

Chapitre III) Aérosolisation des virus à partir du sol

Ce chapitre doit donner lieu à la publication suivante en cours de rédaction :

Girardin G. et al., 2015. Virus aerosolization from soil during windy periods following irrigation by contaminated water. *Journal of Applied Microbiology*, Soumission prévue avant la fin mai 2015.

III.1. INTRODUCTION :	45
III.2. MATERIELS ET METHODES.....	46
III.2.a. Matériels	46
III.2.b. Protocoles expérimentaux et plan d'expérience.....	48
III.2.c. Modélisation des processus, analyse d'incertitude et traitement des données	53
III.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	59
III.3.a. Incertitudes et biais liés aux métrologies et protocoles expérimentaux.....	59
III.3.b. Résultats des expérimentations sous tunnels.....	68
III.4. CONCLUSION	83

Résumé :

Réutiliser les eaux usées en irrigation agricole aide à répondre aux besoins croissants d'eau, réduit leur décharge dans des 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, mais rien n'est connu sur le devenir de virus déposés à la surface du sol ou de végétaux. Ce travail visait à évaluer et décrire l'aérosolisation de virus apportés par irrigation sur sol nu. Des suivis expérimentaux ont été réalisés en placettes semi-contrôlées contaminées par des mengovirus murins à l'aide de la méthode des tunnels ventilés. Les virus en suspension dans l'air étaient piégés en sortie de tunnel par des bio-collecteurs (Impingers et filtres) dont nous avons évalué les performances, et leur ARN a été quantifié en RT-qPCR. Un modèle a été proposé pour un ou plusieurs pools de virus aérosolisables, chacun étant caractérisé par sa taille et un coefficient cinétique d'aérosolisation. Nous l'avons utilisé pour générer des expériences numériques reproduisant la variabilité des mesures réelles, et pour ajuster à ces expériences numériques des simulations portant soit sur l'aérosolisation cumulée soit sur l'aérosolisation instantanée. Les ajustements sur l'aérosolisation instantanée donnent des estimations plus précises du coefficient cinétique d'aérosolisation ; il n'en va pas forcément de même pour la quantité de virus aérosolisables. Toutefois, l'existence de plusieurs pools de virus peut rendre l'estimation de ce dernier coefficient plus aléatoire. Les Impingers aboutissaient à des estimations d'aérosolisation plus élevées que les filtres, en conséquence probablement d'un piégeage initial moins bon et/ou d'une extraction directe des ARN viraux sur les filtres incomplète. Pour un débit d'air les traversant de $4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, les Impingers piègent environ 77 % des virus dans l'air les traversant avec un coefficient d'aérosolisation des virus de 0.11. Les expériences sous tunnels ventilés montrent qu'entre 0.8 et 23 % des virus apportés ont été remobilisés. On distingue un pool de virus aérosolisés quasi-instantanément, d'un ou plusieurs pools cinétiques de virus aérosolisés plus progressivement. Ce premier pool correspondrait approximativement aux virus aérosolisés durant les 30 premières minutes, soit à environ 1/3 de la quantité totale de virus aérosolisés. Pour les virus mobilisés progressivement, le coefficient cinétique d'aérosolisation varie entre 0.007 et 0.21, correspondant à 90 % des virus du pool aérosolisés au bout de respectivement 13 j et 11 h. L'ajustement simultané des simulations aux données de toutes les expériences sous tunnel permet de reproduire les expériences *in situ* et de mieux identifier quelques données aberrantes. En utilisant cet ajustement, les émissions sont comprises entre 1 % et 10 % de la quantité initiale apportée.

Mots clés : Réutilisation des eaux usées, Irrigation, Sol, Virus, Aérosolisation, Impinger

III.1. Introduction :

À l'échelle planétaire, on assiste à des problèmes croissants de ressources en eau, en quantité et en qualité (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 (Van der Bruggen, 2010 ; Raschid-Sally and Jayakody, 2008 ; Ensink et Van der Hoek, 2006), la réutilisation d'eaux usées en irrigation permet d'exploiter cette ressource marginale, limite son rejet dans l'environnement, et peut contribuer à fertiliser les cultures (en N, P ...) en fonction des traitements effectués sur ces eaux (Jiménez et al., 2010 ; Bixio et al., 2008 ; Keraita et al., 2008 ; Ensink et Van der Hoek, 2006). Elles présentent toutefois des risques pour les productions agricoles, l'environnement et la santé (Pachepsky et al., 2011). Eu égard à la santé, les risques résultent de la présence de produits chimiques et d'agents pathogènes de l'homme, dont certains virus entériques peu éliminés par les traitements secondaires de type 'boues activées' (Da Silva et al., 2011 ; La Rosa et al., 2010 ; Petrinca et al., 2009 ; Carducci et al., 2009 ; Van den Berg et al., 2005 ; Pusch et al., 2005). Ils sont de plus en plus souvent incriminés dans les épidémies d'origines hydrique (Craun et al., 2010 ; Reynolds, 2008 ; WHO, 2006 ; Koopmans et Duizer, 2004) 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). La commission du Codex Alimentarius a reconnu en 2012 que les virus entériques de l'homme les plus fréquemment mentionnés comme responsables d'épidémies d'origine alimentaire sont les norovirus et le virus de l'hépatite A (CAC/GL 79-2012).

Apportés par les eaux usées lors d'irrigations, 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 et 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). Quelques études ont traité du transfert de bactéries au cours d'aspersion (Goldstein et al., 2014 ; Blatny et al., 2008). En contraste et à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la ré-aérosolisation de virus déposés à la surface des feuilles ou des tiges de plantes, ou du sol, bien que des modèles d'évaluation quantitative des risques microbiens (QMRA) ont déjà été proposés pour la contamination par voie aérienne d'agriculteurs réutilisant des eaux usées (Mara et al., 2007). En environnement intérieur, des contaminations *via* l'air par des virus entériques de l'homme avec présence de symptômes ont été clairement démontrées au restaurant (Marks et al., 2000), à école (Marks et al., 2003) et en hôpital (Nenonen et al., 2014). Le transfert peut 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). Certaines études ou synthèses bibliographiques traitent de la remise en suspension des bioaérosols, parfois appelés libération passive, en environnement extérieur sans faire référence à des virus (par exemples Morris et al. (2014), Layshock et al. (2012), Jones et Harrison (2004), et Aylor (1990) parmi d'autres). *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).

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer la possibilité pour les virus initialement déposés au sol par l'irrigation d'être aérosolisés pendant des périodes venteuses, en se concentrant sur la quantité totale de virus aérosolisés - exprimée en fraction de la quantité totale de virus apportés - et la vitesse à laquelle ce phénomène se produit. La quantité totale de virus pouvant être aérosolisés et la cinétique d'aérosolisation ont été analysées en fonction du contexte : rayonnement solaire, vent, humidité du sol, température de surface, et composition chimique de l'eau d'irrigation. Pour atteindre ces objectifs, nous avons adapté la technique des tunnels ventilés déjà utilisée pour étudier la volatilisation de NH_3 et de pesticides (Bedos et al, 2002 ; Lockyer, 1984 ; Loubet et al, 1999a et 1999b), évalué le rendement de filtres en polycarbonate et d'Impingers AGI-4 (West et Kimber., 2015 ; Verreault et al., 2008 ; Burton et al., 2007 ; Lin et al., 1997) utilisés pour piéger des virus aérosolisés et proposé une correction des données, et évalué l'incertitude et les biais possibles dans les estimations de paramètres liés à la quantité totale de virus pouvant être aérosolisés et à la cinétique d'aérosolisation. Pour ce faire nous nous avons utilisé le mengovirus murin, déjà utilisé comme modèle de picornavirus (virus hépatite A...) (Sano et al., 2015 ; Costafreda et al., 2006 ; Pinto et al., 2009) apporté par irrigation à un Cambisol (FAO classification).

III.2. Matériels et méthodes

III.2.a. Matériels

III.2.a.i. *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 BGM (Buffalo Green Monkey Kidney) obtenues par Barron et al. (1970) et utilisées pour la production du virus.

Les mengovirus ont été produits en milieu Dulbecco's modified Eagle (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_2 à 37°C. Un inoculum viral d'environ 10^5 gc est mis en contact pendant 60 min avec des cellules BGM à 90% de confluence en flacons de 175 cm^2 (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. Le surnageant est récupéré et aliquoté en doses d'environ 35-40 mL stocké en tubes stériles de 50 mL (Falcon®) et conservé à -21°C.

Pour chacune des expériences sous tunnel ventilé, 3 doses de 35-40 mL à environ 10^8 gc.mL⁻¹ ont été mises à la température ambiante environ 1 h avant le lancement de l'expérimentation ; 100 mL sont ensuite dilués avec de l'eau pure (type MilliQ) ou de l'eau usée autoclavée pour aboutir à 1 L de suspension virale (10^{10} gc.L⁻¹). Cette suspension a été apportée de manière aussi homogène que possible

à l'aide d'un pulvérisateur. Pour les expériences de qualification des Impingers, l'un des deux types de biocollecteurs utilisés, la suspension virale initiale était diluée au 20^{ème} dans du PBS au 10^{ème}.

La quantification du génome du mengovirus murin a été réalisée par RT-qPCR sans étape de pré-concentration. En pratique, pour chaque solution de piégeage des Impingers, nous avons extrait entre 55 et 60 μL d'ARN viral à partir des 140 μL d'échantillon au moyen d'un kit d'extraction (kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen®, ref : 52906)). Pour les filtres, une extraction directe par tampon de lyse a été réalisée au moyen du kit d'extraction. La RT-qPCR a été réalisée au moyen du kit RNA UltraSense® One-step Quantitative RT-PCR System (Life Technologies ® ref 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 « reverse » est de 1124 nM, 625 nM pour les amorces « Forward » et 312 nM pour les sondes. Toutes les amplifications ont été réalisées avec l'appareil Mx3005P PCR quantitative (qPCR) (Agilent Technologies, France).

III.2.a.ii. *Le sol*

Les mesures ont été effectuées sur un cambisol calcaire (classification FAO) du domaine Saint-Paul de l'INRA (43°92' N, 4°88' E) à proximité d'Avignon. Les propriétés du sol prélevé entre 0 et 10 cm de profondeur, et mesurées au Laboratoire d'Analyse des Sols (LAS-INRA) à Arras (France), étaient les suivantes : CaCO_3 362 g.kg^{-1} ; et après décarbonatation, argile 238 g.kg^{-1} ; limon 227 g.kg^{-1} ; sable 169 g.kg^{-1} ; carbone organique 14.3 g.kg^{-1} ; N total 1.35 g.kg^{-1} ; N-NH_4^+ 1.45 mg.kg^{-1} ; N-NO_3 6.89 mg.kg^{-1} . Le pH(eau) du sol et le pH(KCl 1 M) étaient respectivement de 8.38 et 7.75. Les concentrations en Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , et Na^+ extraits à l'eau étaient respectivement de 0.114, 0.0089, 0.0653 et 0.0105 g.kg^{-1} ; la concentration en Cl^- et en S total extraits à l'eau étaient respectivement de 0.0079 et 0.00487 g.kg^{-1} . La conductivité électrique de la solution pour un rapport massique solution/sol de 5 était de 0.144 mS.cm^{-1} . Le sol a été maintenu en herbe de 2011 à mars 2014 ; le 12 mars de cette dernière année, il a été retourné sur une profondeur d'environ 15 cm ; le sol a alors été travaillé sur une profondeur d'environ 10 cm successivement par un rotavator le 25 mars, puis à nouveau par un rotavator et une herse rotative le lendemain.

La structure du sol obtenue est illustrée par la Figure III.1. La terre en surface était principalement constituée de mottes de 5 à 40 mm de diamètre. Pour chaque expérience *in-situ*, le sol contaminé par l'expérience précédente était excavé sur environ 10 cm et remplacé par du sol de la même parcelle prélevé à quelque mètres sur la même profondeur. La structure du sol en surface ne présentait pas de différence apparente entre expériences.



Figure III.1 : Structure du sol des placettes expérimentales.

Les précipitations annuelles moyennes sont de 687 mm pour la période 1989-2014. En 2014, elles ont été plus élevées (969 mm). Entre le début (20 mai) et la fin (10 juillet) des expériences, les précipitations ont été de 138 mm.

III.2.a.iii. Les eaux :

Deux types d'eaux d'irrigation contaminées ont été utilisés pour l'irrigation précédant les suivis d'aérosolisation des virus :

- de l'eau de type MilliQ ou de l'eau Ultrapure obtenue par filtration et passage sur résine échangeuse d'ions et sous UV ;
- de l'eau usée prélevée à la sortie de 8 lagunes utilisées comme complément avant réutilisation au traitement secondaire des eaux usées par boue activée à Clermont-Ferrand. Afin d'éliminer tous les microorganismes (forme végétative et spores) l'eau a été autoclavée 3 fois avec approximativement 12 à 20 h à température ambiante entre chaque autoclavage. L'eau usée contenait 10 mg.L⁻¹ de matière organique en suspension et 24.1 mg.L⁻¹ de carbone organique. Les matières minérales incluent Ca²⁺ (93.6 mg.L⁻¹), Mg²⁺ (17.5 mg.L⁻¹), K⁺ (34.4 mg.L⁻¹), Na⁺ (87.5 mg.L⁻¹), NH₄⁺ (4.89 mg N.L⁻¹), NO₃⁻ (0.6 mg N.L⁻¹), Cl⁻ (129 mg.L⁻¹) et S total (21.5 mg.L⁻¹), et son pH était de 8.34. La suspension virale épanchée est préparée en mélangeant 100 mL de la suspension virale mère avec 900 mL d'eau ultrapure ou d'eau usée autoclavée. Un litre de cette suspension virale est pulvérisée sur les placettes à environ 15 cm du sol de façon à couvrir toute la surface soit 10¹⁰ virus déposés.

III.2.b. Protocoles expérimentaux et plan d'expérience

III.2.b.i. *Protocole expérimental :*

Pour chaque expérience sous tunnel, une placette de sol de 0.5 × 2 m (1 m²) préalablement travaillée, voire irriguée, était arrosée uniformément à l'aide d'un pulvérisateur par 1 L d'eau contenant environ 10¹⁰ gc.L⁻¹ de mengovirus murin à une date initiale (t=0). La placette était alors recouverte d'un plexiglass de forme plus ou moins hémicylindrique, délimitant un tunnel d'environ 0.24 m² de section. A une extrémité du tunnel ainsi formé, une cheminée permettait de prélever l'air balayant le tunnel à environ 2 m au-dessus du sol ; à l'autre extrémité, un ventilateur tendait à expulser l'air du tunnel et permettait d'imposer dans le tunnel un vent de vitesse choisie entre 11 et 30 km.h⁻¹ (Figure III.2a-b). Chaque expérience donnait lieu à un suivi *in situ* pendant 2 à 3 jours ; les dates typiques de changement des impingers et des filtres après le début de chaque expérience étaient de 0.5, 4, 8.3, 22, 27, 33, 48, 56 h.

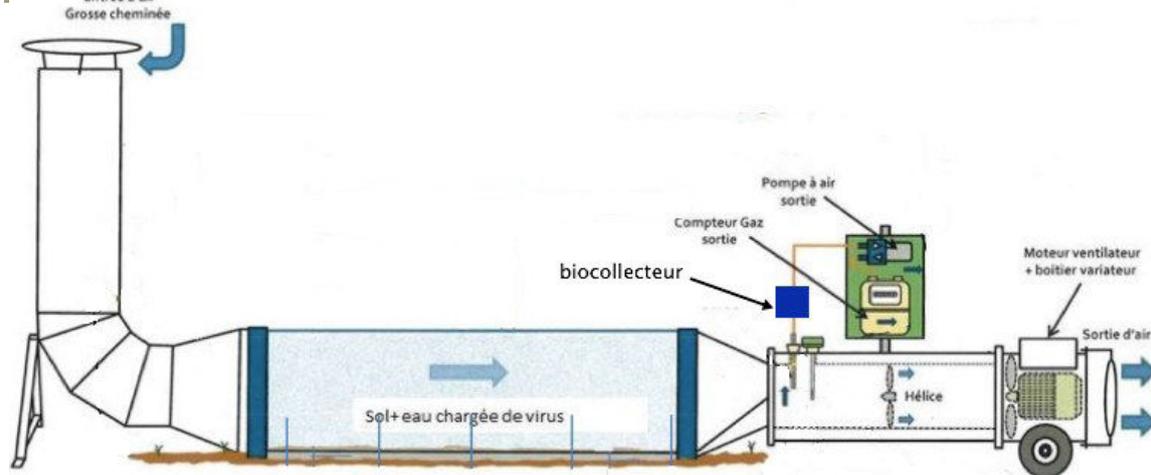


Figure III.2 : Tunnels ventilés : (a) Photographie, et (b) schéma du tunnel.

Deux biocollecteurs ont été utilisés :

- des Impinger AGI-4 (Ace Glass incorporated, USA, réf : 7541) ayant été utilisés dans des travaux pour la détection de virus respiratoires (Hermann et al., 2006), et de bactériophages (Liu et al., 2012 ; Harstad, 1965). L'air était aspiré en sortie de tunnel avant le ventilateur au niveau des perforations d'un système perforé tri-branché par une pompe HX16908 ou GR42X25 (ACP, Mennecey, France) avec un débit entre 2.9 et 4.6 L.min⁻¹. L'air prélevé traversait 20 mL d'une solution de piégeage contenue dans des Impingers ;

- des filtres polycarbonate de 0,8 µm (Whatman® Nucleopore réf. : 111109) déjà utilisés pour le piégeage d'un bactériophage (Burton et al., 1993) avec un débit d'environ 5 L.min⁻¹.

La solution de piégeage utilisée dans les Impingers a été du PBS au 10^{ème} pour les deux premières expériences (1 et 2), puis un milieu de culture (9.4 g MEM (Sigma, réf. : A0769) ; 14 ml HEPS 1 M (Sigma, réf. : A3268) ; 20 ml Bicarbonate (Gibco ®, réf. : 25080-060) ; 5 ml –Antifongique (Gibco ®, Fungizone réf. : 15290-018) ; 10 ml Antibiotique (Gibco ®, Pen Strep réf. : 15290-018) ; 100 µl Antifoam B (Sigma, réf. : A3268) ; Qsp 1 L d'eau MilliQ).

