zhao et al., 2012). L'accroissement de température a toujours un effet positif sur les vitesses d'inactivation des virus exposés à l'air (Zhao et al., 2012 ; Ijaz et al., 1985a). A notre connaissance, très peu de travaux ont traité des effets de rayonnements UV et/ou de la teneur en  $O_3$  à des doses ou teneurs environnementales ; on peut citer Hirneisen et Kniel (2013) et Stine et al. (2005) qui n'ont pas trouvé d'effet notable des rayonnements de type UV-A et UV-B sur l'inactivation du norovirus murin, du virus Tulane, du VHA, du calicivirus félin et du coliphage PRD1. On peut aussi citer Mik et al. (1977) qui ont montré qu' $O_3$  favorisait l'inactivation du bactériophage  $\phi$ X174 jusqu'à environ 20 ppb, teneur à peine supérieure aux teneurs atmosphériques de base. Ces auteurs montrent les effets de la présence de certains composés organiques. Au-delà, on peut envisager un effet indirect des rayonnements, y compris des UV-A et de certains rayonnements visibles, *via* les réactions (photo)chimiques dans l'air de la basse troposphère notamment en présence de  $NO_x$  ( $NO+NO_2$ ) et de composés organiques volatils COV, et *via* les réactions (photo)chimiques en phase liquide dans les nuages, brouillards etc. notamment en présence de Fe ionisé et de composés organiques (Graedel et Crutzen, 1992). Elles affectent la concentration en  $O_3$  et celles de différents radicaux libres au pouvoir oxydant très élevé, dont  $HO\bullet$  (parfois qualifié de "détergent de l'atmosphère") et  $HO_2\bullet$  (Graedel et Crutzen, 1992). Les supports sur lesquels les virus ont été déposés semblent avoir eu un effet sur l'inactivation : à titre d'exemple, l'inactivation du VHA semblait plus rapide sur acier inoxydable que sur céramique (Bae et al., 2014). Ainsi les résultats sur supports doivent-ils être pris avec beaucoup de prudence ; ils renseignent toutefois sur ce que pourrait être l'inactivation de virus aérosolisés adsorbés sur des colloïdes organiques ou minéraux du sol.

De nombreux travaux et synthèses bibliographiques ont traité de l'effet de variables environnementales pour des virus en milieux liquides : effet de la température (Bertrand et al., 2012), effet des rayonnements UV (McGuigan et al., 2012 ; Fugioka et Yoneyama, 2002), et effet de l' $O_3$  mais à des teneurs artificiellement élevées pour de la désinfection (Herbold et al., 1989). Toutefois, il s'agit de rester très prudent sur l'extrapolation de ces résultats au devenir de virus exposés à l'air.

Ce travail avait comme objectifs généraux d'évaluer et décrire l'inactivation du mengovirus comme modèle de picornavirus (virus hépatite A...) (Sano et al., 2015 ; Costafreda et al., 2006 ; Pinto et al., 2009) lorsque ce virus est exposé à l'air, et de revisiter des données publiées dans la littérature pour d'autres virus. Nous nous sommes focalisés sur les effets combinés de l'humidité relative de l'air et de la température ; quelques suivis nous ont permis d'aborder l'effet du rayonnement global, et l'effet de l' $O_3$  comme exemple de molécule oxydante présente dans l'atmosphère. En amont, ce travail a nécessité de concevoir un réacteur atmosphérique miniature adapté à un travail en laboratoire P2. Nous avons utilisé comme traceur du taux de récupération des virus apportés le nombre de copies de leur ARN valable tant que les conditions environnementales imposées ne sont pas propices à la dégradation de cet ARN.

## IV.2. Matériels et méthodes

### IV.2.a. Le virus

Nous avons utilisé la souche MC0 cytopathogène du mengovirus murin (MVM), initialement obtenue par [Martin et al. \(1996\)](#), qui nous a été aimablement fournie par le Pr. A. Bosch (Université de Barcelone, Espagne) avec les cellules Buffalo Green Monkey Kidney (BGM) (ref. ATCC : BGMK-DAF P17 (PTA-4594)) obtenues par [Barron et al. \(1970\)](#) et utilisées pour la production du virus.

Les mengovirus ont été produits en milieu Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, réf. : 31966047, USA) complété avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal, (Gibco®, réf. : 10270098, USA), 5 % (v/v) d'acide aminé non essentiel (Fisher, réf. : 11350912), 1 % d'Antibiotique-Antifongique (Gibco®, Pénicilline Streptomycine (réf. : 15290-018) et Fungizone (réf. : 15290-018) sous une atmosphère à 9 % de CO<sub>2</sub> à 37°C. Un inoculum viral d'environ 10<sup>5</sup> gc est mis en contact pendant 60 min avec des cellules BGM à 90% de confluence en flacons de 175 cm<sup>2</sup> (Greiner bio-one, réf. : 660175) ; le milieu de culture est renouvelé ensuite. Après 3 jours d'incubation, le milieu de culture est récupéré avec les cellules (sans action physique ou chimique pour décoller les cellules) et passé aux ultrasons pendant 10 cycles de 15 secondes chacun. La suspension ainsi obtenue est ensuite centrifugée pendant 5 min à 2700 g afin de faire sédimenter les débris cellulaires. Les virus du surnageant sont finalement concentrés et purifiés par ultracentrifugation à 76800 g pendant 2h30 sur coussin de 20 % de saccharose en EDTA NaCl. Le culot est remis en suspension dans 1 mL de PBS. L'inoculum a ensuite été aliquoté en lots de 30 µl en microtubes PCR et conservé à -22°C jusqu'à utilisation.

Pour chacune des cinétiques d'inactivation, 1 microtube PCR était décongelé à température ambiante (≈ 23°C) pendant 5 min environ, puis passé au Vortex pendant à nouveau environ 5 min.

La quantification du génome du mengovirus murin a été réalisée par RT-qPCR sur une Mx3005P PCR quantitative (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) sans étape de pré-concentration. En pratique, nous avons extrait environ 60 µL d'ARN viral à partir des 140 µL d'échantillon au moyen d'un kit d'extraction (kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen®, réf. : 52906)). La RT-qPCR a été réalisée au moyen du kit RNA UltraSense® One-step Quantitative RT-PCR System (Life Technologies® réf. : 11732-927) avec les amorces : anti-sens 5' - GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC - 3', sens GCGGGTCCTGCCGAAAGT et sonde TaqMan ATCACATTACTGGCCGAAGC décrite par [Pinto et al. \(2009\)](#) selon les recommandations du fabricant. La concentration finale de l'amorce anti-sens est de 1124 nM, 625 nM pour les amorces sens et 312 nM pour les sondes. Toutes les amplifications ont été réalisées avec l'appareil Mx3005P PCR quantitative (qPCR) (Agilent Technologies, France).

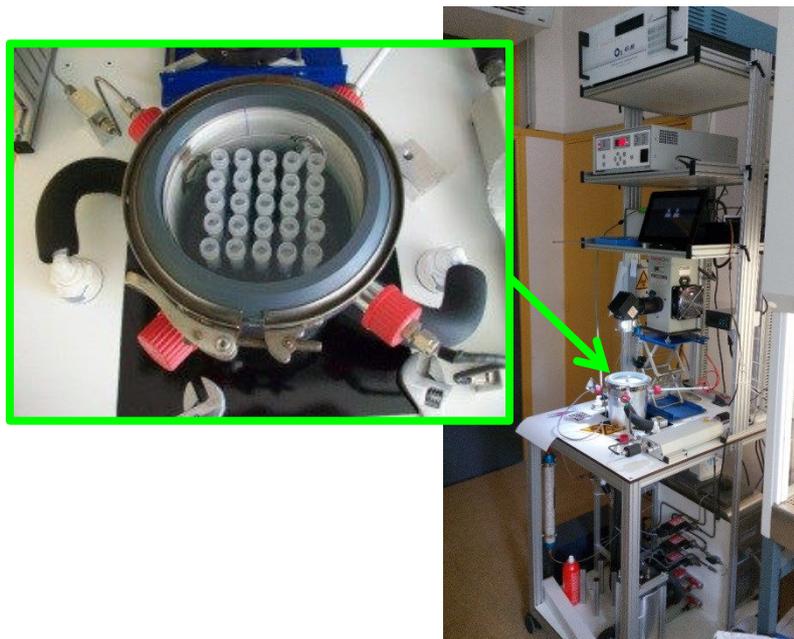
Les virus infectieux ont été quantifiés sur cellules BGM par dénombrement de plages de lyse en plaques 6 puits (Fisher, réf. : 10536952) en faisant l'hypothèse que chaque virus infectieux initie une plage de lyse distincte des autres. Pour chaque puits, 0.5 mL de la suspension virale à analyser était déposé sur une monocouche de cellules BGM ayant entre 70 et 90 % de confluence. Après 1 h de pré-incubation permettant l'adhésion des virus infectieux, les cellules étaient recouvertes par 2.5 mL d'un mélange composé pour moitié du milieu DMEM complété comme décrit précédemment et pour moitié de CMC (carboxyméthylcellulose à 3.2 % en eau physiologique), gélifiant permettant d'individualiser les plages de lyse (VWR, réf. : 276494N). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 3 j sous 9 % de CO<sub>2</sub>. Après cette incubation, le milieu de culture était retiré et le tapis cellulaire rincé 2 fois par 2 mL de PBS 1 ×. Les plages de lyse sont alors révélées par mise en contact pendant 20 min du tapis cellulaire avec une solution de Crystal violet (2 % (w/v) (Sigma®, réf. : C0775), 20 % (v/v) d'Ethanol

absolu (Sigma-Aldrich®, réf. : 32221), 10 % de Formol à 37 % (Sigma-Aldrich®, réf. : 252549), 70 % d'Eau Milli RO)). La solution colorante était ensuite prélevée et les tapis cellulaires rincés plusieurs fois à l'eau. Les plages de lyse, en pratique des zones blanches sur fond violet, sont comptées. L'ensemble des opérations précédentes était répété pour 3 dilutions en DMEM des échantillons : 7, 70 et 700 avec 2 puits pour le dénombrement des virus chaque dilution. Pour les témoins les facteurs de dilutions réalisés sont 7, 70 et 700 et pour les échantillons 7, 70 et 350.

## **IV.2.b. Protocoles expérimentaux et plan d'expérience**

### ***IV.2.b.i. Le dispositif d'étude***

Un réacteur a été assemblé par un artisan-verrier (GLI, Marseille, France) (Figure IV.2). Sa partie centrale est une enceinte quasi-cylindrique en borosilicate d'environ 800 mL de volume utile avec 12.5 cm de diamètre et environ 7.0 cm de hauteur internes. Elle est soudée à un compartiment inférieur lui-même en borosilicate dans lequel circule un mélange d'eau et de monopropylène glycol à la température de consigne. Le réacteur proprement dit est fermé à sa face supérieure par un disque en pirex, un joint torique étanchéifiant l'ensemble. Quatre ouvertures tubulaires GL45 à 90° l'une de l'autre permettent, pour 2 d'entre elles diamétralement opposées, le balayage de la partie centrale par un air reconstitué, et pour une 3<sup>ème</sup> l'insertion d'une sonde de température PT100 recouverte de PTFE (Labomoderne, réf. : C13510).