A différentes dates, les Impingers et les filtres (et porte-filtres) en place étaient remplacés par de nouveaux Impingers pré-remplis avec leur solution de piégeage et par de nouveaux filtres. La quantité récupérée de solution de piégeage des Impingers était mesurée, et conservée à -21°C pour analyses en RT-qPCR. Les Impingers servant au piégeage des virus sur les temps les plus longs (au-delà de 4 h) recevaient 40 mL de solution de piégeage au lieu de 20 mL. La quantité de virus aérosolisée pendant le temps de piégeage dans un Impinger était estimée à l'aide de l'équation suivante :

$$N_{v-a}(\Delta t) = \left(\frac{C_v \times w_{imp}}{d_{pomp} \times \Delta t} \right) \times v_{wind} \times S_{tun} \times \Delta t \times 1000 \quad (III.1)$$

où Δt est la durée de piégeage dans l'impinger (h), $N_{v-a}(\Delta t)$ la quantité de virus aérosolisés (gc) sous le tunnel pendant l'intervalle de temps Δt , C_v la concentration en virus dans la solution de piégeage de l'Impinger, w_{imp} le volume de la solution de piégeage (L), d_{pomp} est le débit de la pompe en série avec l'Impinger ($L.h^{-1}$), v_{wind} est la vitesse du vent ($m.h^{-1}$), et S_{tun} est la section du tunnel (m^2).

Plusieurs variables ont été suivies parallèlement : humidité des 3 premiers cm environ de la couche de surface du sol, température de surface du sol, humidité relative et température de l'air dans le tunnel, vitesse du vent dans le tunnel.

Cinq sondes d'humidité EC-10 (Decagon Devices Inc., Pullman (WA), USA) ont été placées horizontalement sur la tranche affleurant à la surface du sol, l'axe de la sonde étant à environ 1.5 cm sous la surface du sol ; elles nous ont permis d'accéder à la permittivité diélectrique du sol, elle-même reliée à l'humidité volumique du sol proche de la surface. Les sondes EC-10 ont été préalablement calibrées dans de l'eau, dans du méthanol et sur sol sec ou humide (sol prélevé sur la parcelle expérimentale, tamisé à 2 mm). La température de surface du sol a été mesurée pour chaque tunnel à l'aide de 5 thermocouples de type T (jonction cuivre-constantan) immobilisés en surface du sol, une sonde de platine de type PT100 nous donnant la température au niveau des jonctions de référence.

La température de l'air a été mesurée, pour chaque tunnel, par 2 autres thermocouples de même type scotchés au plexiglass des tunnels avec la jonction sensible cuivre/constantan à environ 50 cm du sol.

Enfin, chaque tunnel a été équipé d'une sonde d'humidité relative de l'air HMP155 (HUMICAP®, Vaisala Oyj, Helsinki, Finlande) en sortie de tunnel. La vitesse du vent a été mesurée par un anémomètre à mesure d'impulsions.

Les données ont été collectées toutes les 10 s et moyennées toutes les 10 min par 2 centrales d'acquisition de données CR10 et CR10X (Campbell Scientific Ltd., Loughborough, Royaume-Uni). Un multiplexeur AM1632 (Campbell Scientific Ltd.) était relié à la CR10X. Les thermocouples étaient connectés à un câblage classique (1 seul métal conducteur) dans un petit boîtier isolé thermiquement et contenant la sonde PT100 de référence ; ce câblage et la sonde PT100 étaient reliés au multiplexeur AM1632 ; les sondes d'humidité volumique EC-10 et la sonde d'humidité relative de l'air HMP155 étaient connectées à ce même multiplexeur. L'anémomètre par mesure d'impulsions était relié directement à la même centrale ou à une CR10 dans le cas de 2 expériences menées en parallèle.

Une station météorologique située sur une parcelle voisine de la parcelle expérimentale nous a permis d'avoir accès au rayonnement global incident, à la température de l'air sous abri à 2 m du sol, à la vitesse du vent et à sa direction, et aux précipitations avec des données toutes les 30 min.

III.2.b.ii. Plan d'expérience :

Sept expériences sous tunnel ventilé ont été suivies. Elles se différenciaient par la vitesse imposée du vent (de 11 à 28 km.h⁻¹), par l'humidité initiale de la couche de surface du sol (de 1.2 à 18.7 % d'humidité volumique au lancement des expériences pour environ les 3 premiers cm du sol) avec notamment apport de 9.5 L d'eau du robinet correspondant à une hauteur de 9.5 mm avant l'irrigation contaminante pour l'expérience n°3, par la nature de l'eau contaminée par les virus (eau pure en dilution de la solution de conservation des virus, ou eau usée autoclavée pour les expériences n°6 et n°7 (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Caractéristiques des 7 expériences menées sous tunnel ventilé.

Toutes les expériences ont duré 55 h à l'exception de l'expérience n° suivie sur 24 h.

Expérience	Conditions imposées			Commentaires ***
	Vitesse du vent (km.h ⁻¹)	Irrigation avant contamination (mm eau)	Eau contaminée	
1 (20- 22/05/2014)	28	-	Eau pure*	T _{air} = 22.2°C θ _{0-3 cm} (t=0)=2.8%
2 (20- 22/05/2014)	11	-	Eau pure*	T _{air} = 22.8°C θ _{0-3 cm} (t=0)=1.7%
3 (2-04/062014)	22	+9.5 mm	Eau pure*	T _{air} = 22.8°C θ _{0-3 cm} (t=0)=18.5%
4 (2-04/062014)	26	-	Eau pure*	T _{air} = 21.8°C θ _{0-3 cm} (t=0)=1.5%
5 (10- 11/06/2014)	25**	-	Eau pure*	T _{air} = 26.8°C θ _{0-3 cm} (t=0)=3.7%
6 (8-10/07/2014)	26	-	Eau usée*	T _{air} = 20.3°C θ _{0-3 cm} (t=0)=3.9%
7 (8-10/07/2014)	11**	-	Eau usée*	T _{air} = 20.9°C θ _{0-3 cm} (t=0)=2.7%

* : Utilisation d'eau ultra-pure (type MilliQ®) ou d'eau déminéralisée (résine échangeuse d'ion, osmose inverse et UV) pour la préparation de la suspension virale ; ** : Vitesse du vent théorique ; *** : Température de l'air dans les tunnels à 50 cm du sol (T_{air}) et humidité des 3 premiers centimètres (θ_{0-3 cm}) moyennée sur l'ensemble de la durée de chaque expérience.

D'autres paramètres ont varié avec les expériences et au cours des expériences, notamment le rayonnement global et la température de surface du sol qui peut directement affecter l'importance des forces de type hydrophile/hydrophobe.

III.2.b.iii. Tests préliminaires sur les Impingers

Nous avons utilisé parallèlement 2 types de biocollecteurs dans ce travail : (i) des Impingers AGI-4 (Ace Glass incorporated, USA, réf. : 7541) contenant une solution de piégeage (solution de PBS au 10^{ème} ou milieu de récupération spécifique) traversée par l'air contenant les virus à raison d'un débit compris entre 3.5 et 4.5 L.min⁻¹ pour les tests de laboratoire et entre 2.9 et 4.6 L.min⁻¹ pour les expériences *in situ* sous tunnel, et (ii) des filtres de 47 mm de diamètre en polycarbonate de porosité

0,8 μm (Whatman® Nucleopore réf. : 111109) tenues par des portes-filtres de 47 mm en polypropylène Swinnex® (HERCK MILLIPORE, réf : SX0004700). L'utilisation de ces biocollecteurs présentait *a priori* des limites susceptibles de biaiser les mesures :

- pour les Impingers, une efficacité de piégeage imparfaite (Dart et Thornburg, 2008), et la possibilité d'une ré-aérosolisation des particules piégées (Lin et al., 1997), en particulier pour les particules hydrophobes (Grinshpun et al., 1997) ;
- pour les filtres, un piégeage imparfait (Verreault et al., 2008 ; Henningson et Ahlberg, 1994) et une élution ultérieure incomplète des virus ou de leur ARN.

L'estimation de la concentration en virus dans l'air était presque toujours plus élevée lorsqu'elle était estimée à partir des Impingers. Nous avons voulu qualifier leurs performances.

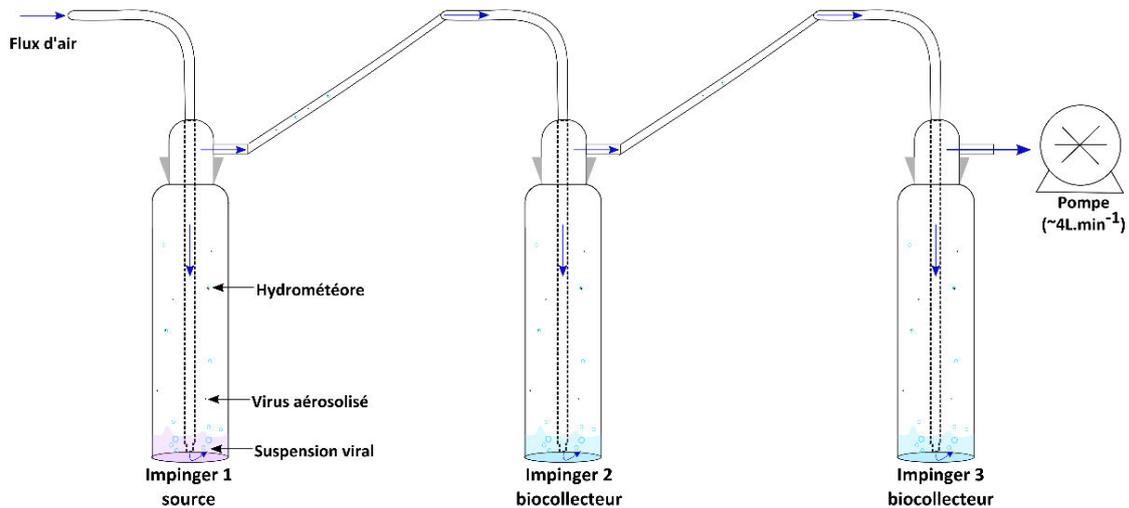


Figure III.3 : Dispositif en série de 3 Impingers pour évaluer la ré-aérosolisation des virus contenus dans la solution de piégeage du 1^{er} Impinger et la fraction des virus entraînés par l'air qui sont piégés dans les Impingers 2 et 3.

Concrètement, nous avons réalisé quelques suivis complémentaires au laboratoire avec 3 Impingers en série. Les 3 Impingers recevaient chacun pour 2 tests 10 mL, pour 3 des tests 20 mL d'une solution de PBS, et pour les 2 derniers 40 mL (Figure III.3). Dans le premier des 3 Impingers, on substituait 0.5, 1 ou 2 mL de solution par le même volume de suspension virale (de concentration de l'ordre de $1.5 \cdot 10^8 \text{ gc.mL}^{-1}$) lorsque l'Impinger avait reçu respectivement 10, 20 et 40 mL de solution. En aval du 3^{ème} Impinger, une pompe HX16908 ou GR42X25 aspirait l'air avec un débit de l'ordre de 4 L.min^{-1} . A quelques dates jusqu'à 6 h, environ 0.2 mL de solution était prélevé dans chaque Impinger pour analyse ultérieure. A chaque date de prélèvement, un ajout de solution de PBS était réalisé si nécessaire pour compenser approximativement les pertes de volume.

Pour chacun de ces suivis, l'analyse a porté sur l'évolution de la quantité de virus contenus dans l'Impinger 1, comme moyen d'évaluer l'importance de la ré-aérosolisation, et sur le rapport des concentrations en virus dans les Impingers 3 et 2 comme un moyen indirect d'évaluer l'efficacité du piégeage.

III.2.c. Modélisation des processus, analyse d'incertitude et traitement des données

III.2.c.i. Qualification des Impingers

Les virus en suspension dans l'air traversant les Impingers sont susceptibles de n'être que partiellement piégés par la solution des Impingers, le taux de piégeage dépendant de la quantité de liquide dans l'Impinger (20 ou 40 mL suivant l'intervalle de temps entre deux mesures), de l'importance du débit d'air traversant le liquide (environ 4 L.min⁻¹) (Grinshpun et al., 1997 ; Li et al., 1999), et éventuellement de la composition du liquide (Yu et al., 2009 ; Tseng et Li, 2005). L'agitation de la solution de piégeage et l'éclatement des bulles d'air à la surface de la solution de piégeage peuvent amener à une ré-aérosolisation des virus (Lin et al., 1997 ; Grinshpun et al., 1997) par formation d'hydrométéores contenant des virus entraînés avec l'air en sortie d'Impinger et/ou en étant remis en suspension dans l'atmosphère pour les colloïdes hydrophobes préalablement retenus au niveau des interfaces 'eau-air'.

Nous avons défini le coefficient de piégeage k_p comme le rapport entre la quantité de virus piégés dans la solution d'un Impinger et la quantité de virus initialement contenus dans l'air ayant traversé l'Impinger ; k_p est compris entre 0 et 1, ces valeurs extrêmes correspondant respectivement à l'absence de piégeage de virus et au piégeage de tous les virus initialement contenus dans l'air. k_p varie *a priori* avec les conditions de piégeage : volume (et hauteur) de la solution de piégeage dans l'impinger, débit d'air traversant la solution, taille et trajectoire des bulles d'air traversant la solution de piégeage, composition chimique de la solution de piégeage, modèle d'Impinger. De la même façon, nous avons défini un coefficient de ré-aérosolisation k_h comme le coefficient de proportionnalité entre la quantité de virus ré-aérosolisée par unité de temps et la concentration en virus piégée dans la solution de piégeage de l'Impinger. k_h varie *a priori* avec les conditions de piégeage. Tant que les conditions dans l'Impinger ne varient pas trop, la variation de concentration en virus C_v dans l'Impinger (gc.L⁻¹) vérifie l'équation suivante :

$$\frac{\partial C_v}{\partial t} = k_p \times \left(\frac{A}{w_{\text{imp}}} \right) - k_h \times C_v \quad (\text{III.2})$$

avec A la quantité de virus entrant dans un Impinger par unité de temps (gc.h⁻¹). En supposant A , k_p et k_h constants en première approximation sur la durée de fonctionnement (piégeage) d'un Impinger, on obtient alors l'évolution de C_v dans le temps :

$$C_v = \left(\frac{k_p}{k_h} \times \left(\frac{A}{w_{\text{imp}}} \right) \right) \times \left(1 - e^{-k_h \times t} \right) \quad (\text{III.3})$$

L'équation (III.4) se substitue à l'équation (III.3) pour un piégeage idéal (i.e. 100% de piégeage, et aucune ré-aérosolisation)

$$C_v = \left(\frac{A}{w_{\text{imp}}} \right) \times t \quad (\text{III.4})$$

Dans les conditions énoncées précédemment, les concentrations expérimentales peuvent alors être multipliées par un facteur de correction f_c dépendant de la durée t de l'accumulation dans l'Impinger, de coefficient de piégeage k_p et du coefficient de ré-aérosolisation k_h :

$$f_c = \frac{1}{k_p} \times \frac{k_h \times t}{1 - e^{-k_h \times t}} \quad (\text{III.5})$$

f_c admet pour limites quand t tend vers 0 ou $+\infty$:

$$\lim_{t \rightarrow 0} (f_c) = \frac{1}{k_p} \quad (\text{III.6a})$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} (f_c) = +\infty \quad (\text{III.6b})$$

Un exemple de simulation est proposé dans la Figure III.4.

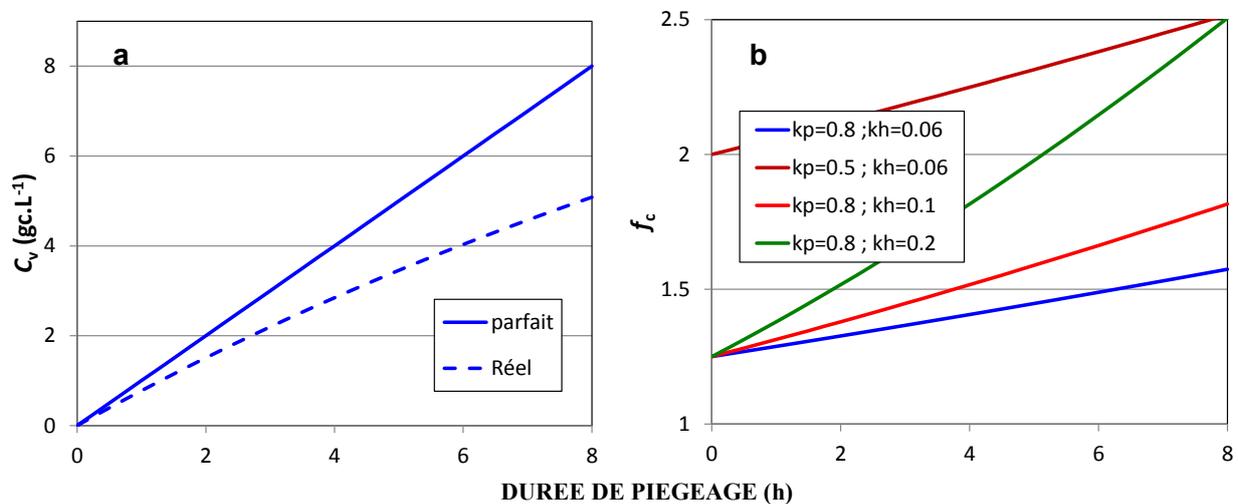


Figure III.4 : (a) Evolution des concentrations en virus dans la solution de piégeage d'un Impinger pour un piégeage total sans ré-aérosolisation ou imparfait avec ré-aérosolisation ($k_p=0.8$ et $k_h=0.05$) ; (b) facteur de correction multiplicatif à appliquer aux concentrations mesurées en virus en fonction de k_p , de k_h et de la durée de fonctionnement de l'Impinger.

Les changements les plus susceptibles de se produire *in situ* sont une variation du niveau de la solution dans l'Impinger (et indirectement de sa composition), ainsi qu'un changement de température, même si les Impingers sont en partie protégés du rayonnement par de l'aluminium.

III.2.c.ii. Analyse d'incertitude sur l'aérosolisation dans la méthode des tunnels ventilés

La méthodologie retenue dans ce travail était potentiellement limitée par les limites inhérentes à la RT-qPCR. Il était nécessaire de faire une évaluation *a priori* des incertitudes pour savoir jusqu'où des écarts entre contextes doivent être discutés et de comparer différents modes d'estimation des mêmes grandeurs. En pratique, il s'agissait pour nous d'appréhender au mieux, pendant les 2-3 premiers jours consécutifs à un apport, l'incertitude sur l'estimation de la quantité maximale de virus aérosolisés (ou quantité mobilisable de virus) et l'incertitude sur l'estimation du coefficient cinétique d'aérosolisation.

Cette dernière grandeur, définie dans la suite de ce document, caractérise la vitesse à laquelle les virus sont remis en suspension dans l'atmosphère. Bien évidemment, la quantité de virus mobilisables et le coefficient cinétique d'aérosolisation dépendent de chaque contexte.

Un travail préliminaire nous a amenés à considérer 2 méthodes d'estimation de ces 2 grandeurs (quantité mobilisable de virus et coefficient cinétique d'aérosolisation) : l'une en travaillant sur la quantité cumulée de virus aérosolisés au cours du temps, l'autre en travaillant sur l'évolution de l'aérosolisation « instantanée » au cours du temps. Il nous fallait voir si l'une ou l'autre de ces méthodes s'avérait plus performante pour estimer les grandeurs recherchées.

Après apport d'une quantité totale de virus N_{v-t} (gc) au sol, on suppose qu'une quantité totale de virus $N_{v-m}(t=0)$ (gc) est mobilisable par le vent, et que le taux d'aérosolisation $\partial N_{v-a}/\partial t$ (gc.h⁻¹) (gc.h⁻¹) est proportionnel à la quantité de virus encore mobilisable à la surface du sol N_{v-a} (gc) à la date t (h) :

$$\frac{\partial N_{v-a}(t)}{\partial t} = -\frac{\partial N_{v-m}(t)}{\partial t} = +k_a \times N_{v-m}(t) \quad (\text{III.7})$$

où k_a est un coefficient cinétique d'aérosolisation (h⁻¹). L'intégration de cette équation aboutit à l'équation suivante :

$$N_{v-a}(t) = N_{v-m}(t=0) \times (1 - \exp(-k_a \times t)) \quad (\text{III.8})$$

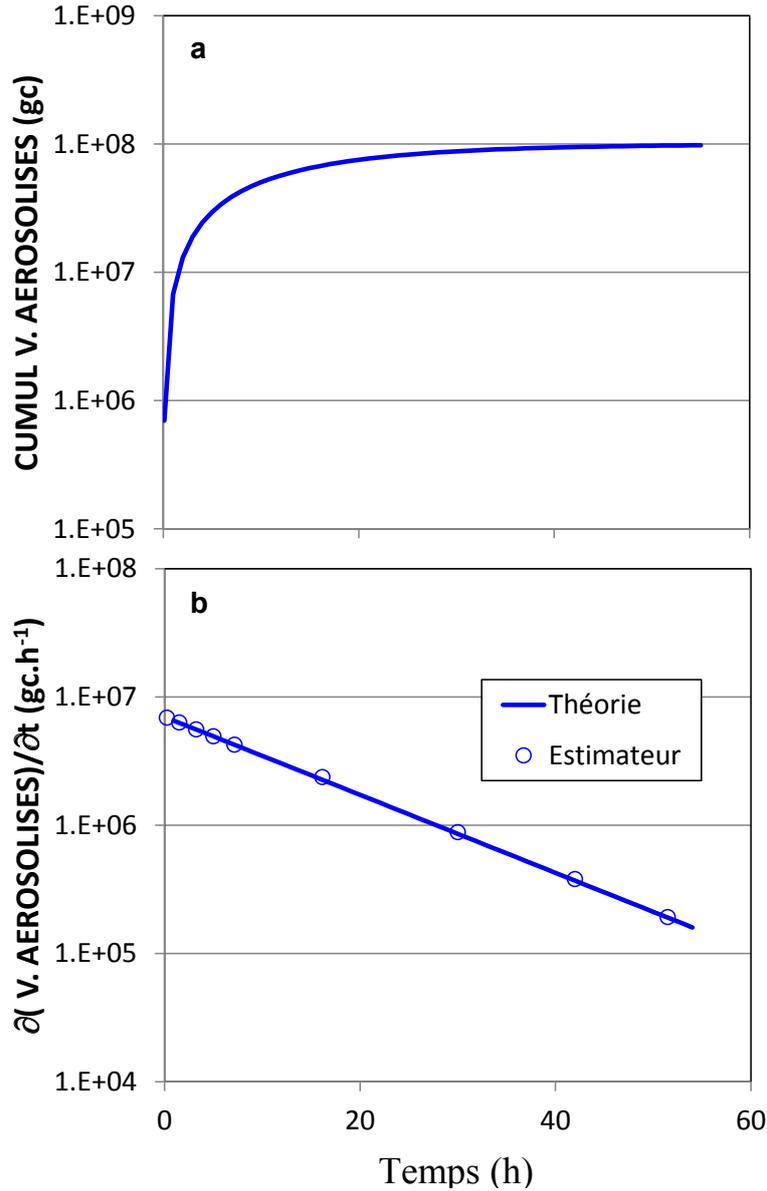
La connaissance de la quantité totale de virus mobilisable au cours du temps $N_{v-m}(t=0)$ et la connaissance du coefficient cinétique d'aérosolisation k_a nous permettent de simuler la quantité cumulée de virus aérosolisés $N_{v-a}(t)$ à la date t et la quantité de virus aérosolisés par unité de temps $\partial N_{v-a}(t)/\partial t$ (gc.h⁻¹) à chaque date t (Figures III.5a-b à titre d'exemple). Cette dernière grandeur n'est pas accessible expérimentalement. Elle peut être estimée à partir de l'aérosolisation cumulée entre les dates t_i (h) et t_{i+1} (h) et affectée à la date $(t_i+t_{i+1})/2$:

$$\overline{\left(\frac{\partial N_{v-a}}{\partial t}\right)}((t_i + t_{i+1})/2) = \frac{(N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i))}{t_{i+1} - t_i} \quad (\text{III.9})$$

où $\overline{\left(\frac{\partial N_{v-a}}{\partial t}\right)}((t_i + t_{i+1})/2)$ (gc.h⁻¹) est un estimateur de $\left(\frac{\partial N_{v-a}(t)}{\partial t}\right)$ pour $t=(t_i+t_{i+1})/2$. L'exemple proposé dans la Figure III.5b montre que cet estimateur peut correctement évaluer l'émission instantanée de virus à la date proposée, même pour des durées de piégeage de virus $t_{i+1}-t_i$ pouvant aller jusqu'à 12 h, pour des mesures sans incertitude.

L'équation (III.10) peut être généralisée pour n pools du même virus en surface de sol, se distinguant par le type d'adhésion au sol et pouvant être caractérisés chacun par sa taille N_{v-m_i} (gc) avec i variant de 1 à n :

$$N_{v-a}(t) = \sum_{i=1}^{n_{pool}} N_{v-m_i}(t=0) \times (1 - \exp(-k_{a_i} \times t)) \quad (\text{III.10})$$



Figures III.5 : Simulation des quantités de virus aérosolisés au cours du temps sous tunnel pour $N_{v-m}(t=0)=10^{+8}$ gc et $k_a=0.07$ h⁻¹. (a) (—) Quantité cumulée de virus aérosolisés $N_{v-a}(t)$ en fonction du temps t ; (b) (—) émission instantanée de virus $\partial N_{v-a}(t)/\partial t$ (gc.h⁻¹) et (○) estimation de $(\partial N_{v-a}(t)/\partial t)$ à partir des quantités totales de virus aérosolisés à 2 dates successives (dates retenues pour le remplacement des Impingers : 0, 0.5, 2.5, 4, 6, 8.3, 24, 36, 48 et 55 h).

Cette équation peut éventuellement être simplifiée lorsqu'on est en présence d'un pool de virus pouvant être aérosolisé quasiment instantanément de taille N_{v1} et d'un pool de virus suffisamment retenu de taille $N_{v-m}(t=0)$ pour que son aérosolisation doive être décrite par l'équation (III.7) :

$$N_{v-a}(t) = N_{v-m}(t=0) \times (1 - \exp(-k_a \times t)) + N_{v1} \quad (\text{III.11})$$

Lorsque les virus en suspension dans l'atmosphère sont piégés par des Impingers pour les expérimentations sous tunnel, les quantités de virus aérosolisés entre les dates t_i et t_{i+1} sont calculées à partir de la concentration finale de virus piégés dans l'Impinger C_{v-imp} (gc.L⁻¹) à la date t_{i+1} :

$$N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i) = \left(\frac{C_{v-imp} \times w_{imp}}{d_{pomp} \times (t_{i+1} - t_i)} \right) \times v_{wind} \times S_{tun} \times (t_{i+1} - t_i) \times 1000 \quad (III.12)$$

où w_{imp} est le volume de solution de piégeage dans l'Impinger (L), d_{pomp} le débit d'air traversant l'Impinger ($L \cdot h^{-1}$), v_{wind} la vitesse du vent ($m \cdot h^{-1}$), et S_{tun} la section du tunnel orthogonale à son axe (m^2). En absence de ré-aérosolisation, la quantité de virus aérosolisés entre les dates t_i et t_{i+1} est directement proportionnelle à la concentration de virus dans l'impinger.

Nous avons fait l'hypothèse que les mesures de RT-qPCR faites à chaque date t_{i+1} suivaient une distribution log-normale ; sous hypothèse que d'autres facteurs n'affectent pas la variabilité des mesures, les quantités estimées de virus aérosolisés $N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i)$ entre 2 dates successives t_i et t_{i+1} suivent alors aussi une distribution log-normale, et les logarithmes des concentrations et des quantités de virus aérosolisés suivent alors une loi normale ayant le même écart-type $\sigma_{a-\log_{10}}$.

A partir d'une simulation parfaite correspondant à la Figure III.5, nous avons simulé 100 expériences numériques en considérant que les mesures de RT-qPCR faites à chaque date t_{i+1} suivaient une distribution log-normale. Nous avons supposé qu'il y avait 3 réplicats à chaque date, bien que leur nombre ait en fait fluctué de 1 à 9. Nous avons par ailleurs supposé que les écarts types $\sigma_{a-\log_{10}}$ sur les \log_{10} des quantités mesurées ne dépendaient pas de l'espérance des quantités aérosolisées.

Pour chaque date de changement d'Impinger, l'espérance de la distribution sur les \log_{10} des quantités de virus aérosolisés entre 2 dates de changement d'Impinger à partir de l'espérance sur la distribution réelle ($\Delta_{cumul} = N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i)$) et de l'écart-type sur les \log_{10} est la suivante :

$$E(\log_{10}(\Delta_{cumul})) = \log_{10}(N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i)) - \frac{\sigma_{a-\log_{10}}^2}{2} \quad (III.13)$$

L'écart-type utilisé pour les expériences numériques a été estimé à partir des expérimentations réelles sous tunnels : à chaque date où c'était possible, nous avons calculé d'une part une estimation de $\sigma_{a-\log_{10}}$ sur les \log_{10} des mesures, d'autre part l'écart entre la valeur maximale et la valeur minimale (i.e. l'étendue) de la distribution des mesures.

Pour chacune de ces 100 expériences numériques, 2 options ont alors été envisagées pour évaluer la quantité cumulée de virus aérosolisés :

- Option 1 : ajustement d'une équation du type de l'équation (III.8) sur les quantités cumulées de virus aérosolisés au cours du temps (cf. Figure III.4a) par minimisation de la somme des carrés des écarts entre données simulées par cette équation et données pour chaque expérience numérique avec comme résultat une estimation directe de N_{v-m} et de k_a ;
- Option 2 : ajustement d'une droite par régression linéaire classique aux \log_{10} des quantités de virus aérosolisés entre 2 dates successives (cf. Figure III.4b) pour chaque expérience numérique. Le coefficient directeur de la droite de régression est directement un estimateur de k_a , et l'ordonnée à l'origine de la même droite est un estimateur du produit $k_a \times N_{v-m}(t=0)$; on a supposé que le rapport des 2 estimations pouvait servir d'estimateur à $N_{v-m}(t=0)$.

III.2.c.iii. Tests statistiques divers ; impact des facteurs environnementaux

Les résultats des 2 étapes précédentes (cf. résultats dans la section III.3.) ont montré qu'on pouvait expliquer l'essentiel des variations des quantités de virus aérosolisables sur un mode cinétique $N_{v-m}(t=0)$ en fonction de la vitesse du vent, de la température de surface du sol et de la qualité de l'eau d'irrigation ; à l'inverse, aucune tendance ne s'est dégagée pour expliquer les variations du coefficient cinétique d'aérosolisation k_a et les quantités de virus aérosolisés presque instantanément en début de suivi N_{v1} .

En utilisant le formalisme mathématique proposé dans la section III.3. (cf. équation (III.19)) et après avoir remplacé les valeurs numériques trouvées par des coefficients a, b et c à estimer (et supposées uniques pour l'ensemble des expériences sous tunnels), nous obtenons alors un formalisme mathématique applicable à l'ensemble des expériences sous tunnels :

$$N_{v-m}(t=0) = \left(a \times v_{wind}^2 \times \exp(-b \times T) \right) + c \times I_{ww} \quad (III.14)$$

Dix-sept paramètres doivent être estimés : les 3 coefficients a, b et c, 7 valeurs de N_{v1} correspondant à chacune des 7 expériences et renommées $N_{v1}(j)$ dans la suite, j étant le numéro de l'expérience, et 7 valeurs de k_a correspondant à chacune des 7 expériences et renommées $k_a(j)$ dans la suite. En pratique, on estime simultanément les 17 paramètres listés ci-dessus par ajustement des logarithmes des quantités simulées de virus aérosolisés aux logarithmes des quantités observées entre la mise en place d'un Impinger à la date t_i et son retrait à la date t_{i+1} . La quantité de virus aérosolisés entre ces dates est estimée par les équations suivantes avec $\Delta t = t_{i+1} - t_i$:

- pour le premier intervalle de temps ($t=0$) faisant intervenir un flux quasi-instantané initial :

$$N_{v-a}(j, \Delta t) - N_{v-a}(j, 0) = N_{v1}(j) + \left(\left(a \times v_{wind}^2 \times \exp(-b \times T) \right) + c \times I \right) \times (1 - \exp(-k_a(j) \times \Delta t)) \quad (III.15)$$

- pour toute date ultérieure ($t > 0$), ne faisant pas intervenir de flux quasi-instantané :

$$\hat{N}_{v-a}(j, t_{i+1}) - \hat{N}_{v-a}(j, t_i) = \left(\left(a \times v_{wind}^2 \times \exp(-b \times T) \right) + c \times I \right) \times (\exp(-k_a(j) \times t_i) - \exp(-k_a(j) \times t_{i+1})) \quad (III.16)$$

Ayant à ajuster des données très variables suivant *a priori* une distribution log-normale avec des erreurs de type multiplicatif, le logarithme de l'erreur correspondant à une variable aléatoire de variance constante, l'ajustement s'est fait par minimisation de l'expression suivante (Eq III.17) :

$$S = \sum_{j=1}^{n_r} \sum_{i=0}^{n_t-1} \left(\ln(\hat{N}_{v-a}(t + \Delta t) - \hat{N}_{v-a}(t)) - \ln(N_{v-a}(t + \Delta t) - N_{v-a}(t)) \right)^2 \quad (III.17)$$

où j est le numéro de l'expérience variant de 1 à n_e , i est le numéro de l'intervalle de temps parmi les n_t intervalles de temps pour l'expérience i . La qualité de l'ajustement a été évaluée par la qualité de la relation entre quantité simulée et quantité observée de virus aérosolisés sur chaque intervalle de temps.

III.3. Résultats et discussions

III.3.a. Incertitudes et biais liés aux métrologies et protocoles expérimentaux

III.3.a.i. *Qualification des Impingers et des filtres*

Concernant les Impingers, 2 types de processus peuvent *a priori* induire une sous-estimation de l'aérosolisation des virus : un piégeage imparfait des virus dans la solution de piégeage, et une ré-aérosolisation des virus préalablement piégés (Lin et al., 1997) pouvant être favorisés pour certains colloïdes par leur caractère hydrophobe (Syngouna et Chrysikopoulos, 2010) ou par la création avec le bullage d'hydrométéores (gouttes d'eau en suspension dans l'air) chargés en virus et entraînés hors de l'Impinger.

L'importance de la ré-aérosolisation a été évaluée à partir des pertes en virus dans le 1^{er} des 3 Impingers en série dans les expériences de qualification des Impingers au laboratoire (Tableau III.2). Il n'y a de corrélation ($P > 0.05$) ni entre quantité initiale de solution de piégeage dans l'Impinger et ré-aérosolisation, ni entre débit d'air et ré-aérosolisation. Si l'on fait la moyenne de l'ensemble des estimations, on aboutit à un rapport moyen de 0.53 entre concentration finale (après 6 h de bullage) et concentration initiale dans le 1^{er} des 3 Impingers : au bout de 6 h, 47% des virus initialement présents dans l'Impinger ont été ré-aérosolisés (soit 10^9 virus aérosolisés). On peut simuler ce phénomène grâce à l'équation (III.2) réduite à la seule ré-aérosolisation pour un Impinger initialement contaminé en virus avec $k_h = 0.11$.

Tableau III.2 : Rapports entre concentration finale (après 6 h de bullage) et concentration initiale dans le 1^{er} des 3 Impingers pour 2, 3 et 2 expériences avec respectivement 10, 20 et 40 mL de solution de PBS diluée au 10^{ème} initialement dans le 1^{er} Impinger.

Expérience (N°)	w_{imp} (mL)	Débit (L air.min ⁻¹)	$C_{v-t=6h}/C_{v-t=0}$	$\overline{C_{v-t=6h}/C_{v-t=0}}$
1	10	3.77	0.24	0.51
2		4.15	0.79	
3		2.69	0.61	
4	20	3.73	0.25	0.46
5		3.44	0.52	
6		3.41	0.61	
7	40	3.38	0.71	0.66

L'efficacité du piégeage dans les Impingers a été évaluée à partir des rapports de concentration en virus dans les Impingers 2 et 3 pour des durées assez faibles pour que la ré-aérosolisation n'affecte pas trop ces concentrations ; au bout de 0.5, 1, 2 et 4 h de fonctionnement, la ré-aérosolisation aboutit à des concentrations respectivement égales à 97, 95, 90 et 80% de ce que serait l'accumulation en absence de ré-aérosolisation pour une valeur de $k_h=0.11$. Une estimation du coefficient de piégeage k_p (Eq III.18) peut être déduite des rapports de concentrations données pour les 4 premières heures des expériences de qualification en laboratoire (Tableau III.3) :

$$k_p = -1 - \frac{C_{v-imp3}}{C_{v-imp2}} \quad (III.18)$$

Tableau III.3 : Rapports à différentes dates entre concentration en virus dans les Impingers 3 et 2.
 (-) : absence de mesure sur les Impinger 3 ou/et 2 montre l'absence

Expérience (N°)	w_{imp} (mL)	$C_{v-imp3}(t)/C_{v-imp2}(t)$			
		0.5 h	1 h	2 h	4 h
1	10	-	-	-	-
2	10	-	-	-	-
3	20	-	0.03	-	0.62
4	20	0.34	0.005	2.8	0.35
5	20	0.75	1.7	0.29	0.19
6	40	0.35	-	0.12	-
7	40	-	0.19	-	0.13

À ce niveau, la qualité de nos données laissait à désirer et il a été difficile d'avoir une estimation précise de ce coefficient de piégeage, au vu de la très grande variabilité des rapports C_{v-imp3}/C_{v-imp2} : les estimations de k_p sont comprises entre 1.78 (!) et 0.99. En excluant les 2 valeurs négatives (bien évidemment) aberrantes, les 1^{er} et 3^{ème} quartiles de la distribution sont égaux respectivement à 0.65 et 0.87, et la médiane est de 0.77. Les ordres de grandeurs obtenus sont en accord avec la littérature : l'Impinger AGI-30, moins performant avec une projection d'air au-dessus du liquide (sans bullage), a une efficacité de piégeage de 82% pour des particules de taille supérieure au μm et un flux d'air de 12.5 L.min⁻¹ (Han et Mainelis, 2012), mais aurait une efficacité de piégeage beaucoup plus faible (~12%) pour des particules de 25 nm (bactériophages MS2 et T3) et un débit d'air de 4 L.min⁻¹ (Hogan et al., 2005). Peu d'études ont évalué les performances de l'AGI-4 : Dart et Thornburg (2008) citent des résultats de Lin et al. (1997) donnant pour ce biocollecteur avec comme liquide de collecte de l'eau distillée, une efficacité de collecte de plus de 90 % pour des particules (particules de polystyrène latex) de tailles comprises entre 0.2 et 2 μm .