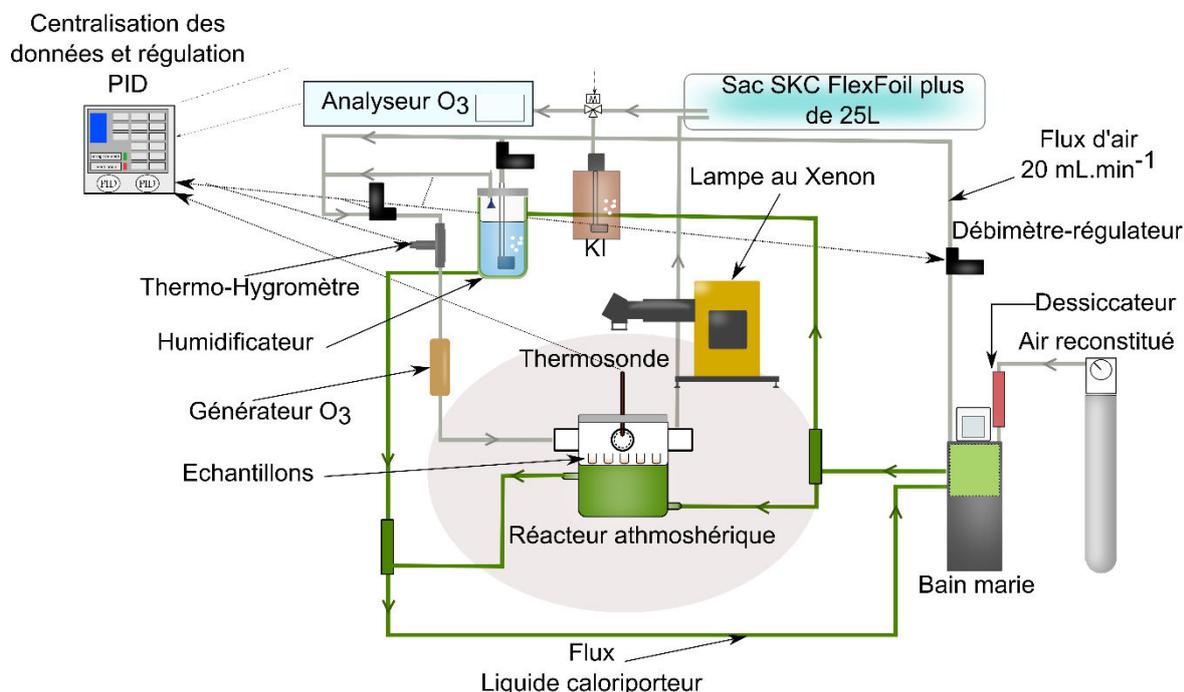


**Figure IV.2 :** Réacteur conçu pour suivre l'inactivation des virus sous diverses conditions atmosphériques.

La composition et la température de l'air balayant le réacteur étaient acquises progressivement en partant d'air sec reconstitué (80/20 de N<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>).

L'humidité relative de l'air était obtenue par mélange d'air chargé à environ 80 % d'humidité relative par bullage dans une branche du circuit et d'air maintenu sec dans une autre branche, les débits étant régulés en amont de chacune des branches et le débit du mélange fixé à 20 mL.min<sup>-1</sup> était contrôlé en aval (Figure IV.3). Un thermo-hygromètre capacitif numérique (sensor SHT75 ; Sensirion®, Steafa,

Suisse), associé à une interface d'acquisition NI6008 (National Instrument), était positionné dans le tube amenant l'air au réacteur et servait à la régulation de l'humidité relative de l'air arrivant au réacteur. Un autre thermo-hygromètre (sensor SHT21 ; Sensirion®, Steafa, Suisse) de contrôle était positionné dans le cœur du réacteur.



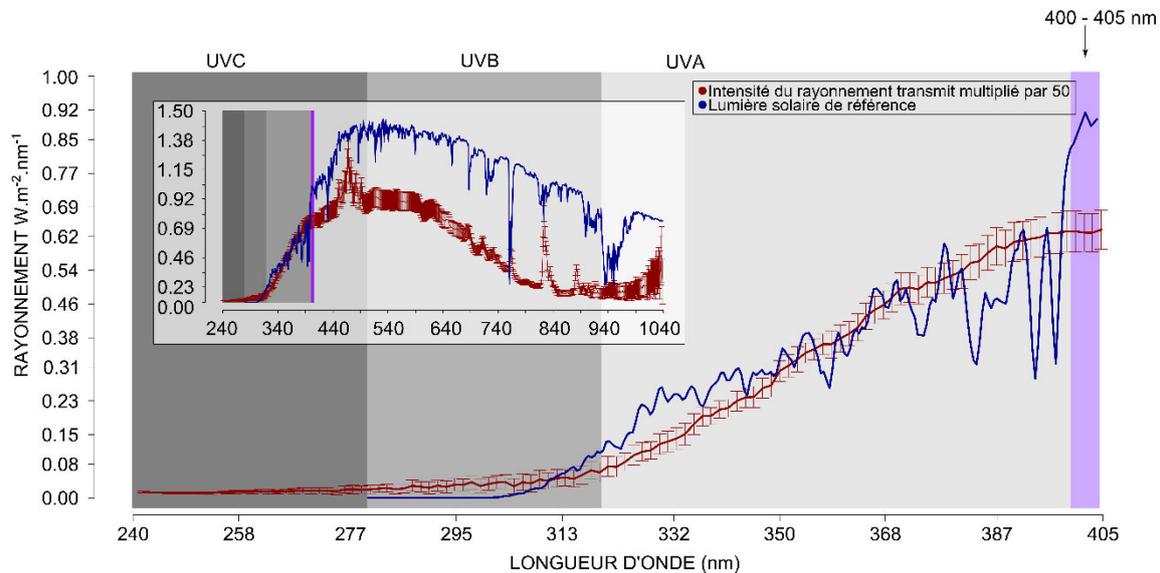
**Figure IV.3 :** Ensemble du dispositif permettant d'imposer et de contrôler les conditions d'humidité relative et de température de l'air, d'éclairage et de teneur en  $O_3$  au sein du réacteur atmosphérique dédié à l'étude de l'inactivation des virus.

Une sonde à résistance de platine recouverte de PTFE (LaboModerne, pt100, réf. : C13506) utilisée pour le contrôle et la régulation de la température étaient placée dans le cœur du réacteur. Le téflon facilitait le nettoyage et la désinfection de la sonde.

Pour une expérience, une teneur de 300 ppb d' $O_3$  a été imposée en entrée de réacteur à l'aide d'une cellule génératrice d' $O_3$  Pen Ray® (UVP, US) prêtée par le Prof. H Wortham (LCE, Aix-Marseille Université, France) et fonctionnant par photolyse de l' $O_2$  à 184.95 nm. Le réglage de l'intensité de la lampe se fait manuellement. La cellule a été réglée pour cette teneur en  $O_3$  hors expérience réelle ; l'air en sortie de réacteur vide était alors stocké dans un sac étanche de 25 L (SKS, réf. : 253-25) pour contrôle après de sa teneur en  $O_3$  à l'aide d'un analyseur (Environnement SA, Poissy, France) devant être balayé à environ 2 L.min<sup>-1</sup> par l'air à analyser (incompatible avec une mesure directe en sortie de réacteur). Les gammes couvertes par ce dernier sont 0.001 à 10 ppm, un bruit de 0.5 ppb et une linéarité de 1 %.

Une lampe au Xénon (newcorp® USA) de 300 W, prêtée par le Prof. H Wortham (LCE, Aix-Marseille Université, France), a été utilisée pour quelques expériences. Son spectre d'émission, l'homogénéité de l'éclairage sur la cible visée, l'impact de la distance et la réponse du filtre en pyrex ont été caractérisés par un spectroradiomètre (Spectral Evolution, réf. : SR-500) entre 250 et 1020 nm.

Le spectre obtenu était proche du spectre du rayonnement solaire, à l'exception de rayonnements UV- C détectables (Figure IV.4). L'analyse ayant montré une forte hétérogénéité de l'intensité du rayonnement arrivant au réacteur (rayonnement maximum au centre de la zone visée et beaucoup plus faible en périphérie, résultats non présentés), un diffuseur en silice fondue (OE Edmund, réf. : #83-420) et un filtre infrarouge (OE Edmund, réf. : #45-648) ont été superposés au disque en pirex faisant office de couvercle.



**Figure IV.4 :** Comparaison de l'intensité moyenne de la lampe et le rayonnement solaire de référence.

(G03 Committee, 2012). Pour ce graphique, l'intensité lumineuse de la lampe est multipliée par 50.

Avec ces ajouts, l'intensité du rayonnement de la lampe arrivant réellement au niveau des dépôts de virus était d'environ 2 % du rayonnement solaire au cours d'une journée d'ensoleillement de l'ordre de 600 W.m<sup>-2</sup> pour les rayonnements de longueur d'onde entre 300 et 400 nm.

#### IV.2.b.ii. *Protocole expérimental*

Pour chaque cinétique d'inactivation virale suivie, 1 µL de suspension virale correspondant approximativement à 10<sup>+6</sup> gc et à entre 10<sup>+2</sup> pfu et 7.10<sup>+3</sup> pfu était déposé initialement au fond de chacun de 25 cryotubes en polypropylène de 400 µL (Evergreen Scientifique, Los Angeles, CA, USA ; réf. : 222-3926-085) de 2 cm de hauteur et de 1 cm de diamètre interne, pour lesquels l'adhésion des virus pouvait être négligée. Un de ces tubes servait de témoin réacteur (tube fermé à humidité saturante). S'y ajoutait 1 témoin à la date initiale (t=0), en pratique 1 µL de suspension à laquelle étaient ajoutés immédiatement 300 µL de PBS au 10<sup>ème</sup> ; 140 µL étaient immédiatement prélevés et stockés dans un tube Eppendorf® RNAse-free en prévision d'analyses ultérieures en RT-qPCR, les 160 µL étant conservés à -22°C pour la culture cellulaire. A l'exception de ce dernier, les 25 tubes étaient placés sur un support en Plexiglass et insérés dans le réacteur atmosphérique permettant de les soumettre à des conditions homogènes de température, d'humidité relative, d'intensité de rayonnement et de concentration en O<sub>3</sub>. A 6 dates différentes (20 min, 1, 2, 4, 6 et 10 h), 4 tubes étaient prélevés de manière aléatoire. Ils étaient alors immédiatement complétés par 300 µL de PBS au 10<sup>ème</sup> (Fisher, BP399-1) et passés au Vortex pendant 5 min ; 140 µL étaient alors prélevés et stockés dans un tube Eppendorf®

RNAse-free. Les cryotubes et les tubes Eppendorf® étaient alors stockés à -22°C jusqu'à analyses respectivement du nombre de virus infectieux (pfu) et du nombre de copies génomiques (gc).