Nous avons voulu évaluer en quoi l'efficacité du piégeage et la ré-aérosolisation affectaient les évolutions expérimentales et leur analyse, notamment les estimations des paramètres $N_{v-m}(t=0)$, N_{v1} et k_a . Pour ce faire, les données de l'expérience n°3 sous tunnel ont été analysées parallèlement, à l'état « brut » ou après correction en utilisant le facteur défini dans l'équation (III.5) avec $k_p=0.77$ et $k_h=0.11$, bien que les débits des pompes alimentant les Impinger n'aient pas été tout à fait identiques entre expériences de laboratoire et suivis sous tunnel. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la section III.2.b.i : les estimations de k_a ne sont pas très affectées par la correction des données brutes, au contraire des estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et de N_{v1} qui sont multipliées par un facteur 2 environ avec ces corrections. Pour la suite du travail, nous avons opté pour un traitement des données sans correction, au vu des incertitudes sur les valeurs de k_p et k_h . Les conclusions finales tiennent toutefois compte des biais sur les paramètres estimés.

III.3.a.ii. *Incertitudes sur l'aérosolisation dans la méthode des tunnels ventilés*

Pour simuler des expériences numériques, il nous fallait estimer l'écart-type $\sigma_{a-\log_{10}}$ sur les \log_{10} des quantités aérosolisées calculées à partir des concentrations de virus mesurées dans la solution des Impingers.

En utilisant les expérimentations réelles sous tunnels, nous avons estimé, à chaque date où c'était possible, sur les \log_{10} des mesures de quantités d'une part l'écart entre la valeur maximale et la valeur minimale (i.e. l'étendue), d'autre part l'écart-type de la distribution des mesures (Figure III.6a).

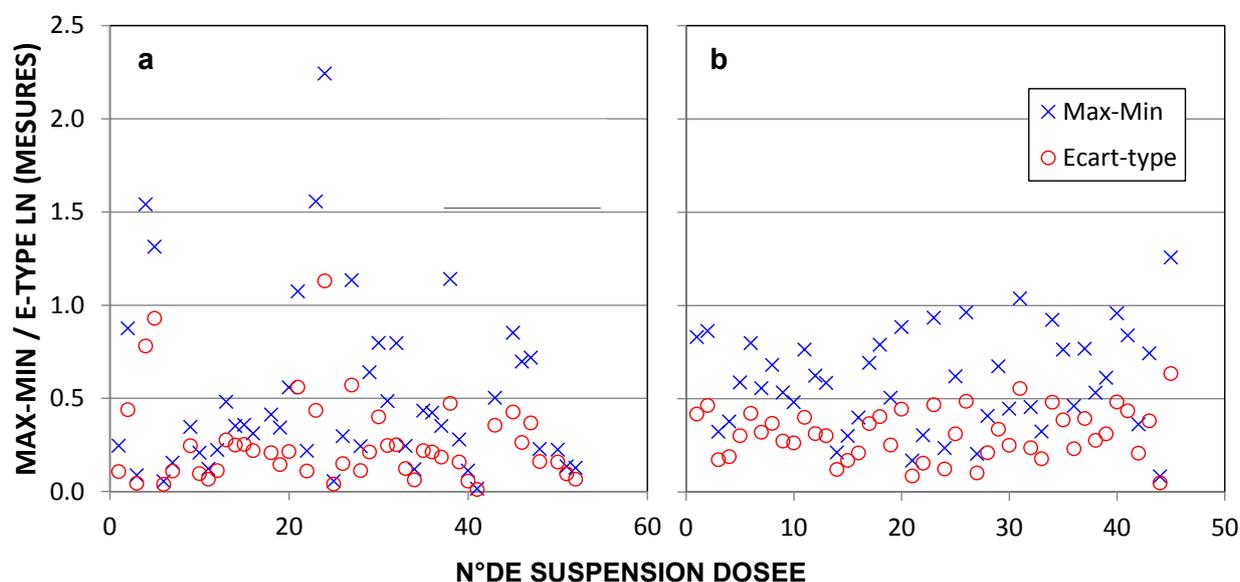


Figure III.6 : Variabilité des \log_{10} des quantités de virus contenues dans chaque Impinger en fin de période d'utilisation avec (x) l'étendue (valeur maximale – valeur minimale) et (o) l'écart-type des mesures. (a) Estimations à partir des mesures réalisées sur la suspension contenue dans chaque Impinger en fin d'utilisation ; (b) estimations à partir des expériences numériques pour $\sigma_{a-\log_{10}}=0.35$.

On constate que les estimations de l'écart-type sont presque toujours inférieures à $0.5 \log_{10}$, voire inférieures à 0.35 (74% des écarts-types des estimations). Nous avons retenu cette dernière valeur (0.35). On aboutit alors à des distributions simulées d'étendue et d'écart-type pour les \log_{10} des quantités de virus aérosolisés sur chaque intervalle de mesure (Figure III.6b) similaires aux distributions réelles (Figure III.6a), bien que les valeurs soient moins dispersées autour de valeurs moyennes. Quelques tests non reportés dans ce manuscrit montrent que cet écart entre réalité expérimentale et simulations résulte au moins pour partie du nombre uniforme de répétitions dans les expériences numériques (3), en contraste du nombre de répétitions réelles variant entre 1 et 9.

Les 100 expériences numériques alors simulées à partir de la situation considérée dans la Figure III.5 ont abouti à chaque date à des estimations des quantités cumulées des virus aérosolisés (Figure III.7a) et de l'aérosolisation « instantanée » de virus dans l'atmosphère (Figure III.7b).

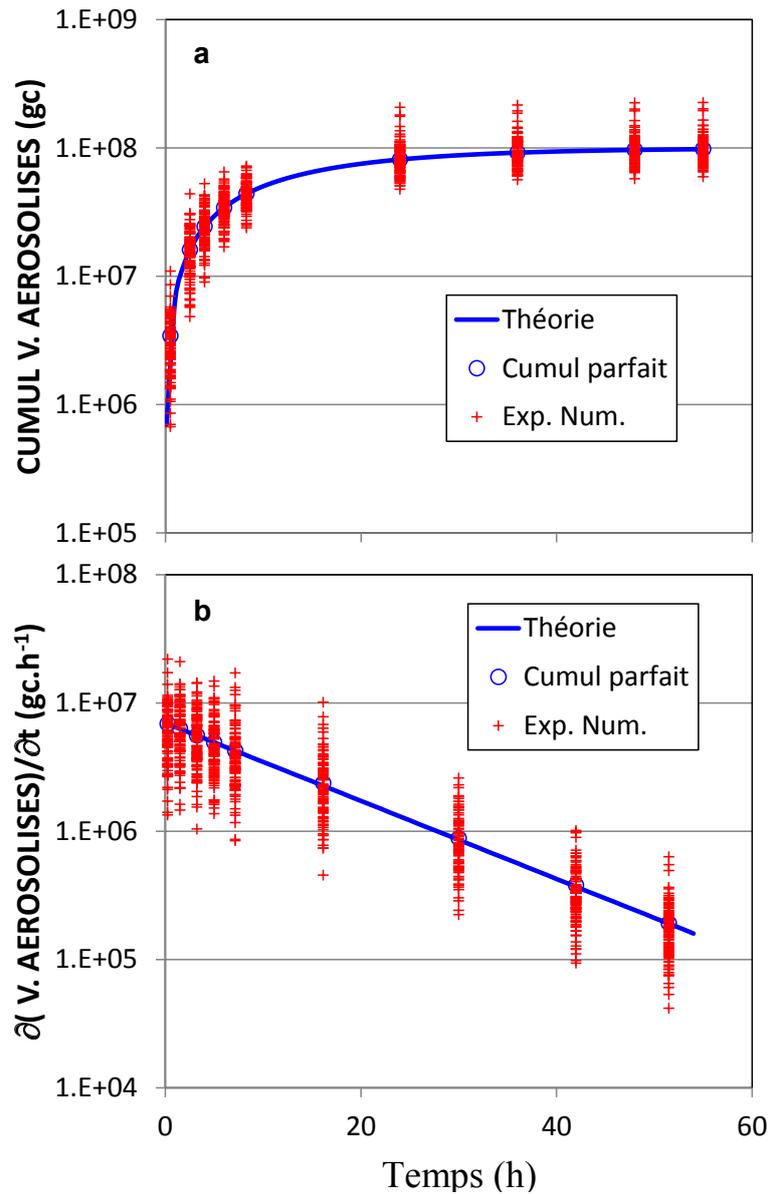


Figure III.7 : Distribution des valeurs issues des 100 expériences numériques (+) au regard de la distribution théorique des valeurs (—), et des dérivées estimées des quantités de virus aérosolisés par différences finies (○) à partir des quantités totales de virus aérosolisés entre 2 dates successives (dates retenues : 0, 0.5, 2.5, 4, 6, 8.3, 24, 36, 48 et 55 h). Calculs pour une aérosolisation théorique avec $N_{v-m}(t=0)=10^{+8}$ gc et $k=-0.07\ h^{-1}$. (a) Quantité cumulée de virus aérosolisés $N_{v-a}(t)$ en fonction du temps t ; (b) émission instantanée de virus $\partial N_{v-a}(t)/\partial t$ ($gc.h^{-1}$).

Trois exemples d'ajustements basés sur l'option 1 sont proposés dans la Figure III.8a ; de la même façon, 3 exemples d'ajustements basés sur l'option 2 sont proposés dans la Figure III.8b.

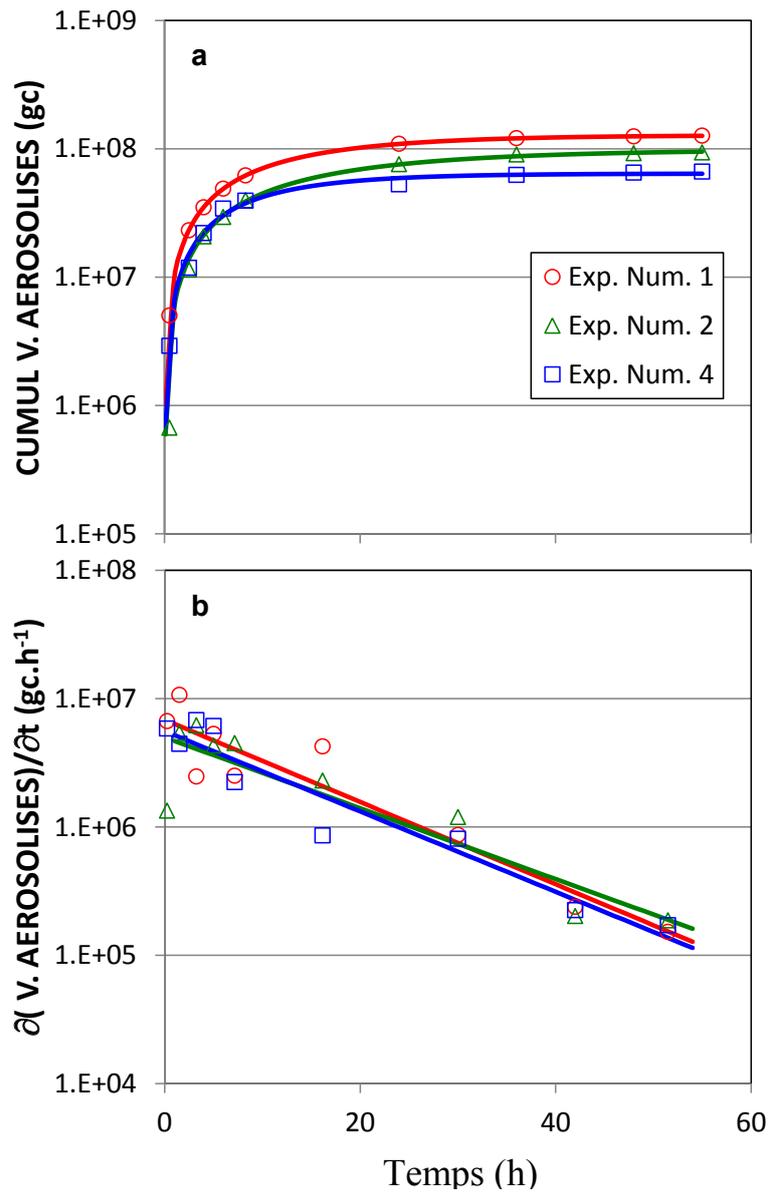


Figure III.8 : Trois expériences numériques sous tunnel en rouge, vert et bleu, ayant pour vraies valeurs $N_{v-m}(t=0)=10^{+8}$ gc et $k=0.07$ h⁻¹. (Symboles) valeurs expérimentales simulées ; (ligne continue) simulations après ajustement selon l'option 1 (a), ou l'option 2 (b).

La comparaison des estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a entre les 2 méthodes fait apparaître la supériorité de la méthode basée sur l'utilisation des flux « instantanés » pour l'estimation de ces 2 valeurs, notamment en termes de variabilité plus faible des estimations (Figure III.9 et Tableau III.4). Avec cette méthode, il semble que la quantité cumulée de virus aérosolisés $N_{v-m}(t=0)$ puisse être estimée avec une précision meilleure qu'avec un facteur 2 (i.e. l'aérosolisation réelle serait entre 0.5 fois et 2 fois la valeur estimée).

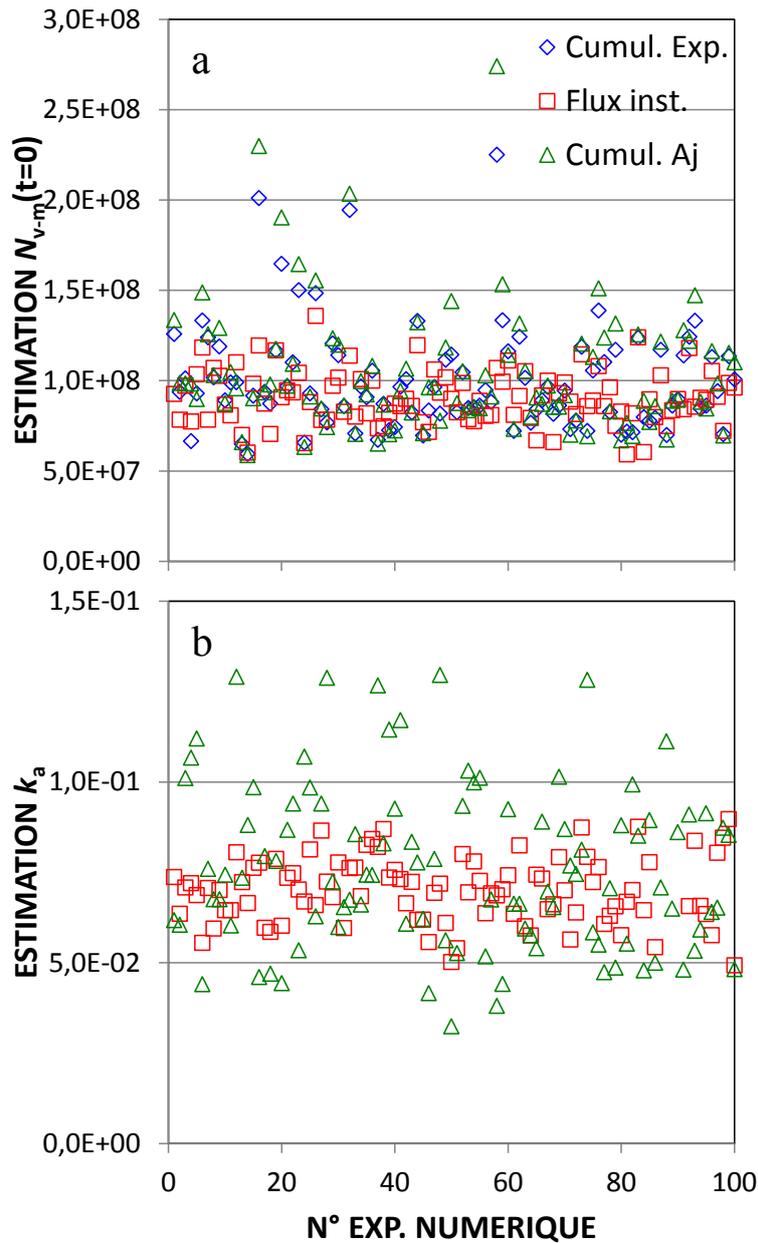


Figure III.9 : Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a suivant l'option 1 (a) ou l'option 2 (b).

A ce stade de l'analyse, nous ne pouvons pas exclure que l'estimation de $N_{v-m}(t=0)$ par l'utilisation des flux « instantanés » soit entachée d'un biais (Tableau III.4) mais, si ce biais est confirmé, il resterait très petit au regard de l'incertitude sur l'estimation de $N_{v-m}(t=0)$. La méthode basée sur l'utilisation des flux « instantanés » semble donner des estimations non biaisées de k_a .

Tableau III.4 : Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a par différentes méthodes (les écart-types sur ces estimations sont donnés entre parenthèses en dessous des estimations moyennes de ces grandeurs).

	Expériences numériques - aérosolisation sur 55 h	Ajustement sur les flux « instantanés »	Ajustement sur les quantités cumulées
$N_{v-m}(t=0)$	$9.98 \cdot 10^{+7}$ ($2.85 \cdot 10^{+7}$)	$9.06 \cdot 10^{+7}$ ($1.5 \cdot 10^{+7}$)	$1.04 \cdot 10^{+8}$ ($3.46 \cdot 10^{+7}$)
k_a	-	$7.01 \cdot 10^{-2}$ ($8.95 \cdot 10^{-3}$)	$7.61 \cdot 10^{-2}$ ($2.28 \cdot 10^{-2}$)

Ainsi, pour une aérosolisation pouvant être décrite par l'équation (III.7) dans des expérimentations sous tunnel, il semble tout à fait possible d'estimer la quantité de virus pouvant être remis en suspension dans l'atmosphère à un facteur inférieur à 2 près (Figure III.9a et Figure III.10) grâce à l'utilisation des flux « instantanés ». Cette méthode présente l'avantage de permettre un travail pour un jeu incomplet de données (un accident sur un Impinger ...) ; par contre et concernant l'estimation de $N_{v-m}(t=0)$, sa validité est plus fortement conditionnée par la validité des hypothèses du modèle (conditions constantes sur la période analysée pour que l'équation (III.7) puisse être intégrée et aboutir à l'équation (III.8)). Il est toujours possible de recourir à la méthode basée sur l'analyse des quantités cumulées. Elle amène parfois à des estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a éloignées des valeurs réelles.

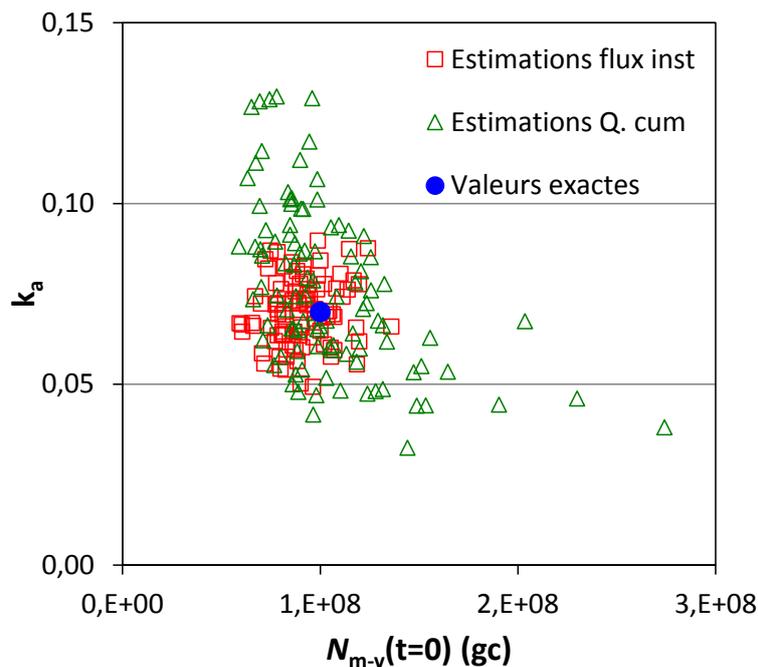


Figure III.10 : Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a par l'utilisation des quantités aérosolisées cumulées (option 1) et des flux instantanés (option 2).

Des limites de 2 types au modèle peuvent être envisagées :

- le changement des conditions dans le temps (humidité de surface du sol, vitesse du vent, température ...)
- la distinction de pools de virus suivant leur niveau d'attachement ou de piégeage par le sol. On peut envisager des virus à peine retenus par le sol (pouvant s'envoler au moindre mouvement d'air), d'autre moyennement retenus, et d'autres fortement très fortement retenus.

A titre d'illustration du 2^{ème} type de limites envisagées, nous avons considéré 3 pools viraux de tailles et de coefficients cinétiques d'aérosolisation donnés (Tableau III.5).

Tableau III.5 : Définition de 3 pools de virus suivant leur niveau d'attachement au sol.

Virus	Pool 1*	Pool 2**	Pool 3***
$N_{v-m}(t=0)$	$3 \cdot 10^{+7}$	$3 \cdot 10^{+7}$	$4 \cdot 10^{+7}$
k_a	2.00	0.20	0.02

* : pool aérosolisé en moins de 2 h ; ** : pool aérosolisé en 20 h environ ; *** : pool partiellement aérosolisé en fin d'expérimentation sous tunnel.

La simulation sans aléa numérique de l'aérosolisation cumulée des virus avec l'équation (III.10) n'est alors plus ajustable parfaitement par un modèle n'ayant qu'un ou 2 pools viraux (Figure III.11).

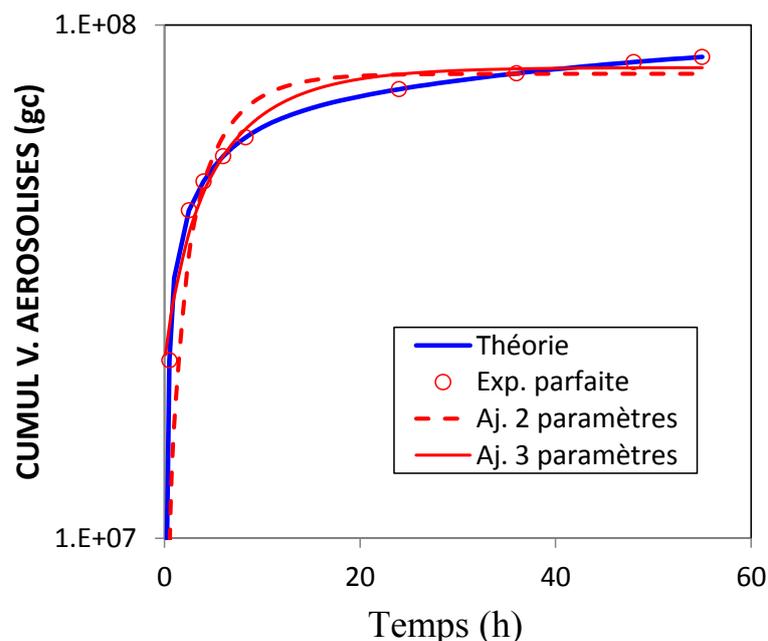


Figure III.11 : Modèle d'aérosolisation avec 3 pools viraux respectivement facilement ($k_a=2$), moyennement ($k_a=0.2$) et difficilement ($k_a=0.02$) aérosolisés dans l'atmosphère. Ajustements en considérant 1 pool viral unique avec 2 paramètres à estimer (cf. Equation (III.10)) ou 2pools viraux avec 3 paramètres à estimer (cf. Equation (III.11)).

Les 2 ajustements effectués permettent des simulations légèrement biaisées par rapport à la réalité. Les paramètres ajustés (Tableau III.6) amènent aux commentaires suivants :

- l'estimation de $N_{v-m}(t=0)$ pour l'ajustement à 2 paramètres est très proche de la somme $N_{v-m}(t=0)+N_{v1}$ pour l'ajustement à 3 paramètres. Ces valeurs (environ $8 \cdot 10^{+7}$ gc) sont inférieures à la taille totale du pool de virus pouvant être aérosolisés (10^{+8} gc), mais l'écart s'explique en partie par les virus du pool 3 ($k_a=0.02$) non encore aérosolisés en fin d'expérience numérique (55 h). L'estimation de N_{v1} est proche de la taille du pool des virus les plus faciles à aérosoliser ;
- les estimations de k_a sont dans la gamme des valeurs imposées sans plus. L'estimation avec ajustement de 2 paramètres est supérieure à l'estimation avec ajustement de 3 paramètres car le coefficient N_{v1} peut être assimilé à une partie du pool des virus les plus faciles à aérosoliser ; l'ajustement des paramètres $N_{v-m}(t=0)$ et k_a se fait alors sur le devenir des virus les moins faciles à aérosoliser.

Tableau III.6 : Paramètres estimés à partir d'une simulation numérique avec 3 pools de virus (cf. Tableau III.5) par ajustement portant sur les quantités aérosolisées cumulées en tenant compte de 2 pools viraux (ajustement à 3 paramètres) ou d'1 seul pool viral (ajustement à 2 paramètres).

Nombre de paramètres estimés	$N_{v-m}(t=0)$	k_a	N_{v1}
2	$8.04 \cdot 10^{+7}$	0.23	-
3	$6.06 \cdot 10^{+7}$	0.13	$2.20 \cdot 10^{+7}$

En conclusion à cette analyse, la modélisation simplifiée de l'aérosolisation de virus et la réalisation d'expériences numériques réalistes au vu des incertitudes en RT-qPCR ont montré que :

- la comparaison des estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a par les 2 méthodes envisagées montre que la méthode basée sur les flux « instantanés » fournit des estimations plus précises de ces 2 paramètres. Le simple cumul expérimental des quantités aérosolisées (i.e. sans passer par l'ajustement d'un modèle) aboutit certes à des estimations non biaisées, mais amène aussi à un fort étalement des valeurs ;
- en utilisant l'option 2 (analyse des flux instantanés), l'incertitude sur les flux cumulés pour 55 h d'aérosolisation est inférieure à $5 \cdot 10^{+7}$ gc, soit moins de 50% de la quantité totale réelle de virus pouvant être aérosolisés ;
- en utilisant l'option 2 (analyse des flux instantanés), l'incertitude sur le coefficient cinétique d'aérosolisation est inférieure à 40 % de la valeur estimée. Une valeur de k_a égale à 0.07 aboutit à la mise en suspension dans l'atmosphère de plus de 90% des virus re-mobilisables en moins de 33 h.

Toutefois et au-delà des incertitudes, notre travail a certainement simplifié la réalité. Il est fort probable que, pour une quantité totale de virus apportée par irrigation (N_{v-t}), la quantité de virus pouvant être remis dans l'atmosphère ($N_{v-m}(t=0)$) doit être subdivisée en plusieurs compartiments selon l'état des virus à la surface du sol (notamment le niveau d'adhésion des virus au sol).

III.3.b. Résultats des expérimentations sous tunnels

III.3.b.i. Estimation des paramètres sur l'expérience n°3 : impacts des options et des corrections

A titre d'exemple, nous présentons une analyse détaillée de l'expérience n°3 sous tunnel (Figure III.12a-d). Pour cette expérience, la Figure III.12a montre qu'on ne peut pas ajuster le modèle présenté dans la section III.1.c.ii en ne considérant qu'un seul pool de virus (Eq. (III.7) et (III.8)) : l'ajustement avec estimation de 2 paramètres ($N_{v-m}(t=0)$ et k_a) simule une aérosolisation biaisée par rapport aux données expérimentales (Figure III.12a). Il est nécessaire de prendre en compte plusieurs pools, au minimum 2 au vu de la possibilité d'ajuster un modèle à 3 paramètres (cf. Eq. (III.11)).

En ne tenant pas compte de la première valeur de flux (correspondant à l'aérosolisation très rapide d'un pool de virus égal à N_{v1} (gc), l'analyse des flux instantanés (Figure III.12b) confirme qu'on peut alors très bien décrire ces flux dans le temps par un modèle avec un seul pool de virus, et ce malgré les variations pendant la durée de l'expérimentation de la température et de l'humidité de surface du sol (Figure III.12c), voire aussi de la vitesse du vent (Figure III.12d). Ce résultat peut paraître surprenant au vu de la baisse importante d'humidité de surface du sol entre 0 et 8 h (respectivement de 18 à 10% volumique) (Figure III.12c) ; toutefois, ces variations concernent en réalité une couche de sol d'épaisseur mal définie mais probablement de l'ordre de 2-3 cm, voire au-delà, tandis que l'humidité affectant réellement l'aérosolisation des virus est celle à l'interface sol-atmosphère, humidité qui a probablement diminué beaucoup plus rapidement juste après l'irrigation contaminante. Les fluctuations autour de la droite de régression sont du même ordre de grandeur que celles observées avec les expériences numériques (cf. Figure III.8b).

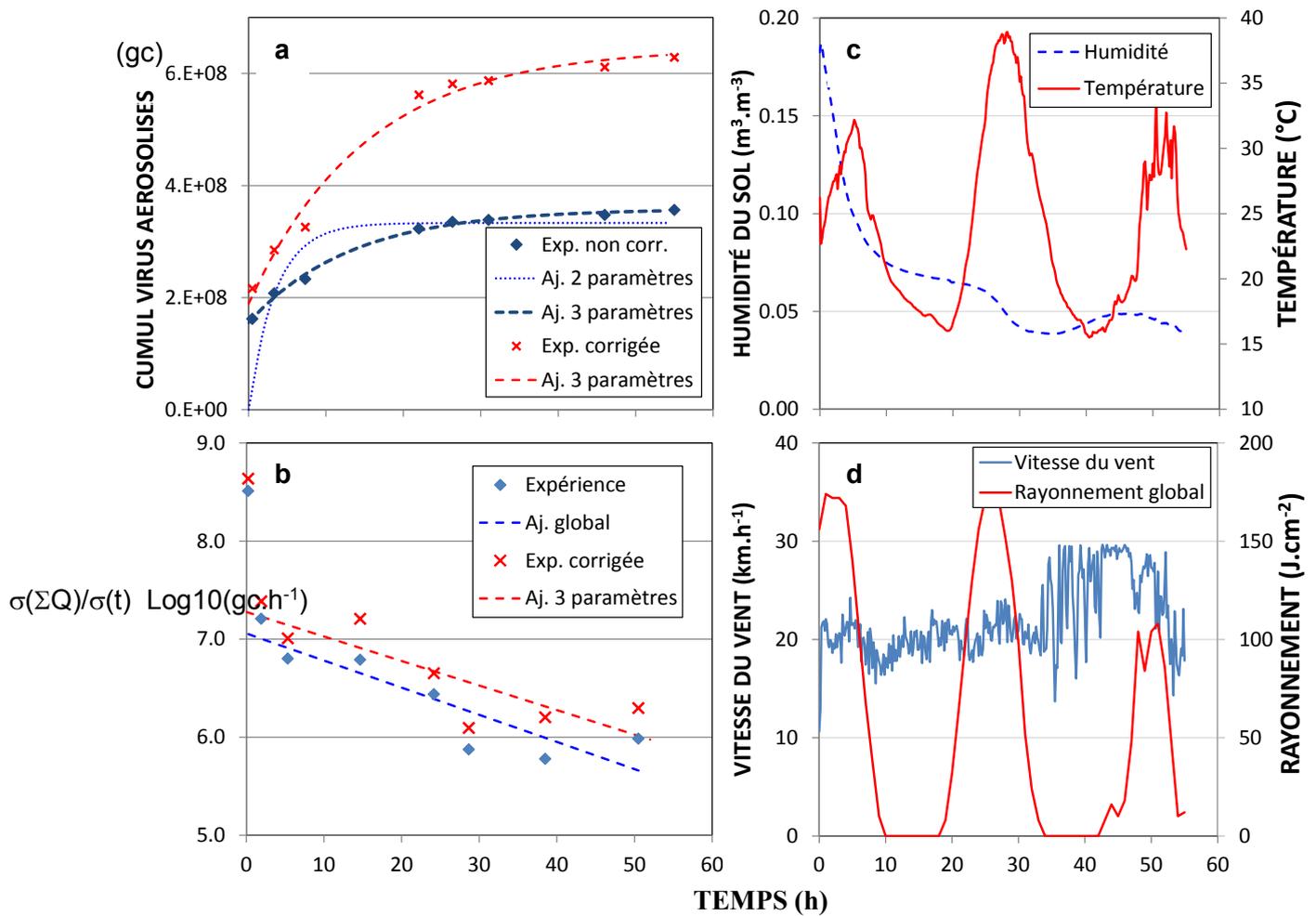


Figure III.12 : Exemple de suivi sous tunnel : expérience n°3 (vitesse du vent : 22 km.h⁻¹ ; apport de 9.5L d'eau du robinet avant d'apporter 1 L d'eau pure contaminée). (a) Quantités aérosolisées cumulées, (b) flux instantanés, (c) température de surface du sol et humidité des 3 premiers centimètres du sol, et (d) vitesse du vent. Pour les figures (a) et (b) : (Symboles) valeurs expérimentales ; (ligne pointillée) ; (ligne tiret) ; simulations après ajustement.

Pour cette expérience sous tunnel, 3 estimations de la taille du pool des virus pouvant être aérosolisés ont été obtenues. Avec l'option 1 (i.e. en utilisant le cumul d'aérosolisation), on obtient $N_{v-m}(t=0) = 3.3 \cdot 10^{+8}$ gc pour 2 paramètres estimés, ou $N_{v-m}(t=0) = 2.0 \cdot 10^{+8}$ gc et $N_{v1} = 1.5 \cdot 10^{+8}$ gc pour 3 paramètres estimés ; la somme des 2 dernières valeurs ($3.5 \cdot 10^{+8}$ gc) est proche de l'estimation globale du pool viral en estimant 2 paramètres, l'écart étant conforme au biais observé entre simulations et données expérimentales en fin de suivi (Figure III.9a). La 3^{ème} estimation s'est faite à partir de l'analyse des flux instantanés (option 2) sans le 1^{er} flux correspondant à l'aérosolisation presque instantanée pendant la première demi-heure ; on aboutit alors à une valeur ($1.8 \cdot 10^{+8}$ gc) très proche de la taille du pool aérosolisé de manière cinétique avec l'ajustement à 3 paramètres pour l'option 1 ($2.0 \cdot 10^{+8}$) ; avec cette même option 2, on peut toutefois décomposer l'émission au cours de la première demi-heure après estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a en une émission associée à ce même pool cinétique de virus et une émission instantanée de N_{v1} virus (cf. Tableau III.7). Pour l'expérience n°3, cette estimation de N_{v1} ($1.6 \cdot 10^{+8}$ gc) est très proche de la valeur de N_{v1} estimée pour l'ajustement à 3 paramètres dans l'option 1.

Les 3 estimations du coefficient cinétique d'aérosolisation k_a sont aussi cohérentes entre elles : avec l'option 1, $k_a = 0.287 \text{ h}^{-1}$ pour 2 paramètres estimés et $k_a = 0.076 \text{ h}^{-1}$ pour 3 paramètres estimés ; avec l'option 2, $k_a = 0.063 \text{ h}^{-1}$. La différence entre les 2 estimations *via* l'option 1 est aisée à comprendre : lorsqu'on estime 2 paramètres, on met l'ensemble des virus dans un pool unique et le coefficient cinétique « apparente » d'aérosolisation tient compte simultanément de ceux aérosolisés presque instantanément ($k_a > 2$ en ordre de grandeur) et de ceux aérosolisés sur un vrai mode cinétique ($k_a < 1$ en ordre de grandeur, k_a pouvant être très petit). La valeur de $k_a = 0.076 \text{ h}^{-1}$ pourrait correspondre à une estimation réaliste du coefficient cinétique d'aérosolisation pour le pool de virus non remis en suspension dans l'air spontanément (Figure III.12a) ; ce coefficient caractériserait un pool de virus aérosolisés à 90% en 30 à 31 h dans des conditions environnementales proches de celles du tunnel 3 ; comme une confirmation de cette interprétation, cette estimation de k_a est très proche de la dernière estimation de k_a par l'option 2 ($k_a = 0.064 \text{ h}^{-1}$ avec alors un pool de virus aérosolisés à 90% en 36 h).

Si l'on corrige les données pour tenir compte de l'efficacité du piégeage (avec $k_p=0.77$) et de la ré-aérosolisation (avec $k_h=0.11$), on obtient avec l'option 1 $N_{v-m}(t=0) = 4.6 \cdot 10^{+8} \text{ gc}$, $N_{v1} = 1.9 \cdot 10^{+8} \text{ gc}$ et $k_a = 0.066 \text{ h}^{-1}$ pour 3 paramètres estimés. Avec l'option 2 on obtient $N_{v-m}(t=0) = 3.3 \cdot 10^{+8} \text{ gc}$ et $k_a = 0.058 \text{ h}^{-1}$. Cette première analyse montre que le coefficient cinétique d'aérosolisation n'est pas forcément très affecté par le biais sur les données expérimentales. A l'inverse, la taille des pools viraux aérosolisables doit probablement être multipliée par un facteur de l'ordre de 2 sous réserve que nos estimations grossières de k_p et k_h soient réalistes.