#### IV.2.b.iii. *Plan d'expérience*

Dix expériences en réacteur ont été suivies. Elles se différençaient par la température (15, 25 et 40°C) et l'humidité relative de l'air (30, 50, 60, 65 et 80 %) imposées, par la présence ou non d'un rayonnement de composition spectrale proche de celle du rayonnement solaire mais d'intensité moindre (2 %), et par la teneur en O<sub>3</sub> entrant dans le réacteur (absence ou environ 300 ppb) (Tableau IV.1).

**Tableau IV.1 :** Caractéristiques des 10 expériences menées en réacteur atmosphérique. Toutes les expériences ont duré 10 h.

Expérience	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T (°C)	25	25	25	25	25	25	15	15	40	40
Humidité relative (%)	80	65	50	30	80	80	60	60	80	80
Rayonnement	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
O <sub>3</sub> (ppb)	0	0	0	0	0	300	0	0	0	0

#### IV.2.c. Modélisation des processus ; traitement des données expérimentales

Nous avons suivi parallèlement les évolutions du nombre de virus infectieux  $N_{v-i}(t)$  (pfu) et du nombre de copies d'ARN viral  $N_{v-t}(t)$  (gc), l'ARN viral étant utilisé comme traceur pour distinguer les virus immobilisés physiquement de ceux inactivés, lorsque les conditions n'affectent pas l'ARN (i.e. *a priori* toutes les conditions sans UV). Si une variation du nombre de copies d'ARN viral  $n_{v-t}(t)$  était observée, elle devait nous conduire à calculer le taux de virus inactivés selon l'expression suivante :

$$I(t) = \frac{N_{v-i}(t)}{N_{v-i}(t=0)} \times \frac{N_{v-t}(t=0)}{N_{v-t}(t)} \quad (IV.1)$$

En absence de variation significative cette expression peut se réduire à l'expression suivante utilisée très généralement sans aucune évaluation préalable ou parallèle d'une immobilisation physique des virus :

$$I(t) = \frac{N_{v-i}(t)}{N_{v-i}(t=0)} \quad (IV.2)$$

Après apport d'une quantité de virus infectieux  $N_{v-i}(t=0)$  (en pfu ou 'unité formant plaque') dans 1 µL de suspension, on suppose que le taux d'inactivation  $\partial N_{v-i}/\partial t$  (pfu.h<sup>-1</sup>) est proportionnel à la quantité de virus encore infectieux  $N_{v-i}(t)$  (pfu) à une date  $t$  (h). On peut écrire :

$$\partial N_{v-i}(t)/\partial t = -k_i(HR, T, UV, O_3) \times N_{v-i}(t) \quad (IV.3)$$

où  $k_i(HR, T, UV, O_3)$  est le coefficient cinétique d'inactivation (h<sup>-1</sup>), dépendant de l'humidité relative de l'air  $HR$  (%) au voisinage immédiat du virus, de la température  $T$  (°C), de la teneur en O<sub>3</sub> (ppb), et de l'énergie reçue en rayonnements efficaces (W.m<sup>-2</sup>). La prise en compte des dernières grandeurs n'est pas simple : effets directs ou indirects *via* la (photo)chimie de l'atmosphère, plages spectrales à prendre en compte selon que le rayonnement agit directement ou indirectement. Pour des conditions constantes d'humidité, l'intégration de l'équation (IV.3) aboutirait à l'équation suivante :

$$N_{v-i}(t) = N_{v-i}(t=0) \times \exp(-k_i(HR, T, UV, O_3) \times t) \quad (IV.4)$$

Malheureusement, on peut penser que  $k_i(HR, T, UV, O_3)$  varie fortement dans le temps avec la dessiccation presque totale des gouttelettes de suspension virale. Toutefois, l'équation (IV.4) peut être réécrite de manière plus générale pour  $k_i$  variant dans le temps :

$$N_{v-i}(t) = N_{v-i}(t=0) \times \exp\left(-\int_0^t k_i(HR, T, UV, O_3) \times dt\right) \quad (IV.5)$$

Soit :

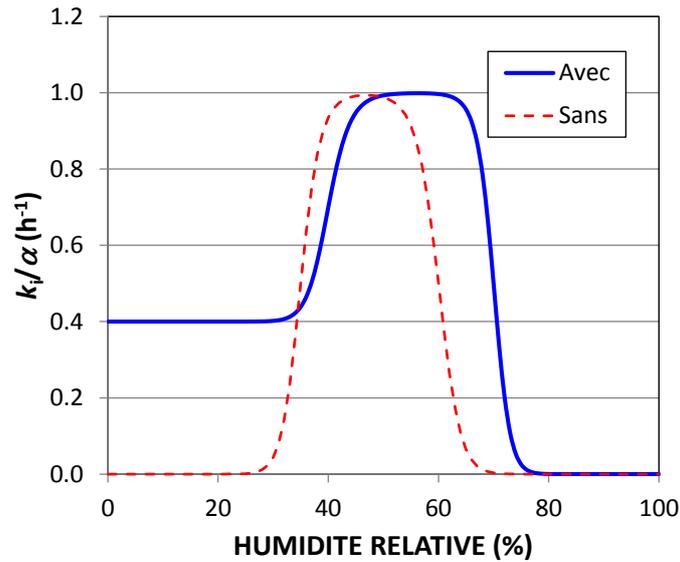
$$\ln\left(\frac{N_{v-i}(t)}{N_{v-i}(t=0)}\right) = -\int_0^t k_i(HR, T, UV, O_3) \times dt \quad (IV.6)$$

En ayant une forme analytique décrivant la dépendance de  $k_i$  à un ou plusieurs facteurs parmi ceux précédemment évoqués ( $HR, T, UV, O_3$ ), on peut envisager d'ajuster quelques constantes intervenant dans les formes analytiques à partir des données expérimentales.

Concernant plus spécifiquement l'effet de l'humidité relative de l'air, les résultats antérieurs montrent que l'inactivation des virus dans l'air est un phénomène cinétique sur plusieurs heures, voire quelques jours, fortement affecté par cette grandeur. Nous avons fait l'hypothèse de travail suivante : l'inactivation des virus est minimale ou nulle aux humidités relatives élevées, maximale aux humidités relatives intermédiaires, et intermédiaire aux humidités relatives les plus faibles. Une question, sans réponse à notre connaissance aujourd'hui, est alors de savoir si les résultats obtenus aux plus faibles humidités résultent d'une évolution à ces humidités ou d'une évolution temporaire aux humidités intermédiaires lors de la dessiccation progressive de microgouttelettes de suspension contenant ces virus. On peut imaginer que, vers la fin de la dessiccation d'une suspension virale (i.e. lorsque la pression de vapeur n'est plus saturante), des forces s'exercent entre protéines (ou régions de protéines) de la capsidie et molécules d'eau, mais que la vitesse des déformations en résultant dépende de l'humidité relative. Pour une température donnée, nous avons retenu un formalisme mathématique empirique décrivant la dépendance de la constante d'inactivation  $k_i$  ( $h^{-1}$ ) à l'humidité relative de l'air  $HR$  (%) :

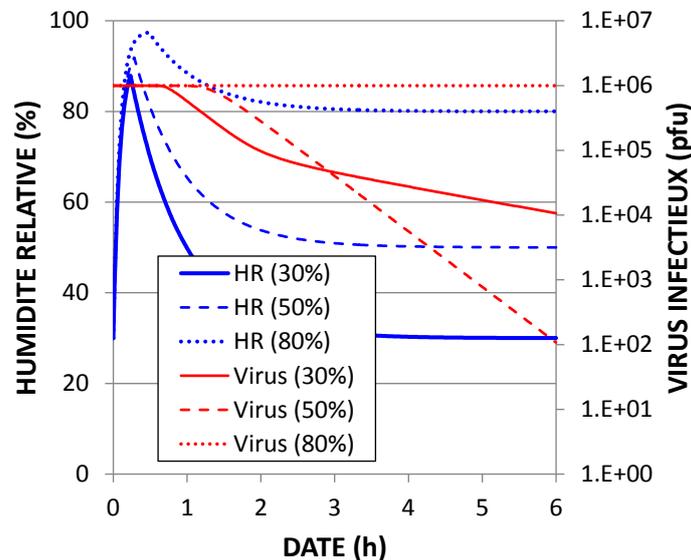
$$k_i(HR) = \alpha \times \left( \beta + (1 - \beta) \times \frac{(HR/HR_1)^{e_1}}{1 + (HR/HR_1)^{e_1}} \right) \times \left( \frac{((100 - HR)/(100 - HR_2))^{e_2}}{1 + ((100 - HR)/(100 - HR_2))^{e_2}} \right) \quad (IV.7)$$

où  $HR_1$  et  $HR_2$  sont les humidités relatives autour desquelles la valeur de  $k_i$  croît ou décroît plus ou moins fortement selon les valeurs de 2 exposants  $e_1$  et  $e_2$ , et  $\alpha$  est une constante de proportionnalité ( $h^{-1}$ ) et  $\beta$  une constante liée à l'inactivation en condition sèche (Figure IV.5 à titre d'exemple).



**Figure IV.5 :** Exemples de dépendance du rapport  $k_i/\alpha$  à l'humidité relative. (Avec :  $HR_1=40\%$ ,  $HR_2=70\%$ ,  $e_1=20$ ,  $e_2=20$ ,  $\beta=0.4$  ; Sans :  $HR_1=40\%$ ,  $HR_2=70\%$ ,  $e_1=20$ ,  $e_2=20$ ,  $\beta=0$ )

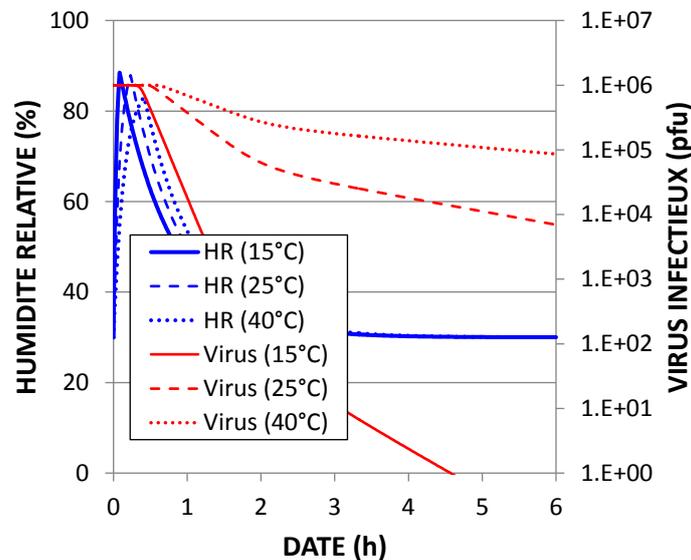
Nous avons appliqué ce formalisme à des cinétiques simplifiées d'évolution de l'humidité dans le réacteur atmosphérique. Nous avons supposé l'air entrant à l'humidité de consigne, un mélange parfait et instantané entre air entrant et air déjà présent dans le réacteur, une évaporation de l'eau de la suspension virale proportionnelle à l'écart entre humidité relative du réacteur et humidité saturante (100 %), et l'évaporation de la moitié de cette eau avant même que les tubes soient dans le réacteur. On peut alors simuler des inactivations intermédiaires aux humidités les plus faibles (Figure IV.6).