En supposant qu'on a apporté initialement $1.46 \cdot 10^{+10}$ virus sous chaque tunnel, les quantités de virus aérosolisables dans les conditions de l'expérience seraient alors comprises entre 2.3% et 2.5% (selon l'option utilisée). En supposant que l'incertitude sur ces estimations est proche de celle des expériences numériques, la quantité réelle de virus pouvant être aérosolisés dans les conditions de l'expérience serait comprise entre 1.2% et 5% du total de virus apportés. En ajoutant les biais induits par l'imperfection des Impingers, l'intervalle final serait compris entre 2.4 et 10%.

III.3.b.ii. *Aperçu général des résultats pour l'ensemble des expériences sous tunnel ventilé*

Les quantités de mengovirus murin initialement apportés au sol l'ont été, pour chaque expérience (i.e. pour chaque tunnel) par mélange de 3 doses de 35-40 mL chacune de suspension virale dont la description a été présentée en III.2.a.ii, 100 mL de la suspension obtenue étant complétée à 1 L par de l'eau pure ou de l'eau usée autoclavée. Pour chaque expérience sous tunnel, 3 à 4 dosages ont été effectués à 3 ou 4 dilutions avec un facteur 10 entre chaque dilution, afin de détecter un effet inhibiteur éventuel. En pratique, il n'y a aucune dépendance du dosage au facteur de dilution, notamment pour les expériences n°6 et n°7 pour lesquelles les virus ont été apportés avec de l'eau usée préalablement autoclavée et contenant divers composés pouvant potentiellement interférer avec les mesures en RT-qPCR (résultat non montré). De la même façon, il semble n'y avoir aucune dépendance du niveau initial de contamination au numéro de l'expérience sous tunnel (Figure III.13). Sous hypothèse d'une quantité de virus apportés identique pour toutes les expériences sous tunnel, l'apport initial a été estimé par la moyenne de toutes les données disponibles, soit $1.46 \cdot 10^{+10} \text{ gc.tunnel}^{-1}$.

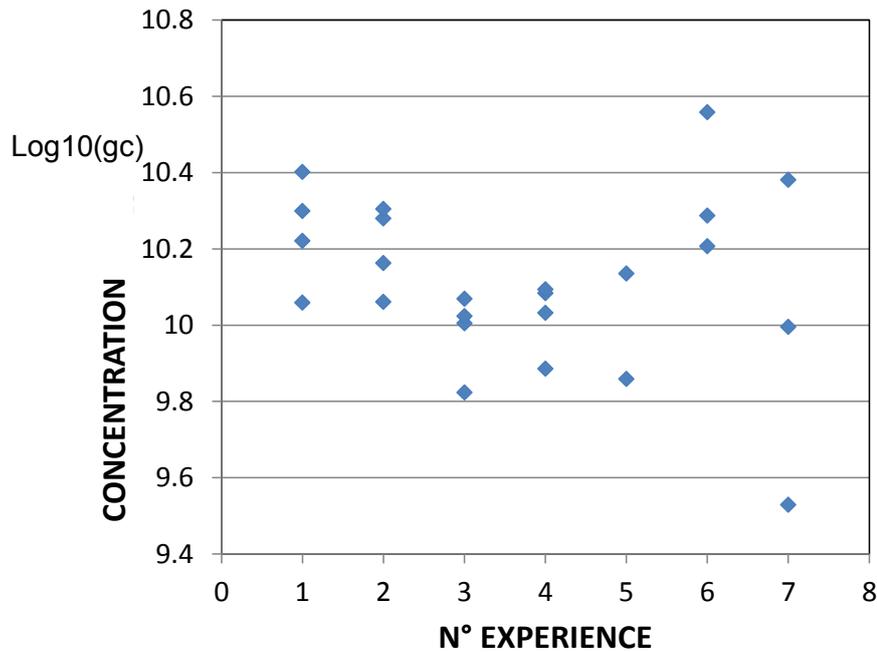


Figure III.13 : Mesures de la quantité de virus (gc) déposées pour chaque expérience sous tunnel.

Au cours des suivis d'aérosolisation des virus sous tunnels ventilés, les virus en suspension dans l'air ont été piégés parallèlement par les Impingers et par les filtres en polycarbonate. On dispose ainsi pour chaque intervalle de temps de 2 estimations des flux (estimés à partir des données brutes sans appliquer de facteur de correction comme celui proposé dans l'équation (III.5) pour les Impingers). On note que les estimations faites à partir des Impingers sont de l'ordre d'un \log_{10} plus élevées que celles faites à partir des filtres (Figure III.14).

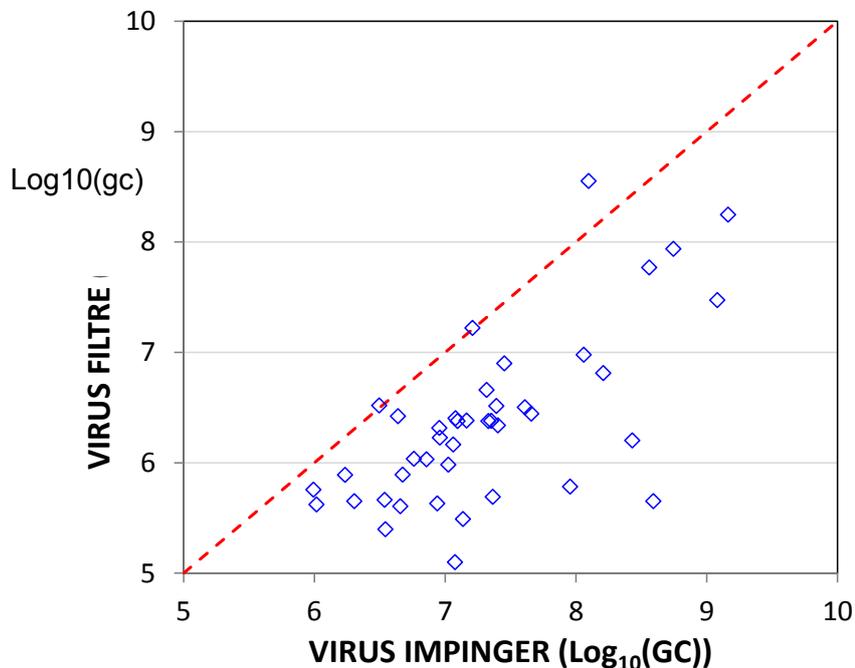


Figure III.14 : Comparaison des quantités de virus aérosolisés (gc) entre deux dates successives de changement d'Impinger et de filtre estimés à partir des virus piégés respectivement dans les Impingers et sur filtres.

Les flux calculés à partir des filtres dépendent simultanément du taux de piégeage des virus sur les filtres et du taux d'élution ultérieure des ARN viraux de ces virus avant quantification en RT-qPCR. Ces étapes peuvent toutes deux générer des biais. Sachant que les Impingers aboutissent déjà à sous-estimer l'aérosolisation si l'on n'applique pas de facteur de correction aux données brutes, l'utilisation des données issues des filtres ne peut aboutir qu'à des biais plus marqués.

L'ensemble des résultats des expériences sous tunnels (hormis ceux de l'expérience n°3 déjà décrits) sont présentés dans les Figures III.15 et III.16 dans les pages suivantes ; sur les mêmes figures ont été reportées les simulations faites avec l'option 1 (Figure III.15) et avec l'option 2 (Figure III.16). A première vue, les situations expérimentées sont bien contrastées. Environ 1/3 des virus aérosolisés le sont pendant la première demi-heure de suivi (Figure III.17) et ce, apparemment indépendamment des conditions expérimentales.

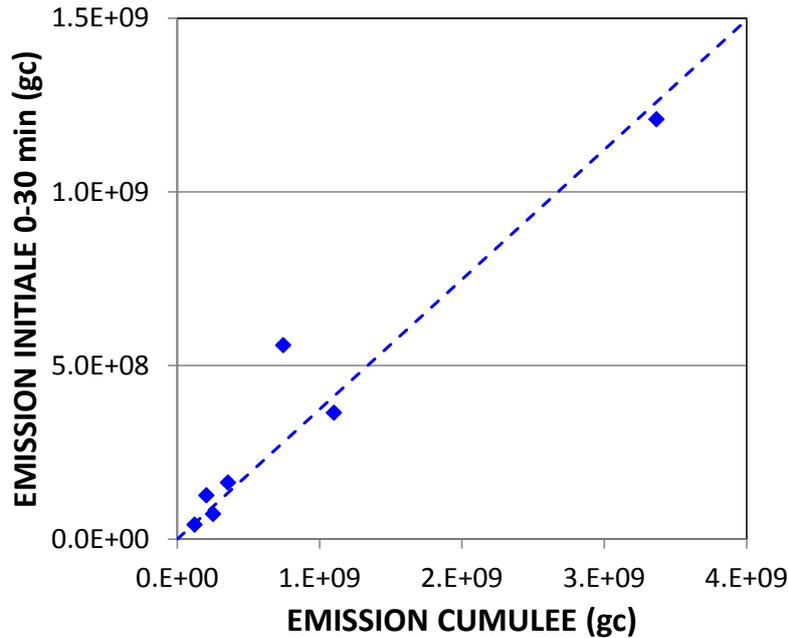


Figure III.17 : Corrélation entre quantité totale de virus aérosolisés (sur 54 à 56 h, sauf un suivi sur 24.5 h) et quantité de virus aérosolisés pendant les 30 premières minutes pour les expériences sous tunnels ventilés ($r^2=0.93$).

Les estimations de paramètres pour les options 1 et 2 permettent des ajustements des simulations proches des données expérimentales.

On note un bon accord entre la quantité cumulée de virus aérosolisés sur chacune des expériences et la quantité estimée $N_{v-m}(t=0)$ estimée par l'option 1 avec 2 paramètres ou avec la somme $N_{v-m}(t=0)+N_{v1}$ des paramètres $N_{v-m}(t=0)$ et N_{v1} estimés par l'option 1 avec 3 paramètres (Tableau III.7). On note par ailleurs un bon accord entre la quantité de virus aérosolisés au cours des 30 premières minutes et le paramètre N_{v1} estimés par l'option 1 avec 3 paramètres (Tableau III.7).

Si l'on observe pour les expériences 3 à 7 aussi un bon accord entre quantité estimée $N_{v-m}(t=0)$ estimée par l'option 1 avec 3 paramètres et l'option 2, il y a une forte divergence entre ces estimations pour les expériences 1 et 2 (Tableau III.7). Pour ces 2 premières expérimentations, il y a très probablement eu surestimation de quelques valeurs (contamination d'échantillons ? autre ? ...) (Figures III.15a et III.16a), et les valeurs estimées tout comme l'analyse préliminaire suggèrent d'accorder plus de confiance aux estimations issues de l'option 2, malgré la forte variabilité sur l'aérosolisation « instantanée » de virus (Figures III.15b et III.16b). Toutefois, sans estimation fiable de l'aérosolisation instantanée sur les 30 premières minutes de suivi, les valeurs de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a estimées par l'option 2 restent insuffisantes pour pouvoir ensuite simuler les émissions pour ces 2 premières expériences.

Cette analyse est indirectement appuyée par la proximité des valeurs de k_a estimées respectivement par l'option 1 avec 3 paramètres et par l'option 2 (Tableau III.7). L'accord n'est pas parfait ; notamment les estimations divergent fortement entre options 1 et 2 pour les expériences 6 et 7, mais l'aérosolisation très rapide des virus pour ces 2 dernières expérimentations (Figures III.15e-f) amène à probablement beaucoup d'incertitude sur le partage entre aérosolisation instantanée et aérosolisation cinétique, donc sur les paramètres estimés pour les différentes méthodes mises en œuvre.

Tableau III.7 : Valeurs expérimentales cumulées sur 54 à 56 h en général, et aérosolisation initiale sur les 30 premières minutes ; paramètres ajustés

Exp. n°	Expérience			Modèle										
	Cum. exp. (10 ⁺⁸ gc)	Emis. (0-30 min) (10 ⁺⁸ gc)	Option 1 (2 paramètres)		Option 1 (3 paramètres)			Option 2 (2 paramètres ajustés, 1 calculé <i>a posteriori</i>)			Ajustement global (17 paramètres ajustés)			
			$N_{v-m}(t=0)$ (10 ⁺⁸ gc)	k_a (h ⁻¹)	$N_{v-m}(t=0)$ (10 ⁺⁸ gc)	k_a (h ⁻¹)	N_{v1} (10 ⁺⁸ gc)	$N_{v-m}(t=0)$ (10 ⁺⁸ gc)	k_a (h ⁻¹)	N_{v1}^{**} (10 ⁺⁸ gc)	$N_{v-m}(t=0)^{***}$ (10 ⁺⁸ gc)	k_a (h ⁻¹)	N_{v1} (10 ⁺⁸ gc)	
1	34	12	34	0.0012	30	0.037	9.0	4.5	0.030	11.9	3.24	0.020	12.1	
2	11	3.6	12	0.0014	10	0.059	2.1	0.49	0.054	3.62	0.356	0.018	3.63	
3	3.6	1.6	3.3	0.29	2.0	0.076	1.6	1.8	0.064	1.47	1.88	0.065	1.56	
4	1.2	0.41	1.0	0.13	1.6	0.012	0.45	1.1	0.027	0.31	2.64	0.007	0.399	
5	2.5*	0.72	2.3	0.62	2.0	0.033	0.42	1.6	0.18	0.68	1.49	0.211	0.570	
6	7.5	5.6	7.2	2.9	2.9	0.011	4.4	3.7	0.087	5.51	4.78	0.107	5.33	
7	2.1	1.3	1.8	2.0	1.1	0.021	1.4	1.7	0.042	1.20	2.04	0.035	1.22	

* : sur 24.5 h ; ** : estimé par différence entre la quantité de virus aérosolisée après 30 minutes et la quantité de virus aérosolisée de manière cinétique sur cet intervalle de temps ; *** : calculé à partir de l'équation $\hat{N}_{v-m}(t=0) = (8.89 \cdot 10^{+8} \times v_{wind}^2 \times \exp(-0.131 \times T)) + 1.74 \cdot 10^{+8} \times I_{ww}$

L'apport initial ayant été estimé à $1.46 \cdot 10^{10}$ gc.tunnel⁻¹, le cumul expérimental des virus aérosolisés correspondrait sans utiliser de facteur de correction à 23, 7.5, 2.4, 0.8, 1.7, 5.1 et 1.4% de cet apport pour respectivement les expériences 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7. En tenant compte de l'incertitude liée notamment aux mesures de RT-qPCR et des biais liés à l'efficacité du piégeage des Impingers et à la ré-aérosolisation des virus piégés dans leur solution, on arriverait aux estimations sur la Figure III.18.

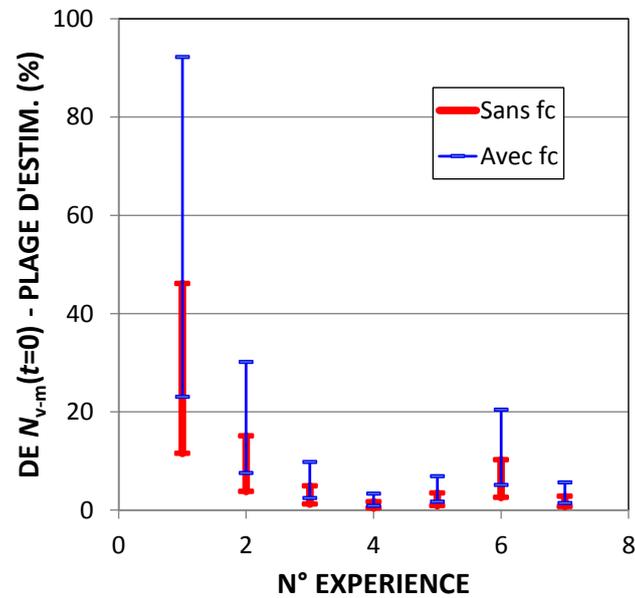


Figure III.18 : Plage d'estimation du cumul de virus aérosolisés sans ou après prise en compte du facteur de correction f_c (les résultats sont exprimés en % de l'apport initial).

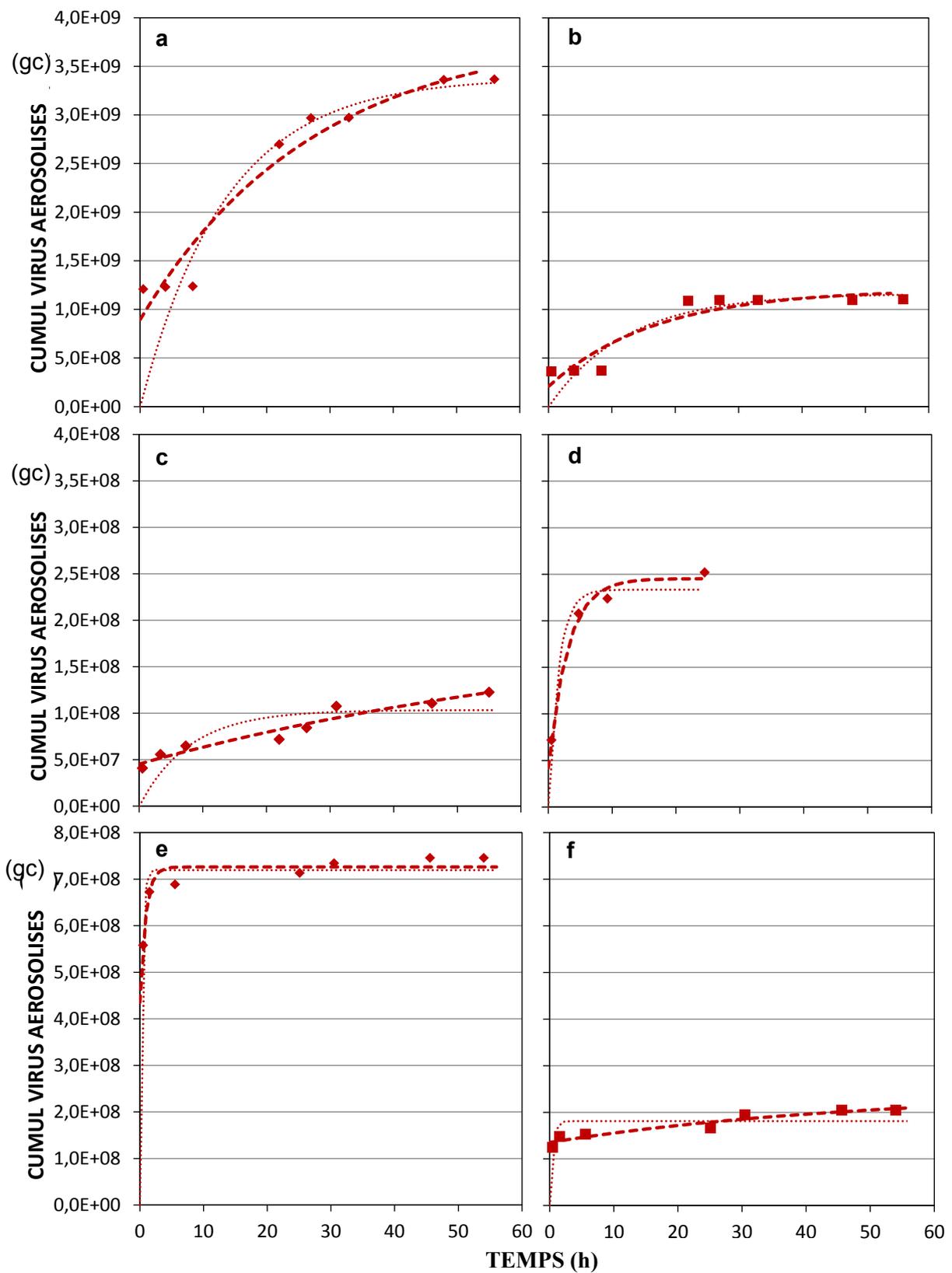


Figure III.15 : Quantités cumulées de virus aérosolisés au cours du temps pour les expériences 1 (a), 2 (b), 4 (c), 5 (d), 6 (e) et 7 (f). Les losanges représentent les mesures sous vent « fort » et les carrés sous vent faible.