**Figure IV.6 :** Evolutions simulées de l'humidité relative dans le réacteur atmosphérique pour une valeur initiale de 30% et des valeurs visées de 30, 50 et 80% ; variations concomitantes du nombre de virus infectieux. ( $HR_1=35\%$ ,  $HR_2=60\%$ ,  $e_1=20$ ,  $e_2=20$ ,  $\beta=0.2$ ).

La température peut affecter la vitesse d'évaporation des gouttelettes de suspension virale au minimum *via* son effet sur la pression de vapeur saturante (décrite dans notre travail par la formule de Clapeyron,

bien que ce ne soit qu'une approximation), et *via* la vitesse des modifications de structure de la capsid supposée suivre une loi du  $Q_{10}$  avec  $Q_{10}$  compris entre 2 et 3. En ne tenant compte que de ces effets, on aboutit par exemple aux comparaisons de la Figure IV.7.



**Figure IV.7 :** Evolutions simulées de l'humidité relative dans le réacteur atmosphérique pour une valeur initiale de 30% et pour une visée de 30%, à 15, 25 et 40°C ; variations concomitantes du nombre de virus infectieux. ( $HR_1=35\%$ ,  $HR_2=70\%$ ,  $e_1=20$ ,  $e_2=20$ ,  $\beta=0.2$ ).

La température peut agir simultanément sur les forces en jeu dans les changements de conformation de capsid, notamment en modifiant les forces au niveau des différentes interfaces du système « polypropylène-eau-virus-air », et la stabilité même de l'assemblage des protéines dans la capsid, car les forces de cohésion intermoléculaires sont réduites par l'agitation thermique (Ausar et al., 2006; Phelps et al., 1995). La diminution de tension superficielle des interfaces 'air-eau' avec l'accroissement de température peut être négligée en première approche (74.22, 72.75, 71.18 et 69.56 mN.m<sup>-1</sup> à respectivement 10, 20, 30 et 40°C par exemple), mais la stabilité même des forces en jeu dans les assemblages de protéines peut changer et être spécifique à chaque virus.

Les données obtenues en absence de rayonnement et en absence d'O<sub>3</sub> ont été ajustées à 25°C en tenant compte des fluctuations réelles d'humidité relative de l'air dans le réacteur atmosphérique grâce à l'équation (IV.6) permettant d'intégrer explicitement les variations de  $k_i(HR,T,UV,O_3)$  associées aux fluctuations d'humidité relative de l'air. Ces dernières ont été provoquées principalement par les ouvertures du réacteur aux dates de prélèvement des échantillons. Les paramètres estimés lors de cette étape ont été appliqués aux données disponibles à 15°C (absence de données à 40°C), en ne tenant compte de l'effet de la température que sur la vitesse des réactions (avec un  $Q_{10}$  entre 2 et 3) sans tenir compte d'effets de seuils dans les températures qui peuvent être prépondérants pour ce qui est des variations des forces de cohésion intermoléculaires avec l'agitation thermique.

#### **IV.2.d. Analyse de jeu de données expérimentales de la littérature :**

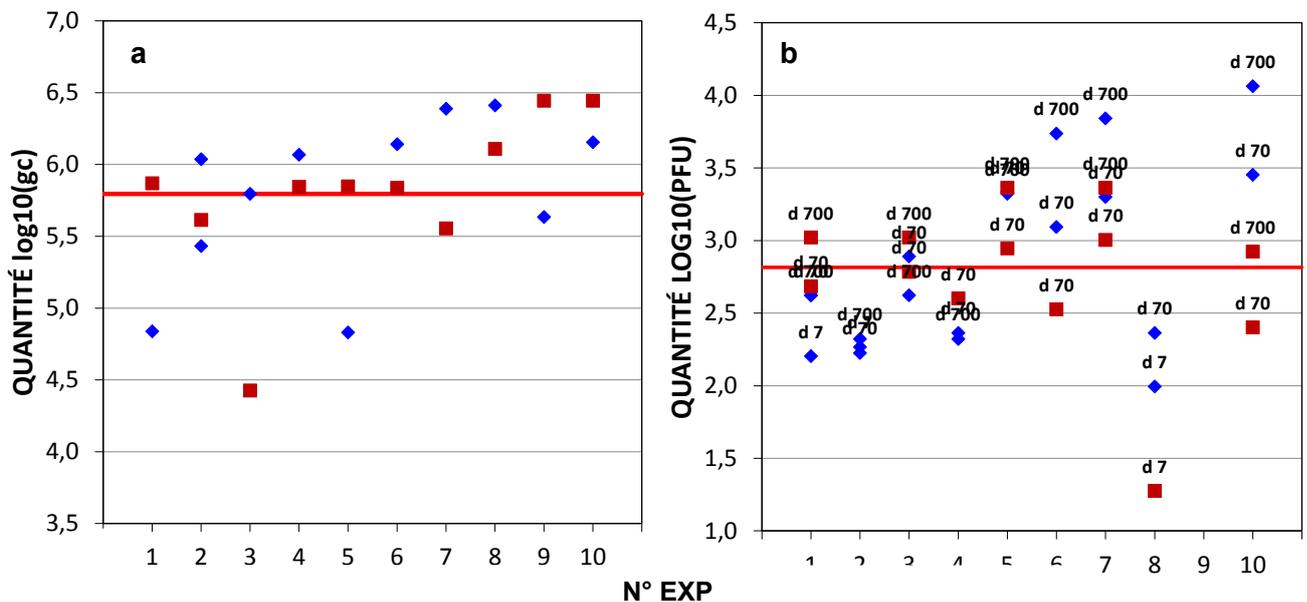
Nous avons revisité les données de la littérature traitant d'exposition des virus en suspension dans l'air de réacteurs fermés pour les quelques articles semblant permettre un traitement malgré l'absence de traceur (ou l'absence d'utilisation d'un traceur dans l'analyse des données) (Sattar et al., 1985 ; Ijaz et al., 1985a et b ; Adams et al., 1982 ; De Jong et Winkler, 1968 ; Ackers et al., 1966). Nous avons alors admis que les phénomènes autres que l'inactivation sont observés principalement dans les

premières minutes (voire la première heure) qui suivent l'aérosolisation des virus dans le réacteur (i.e. pendant la période où l'on observe parfois un abattement très marqué (en  $\log_{10}$ ) du nombre de virus infectieux récupérables); certains auteurs parlent d'un effet « pulvérisation » (atomisation ou nébulisation) et/ou de « stabilisation initiale » qui peut correspondre en partie à une immobilisation partielle des microgouttelettes aux interfaces 'air-solides' dans le réacteur à laquelle se rajoute forcément la dessiccation initiale des microgouttelettes en suspension, voire auparavant l'effet de hautes pressions au niveau du nébuliseur ou de l'atomiseur. Nous avons utilisé les données de la période suivante où l'abattement semble très généralement ajustable par une fonction exponentielle. Nous avons fait l'hypothèse que la décroissance des virus infectieux dénombrés est alors liée à leur inactivation (cf. équation (IV.4)); le coefficient directeur de l'équation de la régression linéaire reliant les logarithmes népériens de ces nombres au temps écoulé depuis le début des incubations est alors égale à  $-k_i$ . Nous avons repris les données des différents auteurs et calculé de cette manière les  $k_i$ , et mis en relation ces valeurs à l'humidité relative de l'air.

### IV.3. Résultats et discussions

#### IV.3.a. Niveau initial d'inoculation des tubes ; tests d'homogénéité entre expériences

Pour chacune des 10 expériences, le témoin à  $t=0$  et le témoin réacteur ont été caractérisés en terme de nombre de copies génomiques d'ARN viral (Figure IV.8a) et de PFU (Figure IV.8b).



**Figure IV.8 :** Mesure des quantités de virus total et infectieux dans les témoins (carré rouge Température, losange bleu suspension) en gc et PFU.

Eu égard aux nombres de copies génomiques, des tests statistiques sur les différences de  $\log_{10}$  entre témoins à  $t=0$  et témoins réacteurs ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les 2 types de mesures ( $P > 0.05$ ). Aussi, pour améliorer l'estimation de l'apport initial de virus, nous avons moyenné les mesures associées aux 2 types de témoins pour chaque expérience. Au vu des variations des quantités initiales de génomes entre expériences, cohérentes avec les valeurs aux dates ultérieures

(cf. section IV.3.b), on ne peut pas accepter l'hypothèse d'un niveau d'inoculation identique entre expériences.

Eu égard aux nombres de plaques formant colonies (PFU), des tests statistiques sur les différences de  $\log_{10}$  entre moyennes des témoins à  $t=0$  et moyennes des témoins réacteurs ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les 2 types de mesures ( $P>0.05$ ). Aussi avons moyenné les 2 types mesures associées aux 2 types de témoins pour chaque expérience.

Les virus infectieux représenteraient de 0.01 à 0.49% des copies génomiques d'ARN viral (en moyenne 0.16%).

### **IV.3.b. Evaluation du maintien des nombres de copies génomiques d'ARN viral**

Les relations entre quantités d'ARN viral récupérées et durée d'incubation sont présentées dans la Figure IV.9. L'existence d'une relation linéaire entre quantité d'ARN et durée d'incubation a été testée sur les données sans les témoins.