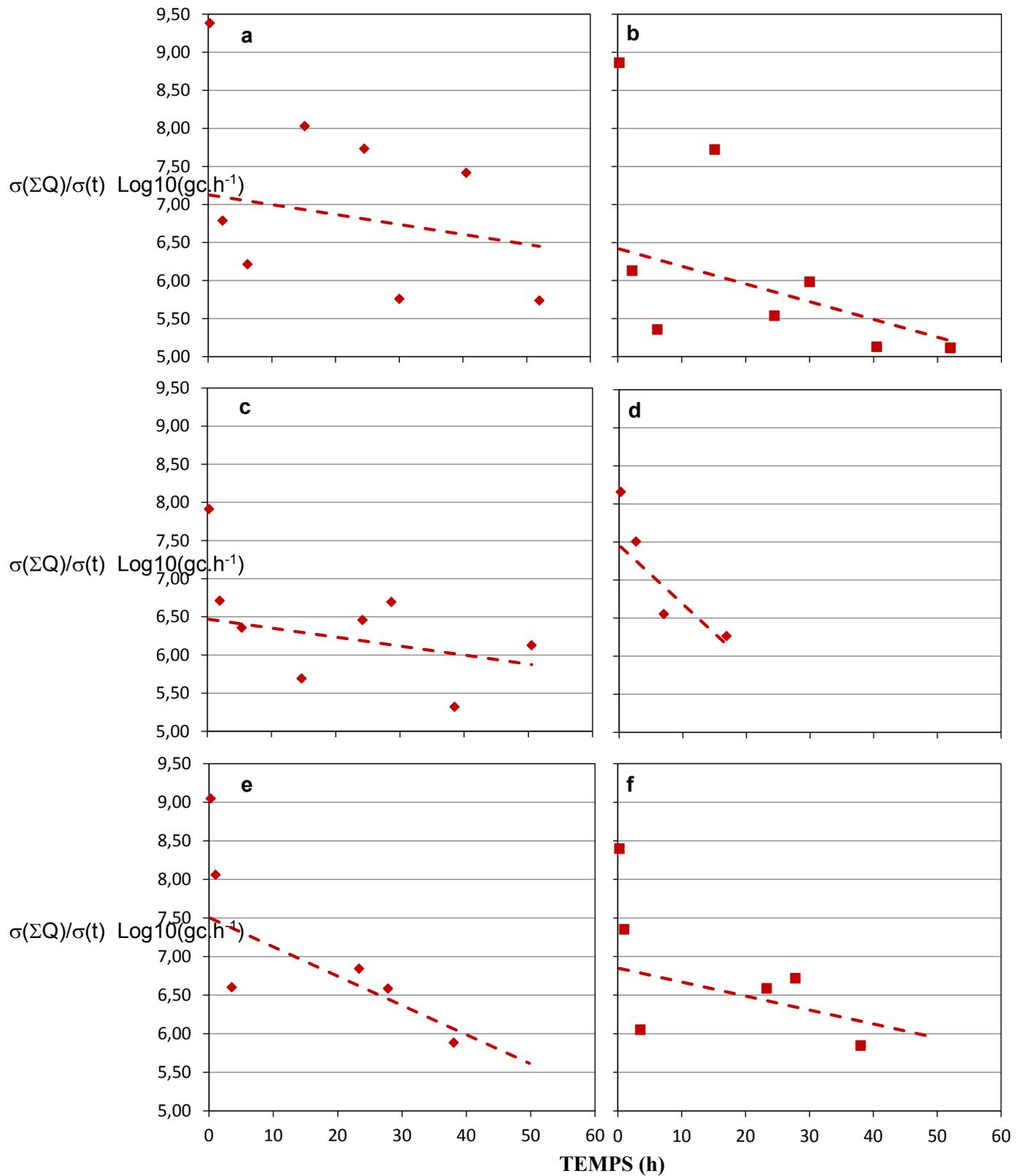


Figure III.16 : Flux instantané de virus aérosolisés au cours du temps pour les expériences 1 (a), 2 (b), 4 (c), 5 (d), 6 (e) et 7 (f). Les losanges représentent les mesures sous vent fort et les carrés sous vent faible.

III.3.b.iii. *Ebauche de modélisation*

Nous avons privilégié les paramètres N_{v1} , $N_{v-m}(t=0)$ et k_a estimés par l'option 2 (i.e. dont les estimations sont basées sur les flux « instantanés ») en raison de la qualité de cette option en termes de paramètres estimés.

Concernant $N_{v-m}(t=0)$, l'analyse des données expérimentales faisait apparaître une faible corrélation ($r=-0.70$; $P>0.90$) avec la température et une corrélation plus faible ($r=0.60$; $P>0.80$) avec la vitesse du vent, ces 2 dernières variables ne semblant pas corrélées entre elles ($r=-0.40$ avec 5 ddl). La corrélation positive entre la taille du pool de virus pouvant être aérosolisés sur un mode cinétique et la vitesse du vent semble facile à accepter (bien qu'elle ne soit pas forcément évidente avec la possibilité de déplacement des limites entre pools de virus aérosolisés instantanément et pool de virus aérosolisés sur un mode cinétique). La corrélation négative entre la taille du pool de virus pouvant être aérosolisés sur un mode cinétique et la température semble moins intuitive ; pourtant, elle peut tout à fait s'expliquer par l'effet de la température sur les forces hydrophile/hydrophobe (Syngouna et Chrysikopoulos, 2010). Ainsi, El Zanati (2011) avait montré que l'augmentation de température d'un sol de composition similaire et saturé en eau augmentait fortement l'immobilisation du même virus. La dépendance de $N_{v-m}(t=0)$ à chacune de ces variables nous a amené à tester des ajustements séparés pour chacune d'elles (Figures III.19a-b), puis à combiner de manière multiplicative les mêmes formalismes mathématiques pour tenir compte simultanément de ces 2 facteurs (Figure III.19c).

L'analyse des résidus non expliqués par ces derniers pris simultanément montre que les 2 valeurs fortement sous estimées correspondent aux expériences utilisant de l'eau usée ; aussi avons-nous intégré ce facteur sous forme de variable qualitative I_{ww} (égale à 0 et 1 pour respectivement de l'eau pure et de l'eau usée). En définitive nous obtenons l'équation suivante qui nous permet d'avoir un coefficient de corrélation de 0.98 entre la valeur de $N_{v-m}(t=0)$ issue de l'ajustement des données expérimentales par l'option 2 et la valeur de $N_{v-m}(t=0)$ prédite cette équation :

$$N_{v-m}(t=0) = \left(7.15 \cdot 10^{+6} \times v_{wind}^2 \times \exp(-0.123 \times T) \right) + 1.09 \cdot 10^{+8} \times I_{ww} \quad (III.19)$$

La qualité de l'ajustement peut paraître surprenante. L'équation (III.19) doit bien évidemment être considérée avec beaucoup de précautions et n'est certainement valable que pour notre contexte d'étude (sol, virus, eau, climat ...) et les situations envisagées.

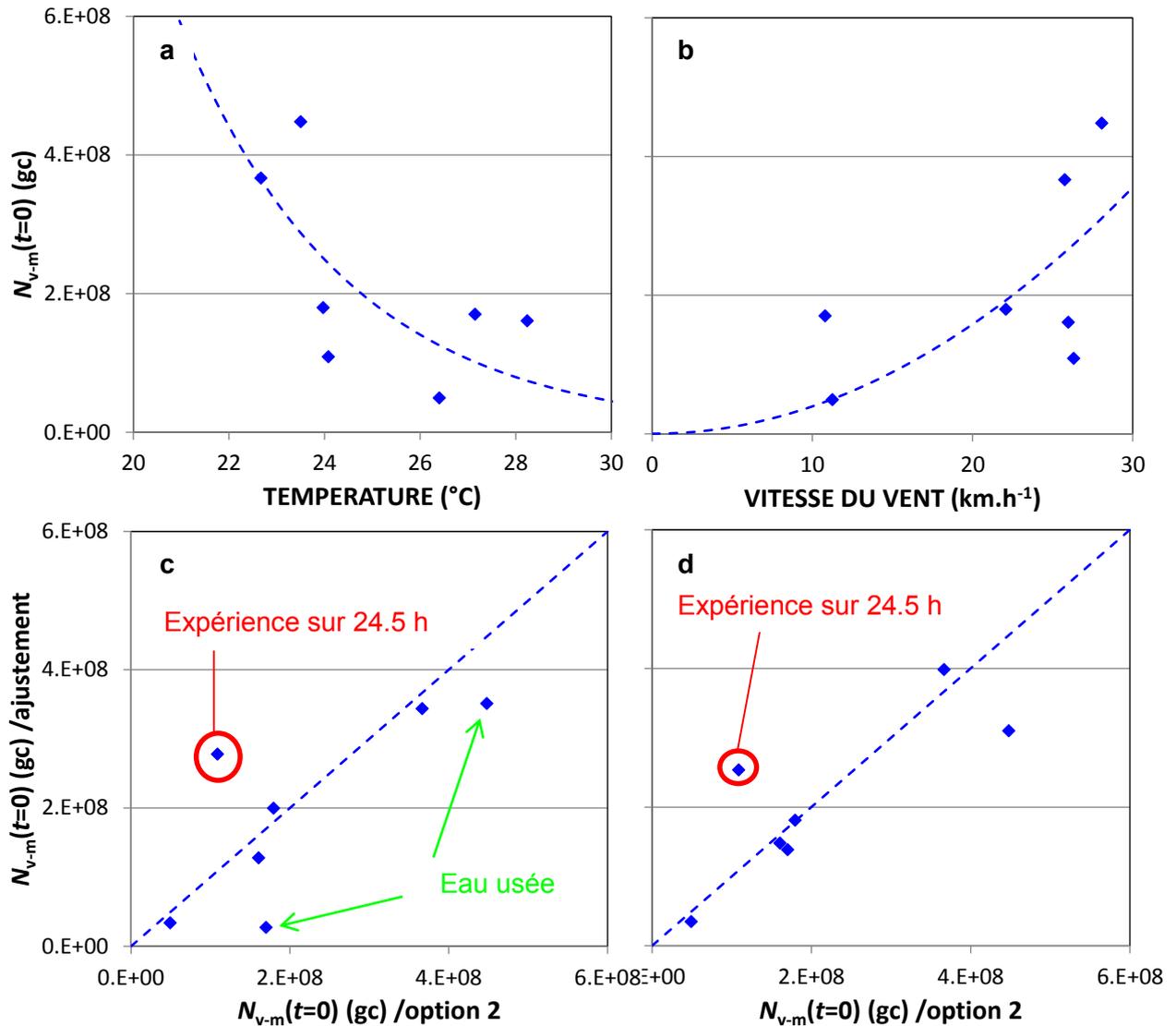


Figure III.19 : Ajustements divers en prévision d'un modèle décrivant $N_{v-m}(t=0)$ estimé par l'option 2 (taille du pool des virus aérosolisés de façon cinétique) : dépendance à la température de surface du sol avec pour relation ajustée $N_{v-m}(t=0) = 2.38 \cdot 10^{+11} \times \exp(-0.286 \times T)$ (a), dépendance à la vitesse du vent avec pour relation ajustée $N_{v-m}(t=0) = 3.95 \cdot 10^{+5} \times v_{wind}^2$ (b), qualité de l'ajustement prenant en compte simultanément la vitesse du vent et la température de surface du sol avec pour relation ajustée $N_{v-m}(t=0) = 3.12 \cdot 10^{+7} \times v_{wind}^2 \times \exp(-0.181 \times T)$ (c), et qualité de l'ajustement prenant en compte simultanément la vitesse du vent, la température de surface du sol et la nature de l'eau contaminée (d).

En contraste, nous n'avons pas pu établir de relation simple entre les estimations des émissions instantanées (N_{v1}) et les variables considérées, très probablement parce que chacune des estimations est entachée d'un aléa important (cf. section III.3.a.ii. et Figure III.6a). On peut toujours utiliser une relation de proportionnalité entre l'aérosolisation « instantanée » N_{v1} et l'aérosolisation cinétique $N_{v-m}(t=0)$ comme le suggère la Figure III.17.

De la même façon, il ne semble pas y avoir de relation évidente entre k_a (appliqué au pool de virus aérosolisés sur un mode cinétique). Toutefois, toutes les valeurs estimées par l'option 2 de k_a sont comprises entre 0.027 et 0.087 h⁻¹, à l'exception d'une seule (0.18 h⁻¹) correspondant à l'expérience n°5 correspondant à un suivi réduit à 24.5 h en contraste avec les autres suivis ayant tous dépassé 50 h. On peut raisonnablement penser que la durée du suivi affecte aussi les paramètres estimés. Pour tous les autres suivis, il paraîtrait envisageable en première approche d'utiliser une valeur moyenne de k_a – hors valeur forte pour l'expérience n°5 – (≈ 0.051 h⁻¹).

En substituant l'équation III.19 par l'équation III.14 faisant intervenir 3 coefficients a, b, c nous avons ajusté les simulations telles que définies par l'équation III.11 au données expérimentales ; nous avons ainsi estimé ces 3 coefficients a, b, c, les 7 quantités de virus aérosolisés quasi-instantanément $N_{vi}(j)$, et les 7 coefficients cinétiques $k_a(j)$, j étant le numéro de l'expérience et variant de 1 à 7. Les logarithmes népériens des quantités de virus aérosolisés sur chaque intervalle de temps correspondant à l'utilisation d'un Impinger ont été comparés aux logarithmes des mêmes valeurs simulées (Figure III.20). Un premier ajustement utilisant la totalité des données a abouti à un écart-type résiduel de 1.50 sur les logarithmes népériens, soit 0.65 sur les logarithmes décimaux (résultats non montrés). Trois valeurs correspondant à des points "excentrés" et correspondant pour 2 d'entre eux à des accumulations anormalement élevées de virus ont été écartées dans un 2^{ème} temps de l'ajustement (cf. points entourés en rouge dans la Figure III.20), réduisant ainsi l'écart type résiduel à 1.25 sur les logarithmes népériens, soit 0.54 sur les logarithmes décimaux.

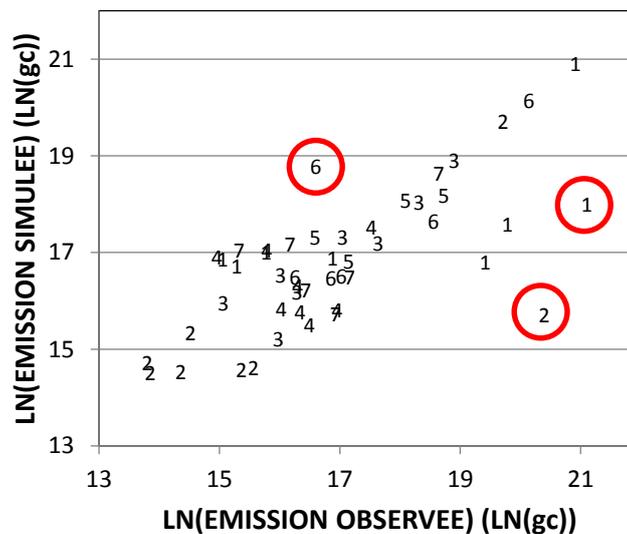


Figure III.20 : Relation entre logarithmes népériens des émissions observées et des émissions simulées sur les intervalles de temps correspondant à l'utilisation d'un même Impinger pour chacune des 7 expériences. Les 3 points entourés d'un cercle rouge correspondent à des valeurs utilisées pour un 1^{er} ajustement (écart-type résiduel sur les logarithmes népériens alors égal à 1.5) et éliminés dans un 2^{ème} ajustement (écart-type résiduel sur les logarithmes népériens alors égal à 1.25).

Les valeurs de a, b et c aboutissent à une équation pour $N_{v-m}(t=0)$ peu différente de l'équation (III.19) :

$$\hat{N}_{v-m}(t=0) = \left(8.89 \cdot 10^{+8} \times v_{wind}^2 \times \exp(-0.131 \times T) \right) + 1.74 \cdot 10^{+8} \times I_{ww} \quad (III.20)$$

Les autres valeurs ajustées ($N_{v1}(i)$ et $k_a(i)$ pour i variant de 1 à 7) sont présentées dans le tableau III.7 ; nous y avons joint les estimations de $N_{v-m}(t=0)$ calculées par l'équation (III.20). Globalement, les estimations obtenues par les différentes méthodes semblent cohérentes, avec toutefois certaines estimations variant fortement avec la méthode.

Un résultat très intéressant est certainement encore la très bonne capacité du modèle à simuler les données expérimentales dans toutes les expériences (Figure III.21), si l'on admet que pour les 2 premières le décalage entre valeurs observées et valeurs calculées au-delà de 20 h correspond à des accumulations de virus peu vraisemblables dans les Impingers entre un peu plus de 8 h et 23 h.

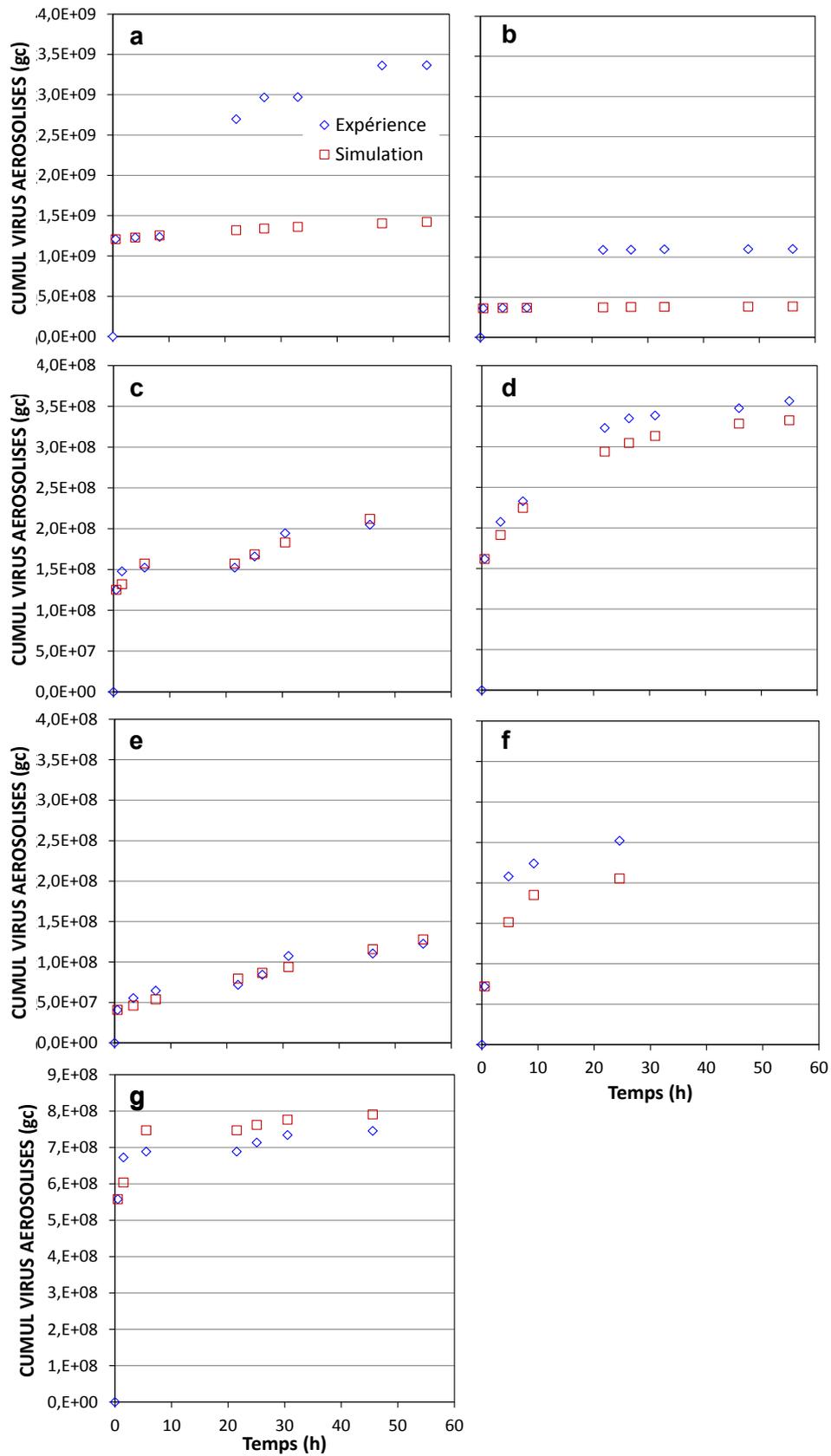


Figure III.21 : Quantités cumulées observées et simulées de virus aérosolisés au cours du temps pour les expériences 1 (a), 2 (b), 7 (c), 3 (d), 4 (e), 5 (f) et 6 (g). Les quantités simulées résultent de l'ajustement global des 17 paramètres.

III.4. Conclusion

Ce travail avait comme objectif d'évaluer la possibilité de remise en suspension dans l'atmosphère de virus préalablement apportés au sol par irrigation en se focalisant sur la quantité totale de virus pouvant être remis en suspension et sur la vitesse à laquelle ce phénomène se produit. Ce travail a nécessité d'adapter au préalable la méthode des 'tunnels ventilés' (Lockyer, 1984 ; Loubet et al., 1999a et 1999b ; Bedos et al., 2002), d'évaluer dans nos conditions expérimentales les performances de bio-collecteurs (West et Kimber, 2015 ; Verreault et al., 2008) utilisés pour piéger les virus en suspension dans l'air, et en définitive d'évaluer la précision des estimations relatives aux aspects 'quantité' et 'vitesse' au vu des incertitudes et des biais sur les mesures de teneurs en virus en suspension dans l'air. Pour analyser les résultats obtenus, nous avons considéré que les virus aérosolisables à partir du sol appartenaient à un ou plusieurs pools caractérisés par leur taille et leur coefficient cinétique d'aérosolisation. Notre travail est à notre connaissance la première étude relative à l'aérosolisation de virus entériques déposés au sol avec l'irrigation par des eaux usées insuffisamment traitées.

Au niveau méthodologique, nous avons comparé, pour un pool unique de virus, différentes méthodes d'évaluation des paramètres 'taille' et 'vitesse d'aérosolisation' du pool et évalué l'incertitude sur leur estimation. Ce travail a été réalisé à partir de 100 expériences numériques correspondant à une même réalité expérimentale, chaque réalisation numérique étant entachée d'aléas en accord avec les incertitudes sur les mesures de nombre de copies de génomes viraux par RT-qPCR. Nous avons montré que les paramètres caractérisant le pool de virus aérosolisables sont estimés de façon plus précise à partir de l'aérosolisation "instantanée" (option 2) qu'à partir de l'accumulation de virus aérosolisés dans le temps (option 1) à différentes dates. Le contraste entre ces 2 approches peut s'expliquer par le fait qu'un écart à une date donnée entre valeur théorique et valeur déduite d'une ou plusieurs mesures en RT-qPCR se propage sur l'ensemble des valeurs cumulées de virus aérosolisés aux dates ultérieures ; à l'inverse, cet écart ne se propage pas aux données ultérieures lorsqu'on analyse l'aérosolisation instantanée, la méthode permettant alors plus ou moins facilement de détecter une valeur aberrante. Avec nos protocoles expérimentaux et en absence de biais sur les données expérimentales, la taille réelle du pool de virus aérosolisés $N_{v-m}(t=0)$ (gc) est comprise entre plus de la moitié et moins de 2 fois la valeur estimée ; de la même façon, le coefficient cinétique d'aérosolisation réel k_a est comprise entre 0.7 et 1.4 fois sa valeur estimée. Malheureusement, les Impingers AGI-4 que nous avons utilisés (comme hélas tous les autres biocollecteurs) ajoutent des biais aux incertitudes précédemment évoquées : les biais résultent d'une efficacité de piégeage des virus inférieure à 1 et d'une ré-aérosolisation partielle des virus préalablement piégés (Dart et Thornburg, 2008 ; Li et al., 1997). Nos données pour qualifier les Impingers sont imprécises : nous avons estimé grossièrement que 77% des virus traversant la solution de piégeage d'un Impinger étaient piégés dans ce dernier et que 11% des virus préalablement piégés étaient ré-aérosolisés pour 1 h de barbotage d'air avec un débit d'environ $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. En se basant sur ces valeurs, nous avons décrit l'évolution de la concentration en virus piégés dans un Impinger au cours du temps pour un flux d'air ayant une charge constante en virus. Rapportée à l'évolution de la concentration en virus en situation de piégeage total, nous avons ainsi défini un facteur de correction, fonction de la durée d'accumulation des virus dans l'Impinger, nous permettant de corriger les données expérimentales. L'ajustement pratiqué sur les données ainsi corrigées amène à une valeur de $N_{v-m}(t=0)$ égale à environ 2 fois sa valeur estimée sans cette correction ; elle amène à peu de changement sur la valeur estimée de k_a . En tenant compte simultanément des incertitudes et des biais, la valeur réelle de $N_{v-m}(t=0)$ serait alors comprise entre sa valeur estimée et 4 fois sa valeur estimée. Au-delà, l'utilisation d'expériences numériques s'avère être un outil potentiellement puissant pour

affiner les protocoles expérimentaux (date de changement des biocollecteurs, nombre de réplicats dans les mesures de RT-QPCR ...). Potentiellement, une des limites à ce type d'approche est l'existence de plusieurs pools ayant chacun leurs paramètres ($N_{v-m}(t=0)$ et k_a). L'expérience semble nous dire que la distinction de 2 pools semble suffisante : un pool aérosolisé "instantanément" et un pool aérosolisé sur un mode cinétique. Toutefois, cette hypothèse méritera d'être reprise dans des travaux ultérieurs.

Les expériences sous tunnels ventilés montrent qu'entre 0.8 et 23% des virus apportés peuvent être remobilisés en se basant uniquement sur les quantités cumulées de virus aérosolisés. Environ 1/3 des virus aérosolisés le sont pendant les 30 premières minutes des suivis. On distingue un pool de virus aérosolisés quasi-instantanément et dont la taille ajustée correspond approximativement aux virus aérosolisés durant les 30 premières minutes des suivis. Si l'on s'intéresse aux virus aérosolisés sur un mode cinétique, leur nombre $N_{v-m}(t=0)$ (en gc) semble pouvoir être très bien estimé en tenant compte de la vitesse du vent (fonction carrée), de la température (fonction exponentielle décrivant probablement l'effet de la température sur les forces de type hydrophile/hydrophobe) et de la nature de l'eau, l'eau usée réduisant l'adsorption des virus à la surface des solides (compétition entre MO des eaux usées et virus pour cette adsorption). Les coefficients cinétiques d'aérosolisation k_a pour ce pool cinétique varient entre 0.007 (correspondant à 13 j pour aérosoliser 90% des virus aérosolisables) et 0.21 (correspondant à 11 h pour aérosoliser 90% des virus aérosolisables), en exceptant l'expérience courte (n°5 sur 24.5 h), d'un ou plusieurs pools de virus mobilisés plus progressivement. L'ajustement simultané des simulations aux données des 7 expériences sous tunnel, en décrivant $N_{v-m}(t=0)$ par le même formalisme mathématique faisant intervenir 3 paramètres, permet de refléter alors très bien les 7 expériences et de mieux mettre en évidence quelques données aberrantes dans les deux premières expériences. En utilisant cet ajustement, les émissions sont comprises entre 1 % et 10 % sans tenir compte du facteur de correction f_c égal à 2 environ.

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

- l'amélioration méthodes : (i) Impinger (revisite des coefficients. voire optimisation géométrie de l'impinger, composition de la solution de piègeage, débit de la pompe...) ou autre bio-collecteur plus performant, (ii) Plan d'échantillonnage (fréquence des mesures, nombre de répétitions, durée de suivi) ... ;
- l'acquisition d'un grand nombre de résultats pour avoir un modèle ayant une valeur générique d'abord sur un sol donné, éventuellement progressivement en jouant sur plusieurs sols ;
- L'amélioration de la compréhension des processus en revisitant les pools à définir/retenir en fonction de leur spéciation dans l'air (virus isolés, virus adsorbés à la surface de colloïdes inertes eux-mêmes aérosolisés et éventuellement distinction de pools suivant la nature de ces colloïdes ...), voire en fonction de leur spéciation en surface du sol. Ce dernier point suppose de pouvoir « extraire » par des méthodes douces les virus à la surface du sol.

Références:

- Asano T. 1998. Wastewater reclamation and reuse. *Water Quality Management Series* Volume 10, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Barron, A.L., Olshevsky C., et Cohen M.M.. 1970. Characteristics of the BGM line of cells from African green monkey kidney . *Arch. Für Gesamte Virusforsch.* Vol. 32, n°4, p. 389-392.
- 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.
- Bedos C., Rousseau-Djabri M.F., Flura D., Masson S., Barriuso E., Cellier, P. 2002. Rate of pesticide volatilization from soil: an experimental approach with a wind tunnel system applied to trifluralin. *Atmospheric Environment* 36, 5917-5925.
- Bixio D., Thoeve C., De Koning J., Joksimovic D., Savic D., Wintgens T., Melin T. 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination* 187, 89-101.
- Bixio D., Thoeve C., Wintgens T., Ravazzini A., Miska V., Muston M., Chikurel H., Aharoni A., Joksimovic D., Melin T. 2008. Water reclamation and reuse: implementation and management issues. *Desalination* 218, 13-23.
- Blatny J.M., Reif B.A.P., Skogan G., Andreassen O., Høiby E.A, Ask E., Waagen V., Aanonsen D., Aaberge I.S., et Caugant D.A.. 2008. Tracking airborne Legionella and Legionella pneumophila at a biological treatment plant . *Environ. Sci. Technol.* Vol. 42, n°19, p. 7360–7367.
- Brooks J. P., Tanner B.D., Gerba C.P., Haas C.N., et Pepper I. L. 2005. Estimation of bioaerosol risk of infection to residents adjacent to a land applied biosolids site using an empirically derived transport model. *Journal of applied microbiology*, 98(2), 397-405.
- Burton N.C., Grinshpun S.A., et Reponen T. 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Annals of Occupational Hygiene*, 51(2), 143-151.
- 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.
- 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.
- 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.
- Carducci A., Battistini R., Rovini E., et Verani M. 2009. Viral removal by wastewater treatment: monitoring of indicators and pathogens. *Food and Environmental Virology*, 1(2), 85-91.
- 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.
- Dart A., Thornburg J. 2008. Collection efficiencies of bioaerosol impingers for virus-containing aerosols. *Atmospheric Environment* 42, 828-832.
- Da Silva A.R, Kavanagh O.V., Estes M.K., Elimelech M. 2011. Adsorption and aggregation properties of Norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environmental Science & Technology* 45, 520-526.
- DiCaprio E., Culbertson D., Li J. 2015. Evidence of the internalization of animal caliciviruses via the root of growing strawberry plants and dissemination to the fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-03867.

- DiCaprio E., Ma Y., Purgianto A., Hughes J., Li J. 2012. Internalization and dissemination of human norovirus and animal caliciviruses in hydroponically grown romaine lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6143-6152.
- Dungan R.S. 2014. Estimation of infectious risks in residential populations exposed to airborne pathogens during center pivot irrigation of dairy wastewaters. *Environmental Science & Technology* 48, 5033-504
- El Zanati O. 2011. Réention et restitution d'un Mengovirus murin, utilisé comme substitut du virus de l'hépatite A, dans un modèle de colonne de sol en fonction de la granulométrie des agrégats et propriétés physicochimiques de la solution circulante. *Mémoire de Master 2, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse*.
- 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.
- Goldstein R.E.R., Micallef S.A., Gibbs S.G., He X., George A., Sapkota A., Joseph S.W., Sapkota A.R. 2014. Occupational exposure to *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. among spray irrigation workers using reclaimed water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 4340-4355.
- Grinshpun S.A., Willeke K., Ulevicius V., Juozaitis A., Terzieva S., Donnelly J., Stelma G.N., Brenner K.P. 1997. Effect of Impaction, Bounce and Reaerosolization on the Collection Efficiency of Impingers. *Aerosol Science and Technology* 26, 326-42.
- Han T., Mainelis G. 2012. Investigation of inherent and latent internal losses in liquid-based bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science* 45, 58-68.
- Harstad J. B. 1965. Sampling submicron T1 bacteriophage aerosols. *Applied microbiology*, 13(6), 899-908.
- Henningson E.W., Ahlberg M.S. 1994. Evaluation of Microbiological Aerosol Samplers: A Review. *Journal of Aerosol Science* 25, 1459-92. doi:10.1016/0021-8502(94)90219-4.
- Hermann J.R., Hoff S.J., Yoon K.J., Burkhardt A.C., Evans R.B., Zimmerman J.J. 2006. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4811-4818.
- Hirneisen K.A., Kniel K.E. 2013. Comparative uptake of enteric viruses into spinach and green onions. *Food and Environmental Virology* 5, 24-34.
- Hogan C.J., Kettleon E.M., Lee M.H., Ramaswami B., Angenent L.T., Biswas P. 2005. Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1422-1434.
- 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.
- Jones A. M., et Harrison, R.M. 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review. *Science of the Total Environment*, 326(1), 151-180.
- Kennedy C., Baker L., Dhakal S., Ramaswami A. 2012. Sustainable urban systems: an integrated approach. *Journal of Industrial Ecology* 16, 775-779.
- 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.
- Koopmans M., Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90, 23-41.

- 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 l'Istituto superiore di sanità* 46, 266-273.
- Layshock J.A., Pearson B., Crockett K., Brown M.J., Van Cuyk S., Daniel W.B., Omberg K.M. 2012. Reaerosolization of *Bacillus* spp. in outdoor environments: a review of the experimental literature. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science* 10, 299-303.
- Li C.S. 1999. Evaluation of microbial samplers for bacterial microorganisms. *Aerosol Science & Technology*, 30(2), 100-108.
- Lin X., Willeke K., Ulevicius V., et Grinshpun S. A. 1997. Effect of sampling time on the collection efficiency of all-glass impingers. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 58(7), 480-488.
- 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.
- Lockyer D.R. 1984. A system for the measurement in the field of losses of ammonia through volatilization. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35, 837-848.
- Loubet B., Cellier P., Flura D., Genermont S. 1999a. An evaluation of the wind-tunnel technique for estimating ammonia volatilization from land: Part 1. Analysis and improvement of accuracy. *Journal of Agricultural Engineering Research* 72, 71-81.
- Loubet B., Cellier P., Genermont S., Flura D. 1999b. An evaluation of the wind-tunnel technique for estimating ammonia volatilization from land: Part 2. Influence of the tunnel on transfer processes. *Journal of Agricultural Engineering Research* 72, 83-92.
- 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.
- Martin L.R., Duke G.M., Osorio J.E., Hall D.J., et Palmenberg A.C. 1996. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.* Vol. 70, n°3, p. 2027-2031.
- 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.
- Morris C. E., Leyronas C., et Nicot P.C. 2014. Movement of Bioaerosols in the Atmosphere and the Consequences for Climate and Microbial Evolution. *Aerosol Science: Technology and Applications*, 393-415.
- 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.
- Petrinca A.R., Donia D., Pierangeli A., Gabrieli R., Degener A.M., Bonanni E., Diaco L., Cecchini G., Anastasi P., Divizia M. 2009. Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1608-1617.
- 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.
- Pusch D., Oh D.Y., Wolf S., Dumke R., Schröter-Bobsin U., Höhne M., Schreier E. 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of virology* 150, 929-947.
- 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.

- Raschid-Sally L., Jayakody P. 2008. Drivers and characteristics of wastewater agriculture in developing countries: results from a global assessment. *International Water Management Institute (IWMI)*, Research Report 127.
- 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.
- 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.
- Syngouna V.I., Chrysikopoulos C.V. 2010. Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. *Environmental Science and Technology* 44, 4539-4544.
- Taylor R.G. et al. 2012. Ground water and climate change. *Nature Climate Change*, published online.
- Tseng C.C., Li C.S. 2005. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *Journal of Aerosol Science* 36, 593-607.
- Van den Berg H., Lodder W., van der Poel W., Vennema H., de Roda Husman A.M. 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology* 156, 532-540.
- Van der Bruggen B. 2010. The global water recycling situation. *Sustainability Science and Engineering*, 2, 41-62.
- Verreault D., Moineau S., Duchaine C. 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 413-444.
- 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.
- West J.S., Kimber R.B.E. 2015. Innovations in air sampling to detect plant pathogens. *Annals of Applied Biology* 166, 4-17.
- WHO 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Geneva : WHO (World Health Organization).
- 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, 369-375.