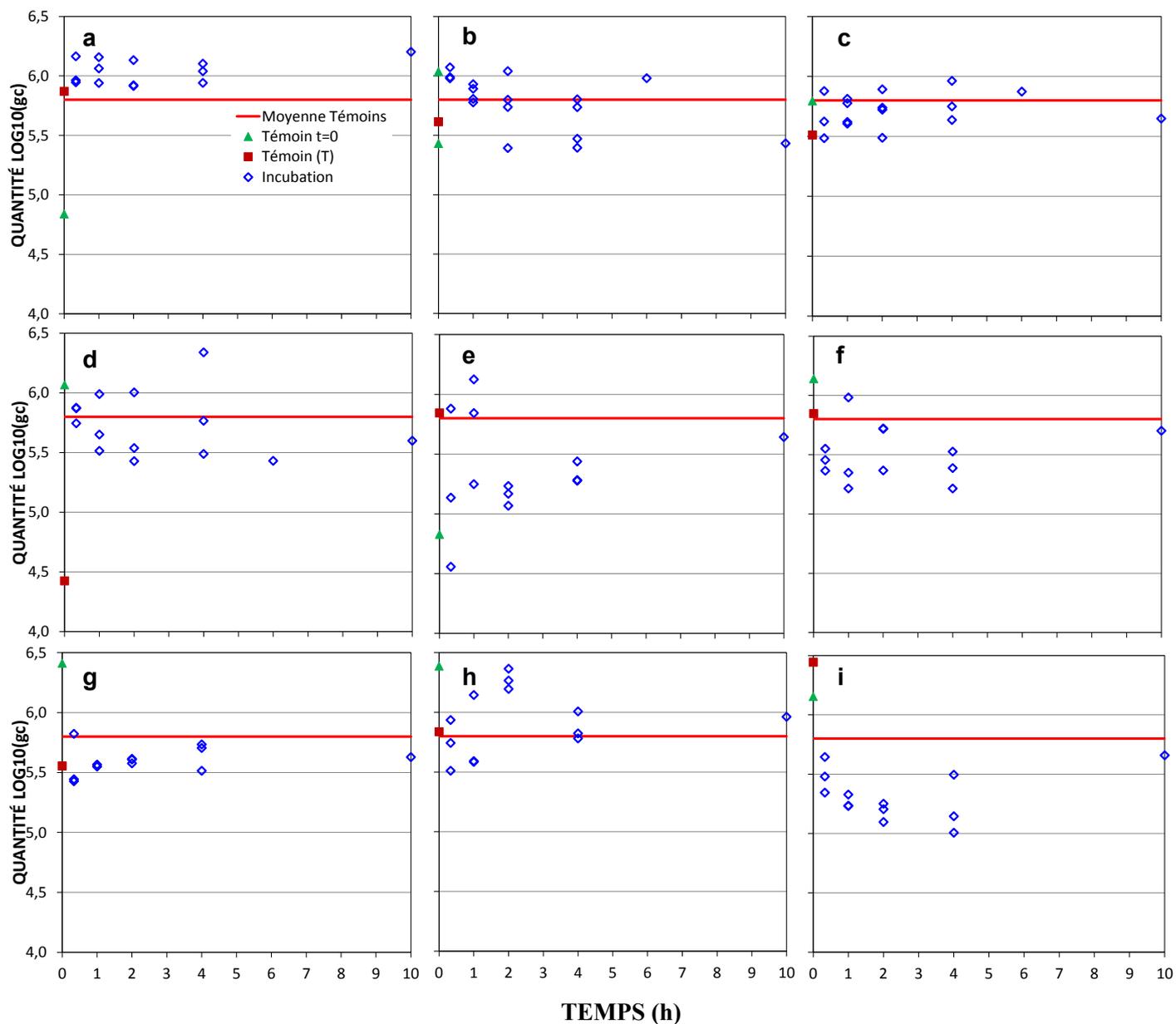
On constate que, pour certaines expériences, les mesures sont systématiquement au-dessus ou en-dessous de la moyenne générale des témoins à  $t=0$  et des témoins réacteurs commune à l'ensemble des expériences, confirmant le constat comme quoi les niveaux d'inoculation ont varié avec les expériences. Les coefficients de corrélation entre quantité d'ARN et durée d'incubation (hors valeurs des témoins) ne sont pas significatifs à 95 %, à l'exception de l'expérience n°2 (25°C, 65 % d'humidité relative (Figure IV.9b)). Ils sont compris entre -0.53 et 0.45 en absence d'O<sub>3</sub> et de rayonnement. Pour les 4 expérimentations avec rayonnement, ils sont compris entre 0.13 et 0.22 (0.14 pour celle avec simultanément apport d'O<sub>3</sub>).

Les teneurs en copies génomiques virales extraites et dénombrées après 4 h sont comprises entre 30 et 270 % de l'apport estimé en absence d'O<sub>3</sub> et de rayonnement. Les taux de récupérations de l'ARN viral pour les 4 expérimentations avec rayonnement sont comprises entre 10 et 90 % de l'apport, et suggèrent un effet direct des rayonnements (qui comprennent quelques rayonnements UV-C) sur la séquence cible dosée. Dans ces expériences avec UV, l'expérience avec simultanément apport d'O<sub>3</sub> a eu un taux de récupération de l'ARN viral de 34%.

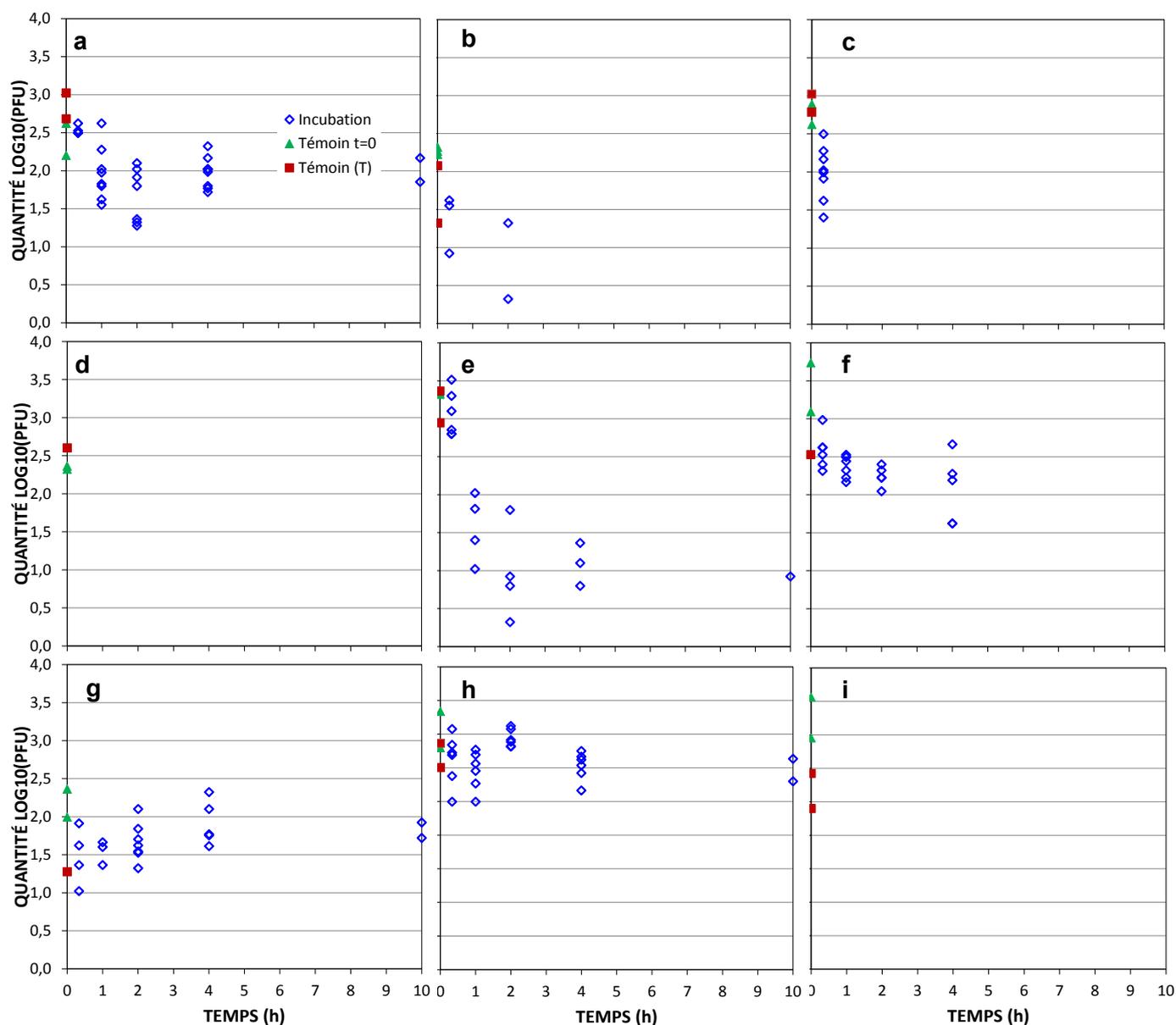
L'absence de tendance significative entre quantité d'ARN viral récupérée et durée d'incubation pour les expériences sans rayonnement ni apport d'O<sub>3</sub> nous ont amenés à ne pas corriger nos données sur les PFU. Nous avons donc utilisé l'équation (IV.2) pour calculer les niveaux d'inactivation à la place de l'équation (IV.1). Nous admettons que pour les autres expériences (avec rayonnement, voire avec apport d'O<sub>3</sub>), les données de PFU ne sont pas à corriger pour les mêmes raisons.

### **IV.3.c. Inactivation des virus**

Les relations entre quantités de virus infectieux récupérés et durée d'incubation sont présentées dans la Figure IV.10. L'expérience n°9 n'est pas présentée, n'ayant jamais détecté de virus infectieux (y compris sur les témoins). On n'observe aucune évolution du nombre de virus infectieux dans les expériences à 15°C (65 % d'humidité relative, sans et avec rayonnement (Figure IV.10g-h)) ; à l'inverse, l'inactivation est suffisamment rapide pour qu'on ne dénombre plus de virus infectieux dès 20 minutes d'incubation pour l'expérience à 40°C (Figure IV.10i), et pour l'expérience à 25°C pour la plus petite humidité relative testée (30 %) (Figure IV.10d)). Parmi les autres expériences sans rayonnement ni O<sub>3</sub>, toutes à 25°C, l'inactivation serait d'autant plus rapide que l'humidité relative de l'air est faible : 80 % (Figure IV.10a) < 65 % (Figure IV.10b) < 50 % (Figure IV.10c) < 30 % (Figure IV.10d).

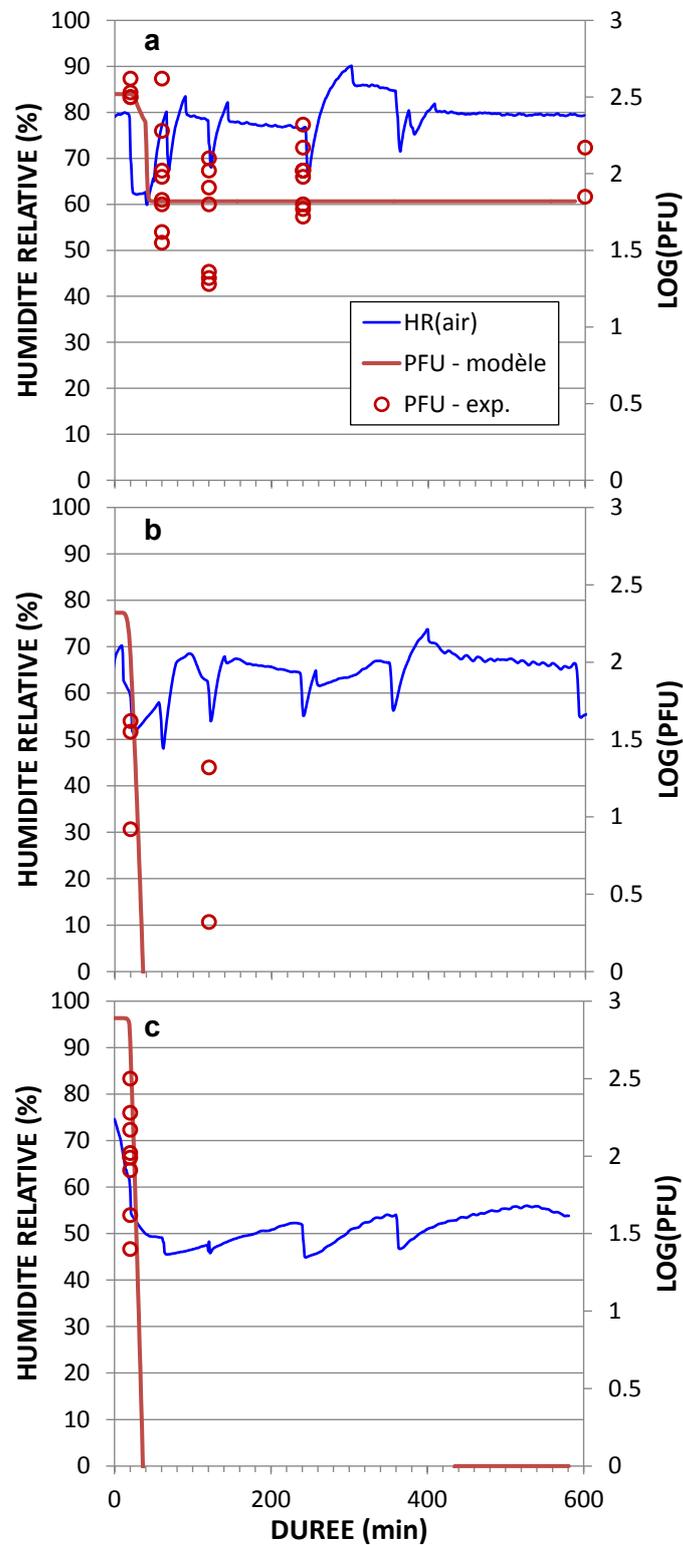


**Figure IV.9 :** Quantité de virus totale au cours du temps pour les expériences 25°C, 80 % d'humidité relative (a), 25°C, 65 % d'humidité relative (b), 25°C, 50 % d'humidité relative (c), 25°C, 30 % d'humidité relative (d), 25°C, 80 % d'humidité relative et rayonnement (e) et 25°C, 80 % d'humidité relative, rayonnement O<sub>3</sub> (f), 15°C, 65 % d'humidité relative (g), 15°C, 65 % d'humidité relative et rayonnement (h), 40°C, 80 % d'humidité relative et rayonnement (i). Les losanges représentent les échantillons, les carrés les témoins d'influence de la température et les triangles les témoins de la quantité de virus déposée. (La condition 40°C et 80% d'humidité sans UV correspondant à l'expérience n°9 a été éliminée en absence de PFU (y compris pour les témoins)).



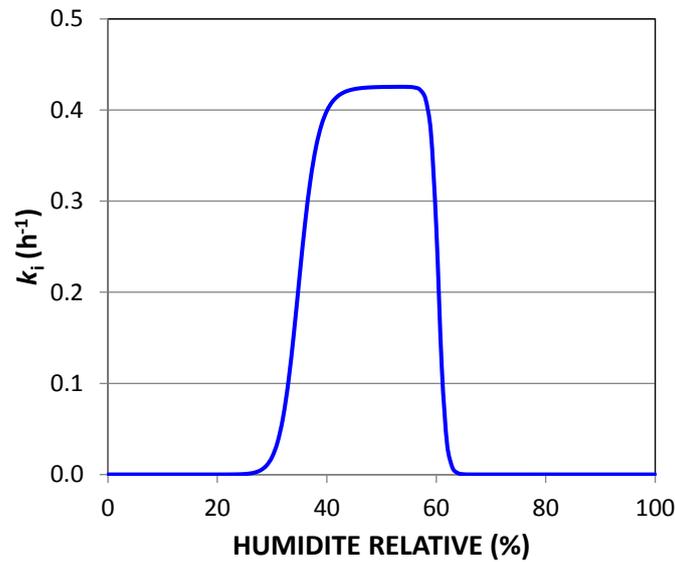
**Figure IV.10 :** Quantité de virus infectieux au cours du temps pour les expériences 25°C, 80 % d'humidité relative (a), 25°C, 65 % d'humidité relative (b), 25°C, 50 % d'humidité relative (c), 25°C, 30 % d'humidité relative (d), 25°C, 80 % d'humidité relative et rayonnement (e) 25°C, 80 % d'humidité relative, rayonnement O<sub>3</sub> (f), 15°C, 65 % d'humidité relative (g), 15°C, 65 % d'humidité relative et rayonnement (h) et 40°C, 80 % d'humidité relative et rayonnement (i).  
*(Les losanges représentent les échantillons, les carrés les témoins d'influence de la température et les triangles les témoins de la quantité de virus déposée).*

Dans un premier temps, nous avons tenté d'ajuster le modèle présenté dans la section IV.2.c. aux données expérimentales à 25°C sans rayonnement ni O<sub>3</sub>, et en tenant compte des fluctuations mesurées d'humidités relatives de l'air (Figure IV.11).



**Figure IV.11** : Ajustement des PFU simulés aux PFU expérimentaux avec évaluation des coefficients intervenant dans la fonction  $k_i(HR)$  décrite à l'équation (IV.6).

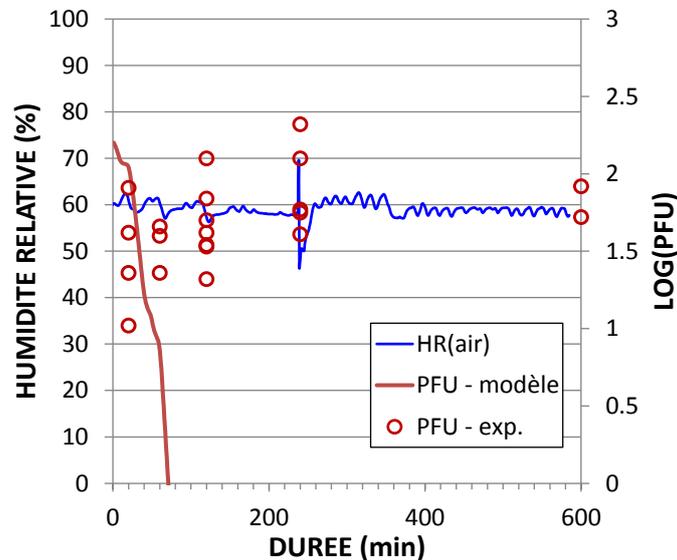
L'ajustement aboutit à la fonction présentée dans la Figure IV.12. Toutefois, le domaine des faibles humidités ayant à peine été exploré, une description différente de la fonction  $k_i(HR)$  dans ce domaine aurait donné les mêmes ajustements.



**Figure IV.12 :** Fonction  $k_i(HR)$  aboutissant aux ajustements présentés dans la Figure IV.10.

$$k_i(HR) = 0.43 \times \left( \frac{(HR/34.9)^{20}}{1 + (HR/34.9)^{20}} \right) \times \left( \frac{((100 - HR)/(100 - 60.4))^{60}}{1 + ((100 - HR)/(100 - 60.4))^{60}} \right) \quad (IV.8)$$

Appliquée à l'expérience à 15°C et 60 % d'humidité relative, la fonction  $k_i(HR)$ , même divisée par 3 pour tenir compte des 10°C de baisse de température, prévoit une inactivation très rapide des virus alors qu'aucune inactivation n'est observée expérimentalement.



**Figure IV.13 :** Evolutions simulée et mesurée du nombre de virus infectieux (PFU) à 15°C et 60 % d'humidité relative en utilisant la fonction  $k_i(HR)$  ajustée sur les données acquises à 25°C (cf. légende de la Figure IV.11).

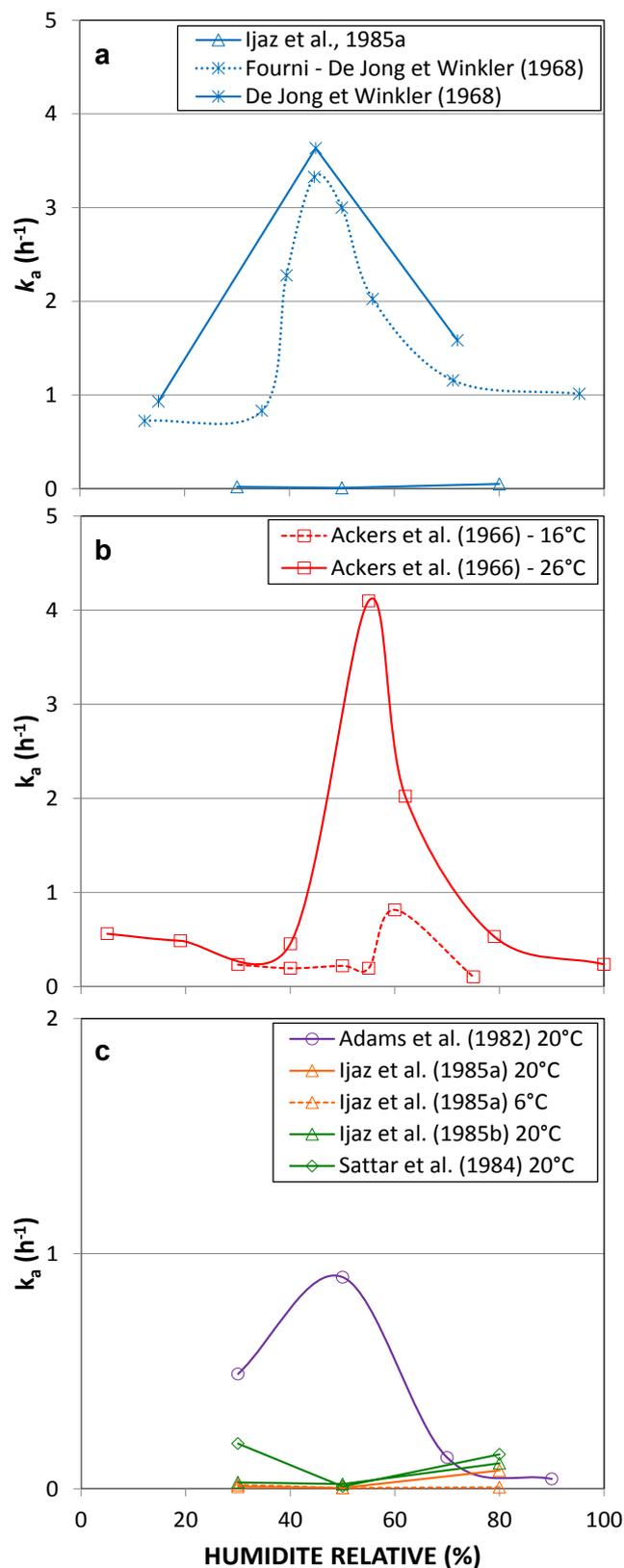
De toute évidence, l'impossibilité de simuler correctement les données acquises à 15°C montrent que d'autres effets de la température doivent être pris en compte, dont très probablement un effet « seuil » sur la stabilité même de l'assemblage des protéines de la capsid, car les forces de cohésion intermoléculaires sont réduites par l'agitation thermique (Ausar et al., 2006 ; Phelps et al., 1995).

#### **IV.3.d. Analyse des nombres de copies génomiques d'ARN viral**

Nous avons revisité les données de Sattar et al. (1985), Ijaz et al. (1985a et b), Adams et al. (1982), De Jong et Winkler (1968), et Ackers et al. (1966). Nous avons utilisé les données, au-delà d'une phase initiale de quelques minutes à 1 heure, correspondant à une période où l'abattement semble lié à de l'inactivation *sensu stricto* et est ajustable par une exponentielle fonction de la durée d'incubation. Ces ajustements nous ont permis d'estimer des coefficients d'inactivation  $k_i$ .

De Jong et Winkler (1968) avaient procédé à ces calculs pour le poliovirus (Figure IV.14a) ; aux humidités relatives de l'air pour lesquelles nous avons accès aux données de bases (i.e. évolutions dans le temps du nombre de virus infectieux), nous avons fait nos propres calculs et retrouvé leurs estimations (Figure IV.14a). On constate que les estimations de coefficients d'inactivation dépendent fortement du virus (Figure IV.14) et de la température (Figure IV.14b).

Si beaucoup de résultats vont dans le sens d'un coefficient d'inactivation maximum aux humidités intermédiaires (Adams et al., 1982 ; De Jong et Winkler, 1968 ; Ackers et al., 1966), d'autres résultats amènent à une dépendance inversée à cette humidité (Sattar et al., 1985 ; Ijaz et al., 1985a et b). Curieusement pour le poliovirus, les 2 tendances sont calculées à partir des données de différents auteurs (Figure IV.14a). Pour le poliovirus, le coefficient d'inactivation maximum calculé atteint 3.6 à 45 % d'humidité relative de l'air et à 20 C, correspondant dans ces conditions à un abattement de 3 log<sub>10</sub> en moins de 2 h. Pour le rotavirus, le coefficient d'inactivation maximum calculé atteint 0.19 à 10 % d'humidité relative de l'air et à 20 C, correspondant dans ces conditions à un abattement de 3 log<sub>10</sub> en 36 h. Pour les virus ayant un coefficient d'inactivation maximum aux humidités intermédiaires, la plage d'humidité correspondant à l'inactivation très rapide du virus peut s'étendre d'environ 30-40 % à 60-70 % d'humidité relative de l'air. Enfin, Ackers et al. (1966) ont travaillé à 2 températures ; nos estimations de coefficient d'inactivation aboutissent à multiplier le coefficient d'inactivation maximal à 16°C par plus de 5 en passant à 26°C. Parallèlement, il semble que ce maximum soit obtenu pour des humidités relatives légèrement inférieures en augmentant de température.



**Figure IV.14 :** Coefficients d'inactivation estimés à partir de travaux antérieurs basés sur des expérimentations pour des virus aérosolisés en réacteur atmosphérique fermé.  
 (a) Données acquises à 20°C sur poliovirus (De Jong et Winkler, 1968 ; Ijaz et al., 1985a), (b) Données sur Mauss Elberfeld virus (Ackers et al., 1966), (c) Données acquises sur reovirus (Adams et al., 1982), coronavirus humain (Ijaz et al., 1985a), rotavirus (Ijaz et al., 1985b), et rotavirus (Sattar et al., 1984).

## IV.4. Conclusion

Ce travail avait comme objectif d'évaluer et décrire l'inactivation du mengovirus murin utilisé comme modèle du virus de l'hépatite A lorsque ce virus est exposé à l'air, et de revisiter des données publiées dans la littérature pour d'autres virus. Nous nous sommes focalisés sur les effets combinés de l'humidité relative de l'air et de la température ; quelques suivis nous ont permis d'aborder l'effet du rayonnement global, et l'effet de l'O<sub>3</sub> comme exemple de molécule oxydante dans l'atmosphère. Le travail a nécessité de concevoir un réacteur atmosphérique miniature adapté à un travail en laboratoire P2, et d'identifier un support permettant la récupération de l'essentiel des virus déposés au préalable. Nous avons utilisé comme traceur du taux de récupération des virus apportés le nombre de copies de leur ARN ; nous avons considéré ce traceur comme valable au minimum en absence de rayonnement et d'O<sub>3</sub>. Nous avons considéré que l'humidité relative de l'air jouait sur l'inactivation du virus aux humidités relatives intermédiaires et nous avons proposé un modèle empirique pour décrire son effet.

Au niveau méthodologique, travailler sur des supports en polypropylène semble avoir permis de récupérer ensuite tous les virus pour une extraction au PBS au 10<sup>ème</sup>. En absence d'O<sub>3</sub> et de rayonnement, les nombres de copies d'ARN viral extrait et dénombré après 4 h d'incubation sont compris entre 30 et 270 % de l'apport estimé. L'emploi du polypropylène ne permet malheureusement pas d'exclure un effet physique de ce support sur l'inactivation des virus, notamment aux humidités relatives de l'air où les forces aux niveaux des interfaces du système « air-virus-eau –polypropylène » pourraient être les plus importantes. Les taux de récupérations de l'ARN viral pour les 4 expérimentations avec rayonnement sont compris entre 10 et 90 % de l'apport, et suggèrent un effet direct des rayonnements incluant quelques rayonnements UV-C, bien que l'apport des virus dans une suspension de PBS ait probablement réduit les risques d'artefacts existant lorsqu'on apporte des composés photosensibilisants (notamment des matières organiques naturelles). L'expérience associant rayonnement et apport d'O<sub>3</sub> a abouti à un taux de récupération de l'ARN viral de 34%. Parmi les facteurs probablement les moins bien maîtrisés, on note les fluctuations d'humidité relative à chaque ouverture du réacteur suivies par un rétablissement lent de l'humidité de consigne en raison du faible débit de l'air balayant le réacteur. On note aussi que l'évaporation de l'eau des suspensions virales déposées dans chacun des cryotubes ne débutait pas simultanément ; il est probable qu'elle ait contribué à l'hétérogénéité des niveaux d'inactivation entre tubes à une même date d'échantillonnage.

A 25°C, la vitesse d'inactivation a augmenté avec la baisse de 80 % à 30 % de l'humidité relative de l'air. Aucune inactivation n'a été détectée à 15°C. Nous avons proposé un formalisme mathématique pour décrire la variation du coefficient d'inactivation  $k_i$  avec l'humidité relative de l'air. Il permet de simuler approximativement nos observations à 25°C, mais il prédit un abattement rapide de l'infectiosité à 15°C, alors que nos observations n'indiquent aucune évolution. Ce contraste suggère que certaines valeurs ou plages de températures jouent un rôle de seuil pour qu'un phénomène puisse se produire ; on peut penser notamment à la stabilité de la capsidie qui dépend des forces de cohésion intermoléculaires réduites par l'agitation thermique. A 25°C, la valeur maximale trouvée du coefficient d'inactivation  $k_i$  est de 26 h<sup>-1</sup> ; elle correspondrait à un abattement de 3 log<sub>10</sub> en 16 min. Les coefficients d'inactivation calculés à partir des données publiées dans la littérature présentent, pour certains virus, le même type de dépendance à l'humidité relative de l'air avec des valeurs maximales toutefois plus faibles que la valeur que nous avons trouvée pour le mengovirus murin. Ils sont spécifiques à chaque virus ; pour certains, on peut avoir une dépendance à l'humidité très différente avec des maximums d'inactivation aux humidités fortes ou faibles.

Ce travail pourrait être amélioré, complété et poursuivi en s'attendant à différentes facettes du problème :

- l'amélioration des procédures pour avoir une meilleure maîtrise de la disparition initiale de l'eau des gouttelettes de suspension virale et pour réduire les perturbations d'humidité relative de l'air à chaque ouverture du réacteur ;
- l'amélioration de la compréhension des processus sous-jacents à l'effet de la température, dont notamment un effet sur la cohésion entre protéines constitutives de la capsid ;
- un travail sur les données obtenues sur supports publiés dans littérature.

## Références:

- Abad F.X., Villena C., Guix S., Caballero S., Pintó R.M., et Bosch A. 2001. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3904-3907.
- Abad F. X., Pinto, R.M., et Bosch A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3704-3710.
- Adams D.J., Spendlove J.C., Spendlove R.S., Barnett B.B., 1982. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 903 –908.
- Akers T. G., Prato C.M., et Dubovi E.J. 1973. Airborne stability of simian virus 40. *Applied microbiology*, 26(2), 146-148.
- Akers T.G., Hatch M.T., 1968. Survival of a picornavirus and its infectious ribonucleic acid after aerosolization. *Appl. Microbiol.* 16, 1811–1813.
- Akers T.G., Bond S., Goldberg L.J., 1966. Effect of Temperature and Relative Humidity on Survival of Airborne Columbia SK Group Viruses. *Appl. Microbiol.* 14, 361–364.
- Ausar S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S., et Middaugh, C. R. 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19478-19488.
- Bae S. C., Park S.Y., Kim A.N., Oh M.H., et Ha S.D. 2014. Survival of hepatitis A virus on various food-contact surfaces during 28days of storage at room temperature. *Food Research International*, 64, 849-854.
- Bates B.C., Kundzewicz Z.W., Wu S., Palutikof J.P. 2008. Climate Change and Water. *Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC Secretariat, Geneva, 210 pp.
- Bixio D., Thoeye C., De Koning J., Joksimovic D., Savic D., Wintgens T., et Melin T. 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination*. Vol. 187, n°1–3, p. 89- 101.
- Butot S., Putallaz T., Amoroso R., et Sanchez G. 2009. Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 4155-4161.
- CAC/GL 79-2012. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food. Codex alimentarius. International Food Standards.
- Cannon J. L., Kotwal G., et Wang Q. 2013. Inactivation of Norovirus Surrogates after Exposure to Atmospheric Ozone. *Ozone: Science & Engineering*, 35(3), 217-219.
- Cao H., Tsai F.T.C., et Rusch K.A. 2010. Salinity and soluble organic matter on virus sorption in sand and soil columns. *Groundwater*, 48(1), 42-52.
- Casanova L.M., Jeon S., Rutala W.A., Weber D.J., et Sobsey M.D. 2010. Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 2712-2717.
- Carducci A., Arrighi S., Ruschi A. 1995. Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant. *Letters in Applied Microbiology* 21, 207-209.
- Chancellor D.D., Tyagi S., Bazaco M.C., Bacvinskas S., Chancellor M.B., Dato V.M., de Miguel F. 2006. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. *Journal of Food Protection* 69, 1468-1472.
- Cook N., et D'Agostino M. 2013. Prevalence and control of hepatitis A virus in fresh produce. *Food Borne Viruses and Prions and Their Significance for Public Health*, 169.
- Costafreda M.I., Bosch A., Pintó R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 804-810.
- 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., Roy S.L. 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 507-528.
- De Jong J.C., et Winkler K. C. 1968. The inactivation of poliovirus in aerosols. *Journal of Hygiene*, 66(04), 557-565.

- DiCaprio E., Culbertson D., et Li J. 2015. Evidence of the Internalization of Animal Caliciviruses via the Roots of Growing Strawberry Plants and Dissemination to the Fruit. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2727-2734.
- D'Souza D. H., Sair A., Williams K., Papafragkou E., Jean J., Moore C., et Jaykus L. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *International journal of food microbiology*, 108(1), 84-91.
- Ensink J.H.J., Van der Hoek W. 2006. Raw wastewater use in agriculture; risk versus benefits. In *Health Impact Assessment for Sustainable Water Management Edited by Lorna Fewtrell and David Kay*. Published by IWA Publishing, London, UK, Chapter 10, pp. 233-248.
- Fracchia L., Pietronave S., Rinaldi M., Martinotti M.G. 2006. Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. *Water Research* 40, 1985-1994.
- Giungato P., Nardone E., Notarnicola L. 2010. Reclamation of treated wastewater in the Apulia región (Italy): state of the art and future perspectives. *J. Commodity Sci. Technol. Quality* 49, 105-120.
- Girard M., Ngazoa S., Mattison K., et Jean J. 2010. Attachment of noroviruses to stainless steel and their inactivation, using household disinfectants. *Journal of Food Protection*®, 73(2), 400-404.
- Graedel T.E. et Crutzen P.J. 1992 Atmospheric change. An earth system perspective. *W.H. Freeman and Company*, New York.
- Hirneisen K. A., et Kniel K. E. 2013. Norovirus surrogate survival on spinach during preharvest growth. *Phytopathology*, 103(4), 389-394.
- Ijaz M. K., Brunner A. H., Sattar S. A., Nair R. C., et Johnson-Lussenburg C. M. 1985a. Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. *Journal of General Virology*, 66(12), 2743-2748.
- Ijaz M.K., Sattar S.A., Johnson-Lussenburg C.M., Springthorpe V.S., 1985b. Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 289-293.
- Jean J., Morales-Rayas R., Anoman M.N., et Lamhoujeb S.. 2011. Inactivation of hepatitis A virus and Norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses). *Food Microbiol.* Vol. 28, n°3, p. 568-572.
- Jensen M.M. 1964. Inactivation of airborne viruses by ultraviolet irradiation. *Applied microbiology*, 12(5), 418-420.
- Jiménez B., Drechsel P., Koné D., Bahri A., Raschid-Sally L., Qadir M. 2010. Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: an overview. In: *Wastewater Irrigation and Health Assessing and Mitigating Risk in Low-Income Countries* (Drechsel P., Scott C.A., Raschid-Sally L., Redwood M., Bahri A. eds.), 3-27.
- Keraita B., Jiménez B., Drechsel P. 2008. Extent and implications of agricultural reuse of untreated, partly treated and diluted wastewater in developing countries. *CAB reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources* 3, 1-15.
- Kennedy C., Baker L., Dhakal S., Ramaswami A. 2012. Sustainable urban systems: an integrated approach. *Journal of Industrial Ecology* 16, 775-779.
- Kim S.J., Si, J., Lee J.E., et Ko G. 2012 Temperature and humidity influences on inactivation kinetics of enteric viruses on surfaces. *Environmental science & technology*, 46(24), 13303-13310.
- Kukavica-Ibrulj I., Darveau A., Jean J., et Fliss I. 2004. Hepatitis A virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 923-934.
- La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali del Istituito superiore di sanità* 46, 266-273.
- Liu K., Wen Z., Li N., Yang W., Wang J., Hu L., Dong X., Lu J., Li J. 2012. Impact of Relative Humidity and Collection Media on Mycobacteriophage D29 Aerosol. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1466-72. doi:10.1128/AEM.06610-11.

- Mbithi J. N., Springthorpe V.S., et Sattar S.A. 1991. Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1394-1399.
- Mara D.D., Sleigh P.A., Blumenthal U.J., Carr R.M. 2007. Health risks in wastewater irrigation: Comparing estimates from quantitative microbial risk analyses and epidemiological studies. *Journal of Water and Health* 5, 39-50.
- Marks P.J., Vipond I.B., Carlisle D., Deakin D., Fey R.E., Caul E.O. 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection* 124, 481-487.
- Marks P.J., Vipond I.B., Regan F.M., Wedgwood K., Fey R.E., Caul E.O. 2003. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiology and Infection* 131, 727-736.
- Masclaux F.G., Hotz P., Gashi D., Savova-Bianchi D., Oppliger A. 2014. Assessment of airborne virus contamination in wastewater treatment plants. *Environmental Research* 133, 260-265.
- McDevitt J.J., Lai K.M., Rudnick S.N., Houseman E.A., First M.W., Milton D.K., 2007. Characterization of UVC Light Sensitivity of Vaccinia Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5760-5766. doi:10.1128/AEM.00110-07
- McDevitt J.J., Rudnick S.N., Radonovich L.J., 2012. Aerosol Susceptibility of Influenza Virus to UV-C Light. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1666-1669. doi:10.1128/AEM.06960-11
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology* 49, 461-87.
- Mik G., de Groot I., Gerbrandy J.L., 1977. Survival of aerosolized bacteriophage phi X174 in air containing ozone-olefin mixtures. *J. Hyg. (Lond.)* 78, 189-198.
- Moe K., et Shirley J. A. 1982. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Archives of virology*, 72(3), 179-186.
- Nazaroff W.W. 2011. Norovirus, gastroenteritis, and indoor environmental quality. *Indoor Air* 21, 353-356.
- Nenonen N.P., Hannoun C., Svensson L., Torén K., Andersson L.M., Westin J., Bergström T. 2014. Norovirus GII. 4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 2352-2358.
- Pachepsky Y., Shelton D.R., McLain J.E.T., Patel J., Mandrell R.E. 2011. Irrigation as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy* 113 (Chapter two), 73-138.
- Phelps D.K., Rossky P.J., Post C.B. 1995. Influence of an antiviral compound on the temperature dependence of viral protein flexibility and packing: a molecular dynamics study. *J Mol Biol* 254, 544-551.
- Pinto R.M., Costafreda M.I., et Bosch A. 2009. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A . *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75, n°23, p. 7350-7355.
- Qadir M., Bahri A., Sato T., et Al-Karadsheh E. 2010. Wastewater production, treatment, and irrigation in Middle East and North Africa . *Irrig. Drain. Syst.* Vol. 24, n°1, p. 37-51.
- Reynolds K.A, Mena K.D, et Gerba C.P. 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States . *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 192, p. 117-158.
- Renault P. 2014. Wastewater quality and required water quality for irrigation purposes. (Climate-KIC).
- Rodríguez-Lázaro D., Cook N., Ruggeri F.M., Sellwood J., Nasser A., Nascimento M.S.J., D'Agostino M., Santos R., Saiz J.C., Rzeżutka A., Bosch A., Gironés R., Carducci A., Muscillo M., Kovač K., Diez-Valcarce M., Vantarakis A., Bonsdorff C-H, Roda Husman A.M., Hernández M., Poel W.H.M. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews* 36:786-814.
- Sano D., Ohta T., Nakamura A., Nakagomi T., Nakagomi O., et Okabe S. 2015. Culture-Independent Evaluation of Nonenveloped-Virus Infectivity Reduced by Free-Chlorine Disinfection. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2819-2826.

- Sattar S. A., Lloyd-Evans, N., Springthorpe V.S., et Nair R.C. 1986. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *Journal of hygiene*, 96(02), 277-289.
- Sattar S.A., Ijaz, M.K., Johnson-Lussenburg C.M., Springthorpe V.S., 1984. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 879–881.
- Stine S.W., Song I., Choi C.Y., Gerba, C.P. 2005. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *J. Food Prot.* 68, 913–918.
- Syngouna V.I., et Chrysikopoulos C.V. 2010. Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. *Environmental science & technology*, 44(12), 4539-4544.
- Taylor R.G. et al. 2012. Ground water and climate change. *Nature Climate Change*, published online.
- Tseng C.C., Li C.S. 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Sci. Technol.* 40, 683–689. doi:10.1080/02786820600796590
- Urbanucci A., Myrmel M., Berg I., Von Bonsdorff C. H., et Maunula L. 2009. Potential internalisation of caliciviruses in lettuce. *International journal of food microbiology*, 135(2), 175-178.
- Van der Bruggen, B. 2010. The global water recycling situation. *Sustainability Science and Engineering*, 2, 41-62.
- Vega E., Smith J., Garland J., Matos A., et Pillai S.D. 2005. Variability of virus attachment patterns to butterhead lettuce. *Journal of Food Protection*®, 68(10), 2112-2117.
- Veligura A., Khuler M., Fritzsche W., Scharff P., Risch K., Lytvyn P., Gorchinsky A., Buzaneva E. 2006. UV-Induced DS (SS)-DNA Damage: Optical and Electrical Recognition. In Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on "Cell Biology and Instrumentation: UV Radiation, Nitric Oxide and Cell Death in Plants" (Y. Blume, D.J. Durzan, P. Smertenko Eds), 371, 109-121.
- Walker C.M., Ko G., 2007. Effect of Ultraviolet Germicidal Irradiation on Viral Aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5460–5465.
- Wei J., Jin Y., Sims T., et Kniel K. E. 2010. Manure-and biosolids-resident murine norovirus 1 attachment to and internalization by Romaine lettuce. *Applied and environmental microbiology*, 76(2), 578-583.
- Wei J., Jin Y., Sims T., Kniel K.E. 2011. Internalization of murine norovirus 1 by *Lactuca sativa* during irrigation. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2508-2512.
- WHO 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Geneva : WHO (World Health Organization).
- Zhao Y., Aarnink, A.J.A., Dijkman R., Fabri T., De Jong M.C.M., Groot Koerkamp P.W.G., 2012. Effects of Temperature, Relative Humidity, Absolute Humidity, and Evaporation Potential on Survival of Airborne Gumboro Vaccine Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1048–1054. doi:10.1128/AEM.06477-11
- Zhuang J., et Jin, Y. 2008. Interactions between viruses and goethite during saturated flow: Effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *Journal of contaminant hydrology*, 98(1), 15-21.
- Ziros P.G., Kokkinos P.A., Legaki E., Vantarakis A. 2011. Development of an optimized method for the detection of airborne viruses with real-time PCR analysis. *Virology Journal* 8, 369-37