



HAL
open science

Étude de la transmission du virus grippal dans les espaces clos : rôle des supports

Florian Cordonnier

► **To cite this version:**

Florian Cordonnier. Étude de la transmission du virus grippal dans les espaces clos : rôle des supports. Biodiversité et Ecologie. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC1101 . tel-01459195

HAL Id: tel-01459195

<https://theses.hal.science/tel-01459195>

Submitted on 7 Feb 2017

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

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

UNIVERSITE PARIS EST CRETEIL - UPEC

SCIENCES ET TECHNOLOGIE

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l' UNIVERSITE PARIS EST CRETEIL

Spécialité :

Ecole doctorale Sciences, Ingénierie et environnement - SIE

Présentée par

Florian CORDONNIER

**ETUDE DE LA TRANSMISSION DES VIRUS
RESPIRATOIRES DANS LES ESPACES CLOS :
LE ROLE DES SURFACES**

Soutenue publiquement le 22 mars 2016

Directeur de thèse

Evelyne GEHIN

Co-Encadrants

Thi-Lan HA et Enric ROBINE

JURY

Président :

Georges TYMEN

Professeur Emérite, Université de Bretagne Occidentale , Brest

Rapporteurs :

Anne-Marie DELORT

Professeur, CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand

Laurence LE COQ

Professeur, Ecole des Mines de Nantes, Nantes

Examineurs :

Evelyne GEHIN

Professeur, Directrice du CERTES, Université Paris Est Créteil, Créteil

Thi-Lan HA

Docteur, Ingénieur de recherche, CSTB, Marne-la-Vallée

Invité :

Enric ROBINE

Docteur, Directeur de laboratoire, CSTB, Marne-la-Vallée

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu les membres de mon jury de thèse, Monsieur Georges TYMEN, Professeur Emérite à l'Université de Bretagne Occidentale à Brest, d'avoir accepté d'assurer la présidence de ce jury de thèse. Madame Anne-Marie DELORT, Professeur à l'Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand et Directrice de Recherche au CNRS d'avoir accepté d'évaluer mon travail et également Madame Laurence LE COQ, Professeur et Directrice de la recherche à l'École des Mines de Nantes, d'avoir accepté de participer à cette soutenance et d'examiner ce travail.

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein du pôle de Recherche et Innovation pour l'Hygiène des Bâtiments (RIHB) du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment. Je tiens donc à remercier Christian COCHET et Monsieur Enric ROBINE, pour m'avoir accueilli dans leur unité et pour avoir assurés le financement de cette thèse.

Je désire exprimer mes plus sincères remerciements à Madame Evelyne GEHIN, ma directrice de thèse et Thi-Lan HA mon encadrante au sein du RIHB.

Je tiens à remercier tous mes collègues qui m'ont accompagnés au cours de ces trois années de travail au laboratoire. En premier lieu Stéphane mon collègue de bureau et partenaire de canoë qui a toujours été là pour me soutenir dans les bons comme dans les mauvais moments (merci pour les bonbons). Je remercie également nos extraordinaires techniciennes Christelle et Isabelle (maintenant docteur Isabelle, encore félicitation) pour m'avoir supporté lorsque je venais râler dans leur bureau pour des manip foireuses. Merci à Marina de m'avoir montré le chemin même à distance.

Un merci pour mes stagiaires Philippe, Qui Khanh et Alexandra de m'avoir apporté leur aide.

Je remercie également les plus incroyables doctorants devenus docteurs, Yaël, Ruki, Brice, Malya et Mory. Nous avons passé d'incroyables moments au badmington, au foot et au restaurant. Je remercie la plus importante des doctorantes devenu docteur bien avant moi, Carole dit "pupuce" qui a eu l'incroyable "chance" de devenir ma femme. Tu as su me supporter pendant ces années et cela n'a pas toujours été simple.

Je ne peux que remercier du fond du cœur mes parents. Merci Papa, Maman, de m'avoir toujours soutenu et encouragé pendant toutes ces années d'étude. Je sais que cela n'a pas toujours été facile car il faut le dire je n'ai pas toujours été un élève exemplaire. Vous avez toujours su croire en moi même pendant mes petites années d'égarement. Je voudrais également remercier ma famille qui a toujours suivi l'évolution de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier également ma belle famille, Marie-Claude et Alain qui ont su m'encourager comme ils l'ont fait pour leur fille. Sabine et Damien "mes boff" qui m'ont également supporté pendant ces années de "ralage". Merci au Choupi qui a éclairé les derniers mois de thèse par sa présence baveuse pour ses premiers mois d'existence.

Cette thèse représente donc l'aboutissement de trois années de travail en laboratoire et trois années de plus en parallèle de ma vie professionnelle.

**Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir.... En d'autres termes...
Plus ça rate et plus on a de chances que ça marche... - Devise Shadok.**

RÉSUMÉ

Les espaces clos constituent des lieux où la plupart des pathologies infectieuses sont contractées. Le temps passé et le confinement dans ces environnements favorisent notamment l'émergence et la transmission de certaines viroses respiratoires. Des travaux ont montré que certaines surfaces étaient fréquemment contaminées dans ces espaces. Il a également été mis en évidence un lien entre la présence de virus sur les surfaces et des cas d'infections.

Le rôle de l'environnement sur la survie du virus, en particulier la part relative des fomites, bien qu'évoquée, demeure méconnu. Ce travail de recherche vise donc à évaluer la propension des supports à inhiber la transmission des virus.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est d'étudier les matériaux et produits de construction sur cette question. L'originalité de cette thèse réside dans le développement de méthodologies de contamination pour reproduire la contamination des surfaces par une émission oropharyngée en utilisant un substitut salivaire associé à deux modes de contamination des surfaces : l'aérobiocontamination et le dépôt de gouttelettes. Le suivi des contaminations est assuré par une approche quantitative basée sur l'ARN des particules virales et une approche quantitative basée sur l'infectiosité des particules virales.

Les résultats montrent que le virus est capable de conserver une part de son infectiosité après une aérosolisation artificielle. Ils mettent également en évidence la capacité de certains matériaux, tels que le cuivre et le linoléum à affecter le génome viral en fonction du mode de contamination. Néanmoins, certains matériaux permettent de préserver l'infectiosité pendant au moins 24h.

ABSTRACT

Most infectious diseases are contracted in indoor environments. The time spent and the confinement in these spaces fosters the emergence and transmission of certain respiratory viruses.

Various studies have shown a link between the presence of viruses on surfaces and infections.

The role of the environment on the survival of the virus, particularly the relative share of fomites, although briefly mentioned, remains unknown. This research aims to evaluate the propensity of media to inhibit the transmission of viruses.

In this context, the aim of this work is to study the role of building materials and products. The originality of this thesis lies in the development of methodologies to reproduce contaminating surface contamination by oropharyngeal emission, using a saliva substitute associated with two modes of surface contamination: airborne contamination and droplets deposition. Monitoring of contamination is provided by two quantitative approaches. One based on the RNA of the viral particles and the other on the infectivity of viral particles.

The results show that the virus is able to retain some of its infectivity after an artificial aerosolization. They also highlight the ability of certain materials, such as copper and the linoleum to affect the viral genome according to the mode of contamination. However, some materials can preserve infectivity for at least 24 hours.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	12
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
I Rappels sur les virus et cas particulier d'Influenza.....	14
I.1 Nomenclature	15
I.2 Effets sur la santé	18
I.3 Diagnostic biologique et prévention.....	20
II La contamination des environnements intérieurs	23
II.1 La source de la contamination	23
II.2 Comportement des particules émises	28
II.3 L'adhésion des virus aux surfaces.....	30
II.4 Les virus sur les surfaces des environnements intérieurs.....	33
II.5 Persistance des virus sur les surfaces en fonction des conditions environnementales	34
DEMARCHE.....	44
CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	47
I Contamination expérimentale des supports.....	47
I.1 Choix et préparation des matériaux	47
I.2 Production et maîtrise du matériel biologique	49
I.3 Montage d'aérobiocontamination	51
I.4 Procédure de contamination des matériaux.....	57
II Dénombrement des virus extraits du matériau	60
II.1 Procédure d'extraction	60
II.2 Evaluation de la flore totale par Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction.....	60
II.3 Evaluation des virus infectieux par <i>viral plaque assay</i>	64
CHAPITRE III : MISE AU POINT DES TECHNIQUES D'ÉTUDE.....	66
I Dispositif d'aérobiocontamination virale	66
I.1 Stabilité de l'aérosol	67
I.2 taille des particules virales aérosolisées	68
I.3 infectiosité du virus dans le générateur et en aérosol.....	72
I.4 Aérocontamination de surface.....	74
II Contamination virale par dépôt	79
II.1 Evaluation de la quantité de virus déposé	79
II.2 Incertitude liée à la contamination par dépôt de gouttelettes	79
II.3 Reproductibilité de la contamination par dépôt de gouttelettes.....	80
II.4 Aspect de la contamination par dépôt de gouttelettes	81

CHAPITRE IV : PERSISTANCE DU VIRUS INFLUENZA SUR LES SUPPORTS	82
I Etude de la charge virale déposée sur les matériaux	82
I.1 Etude de la charge virale totale initiale sur les matériaux	82
I.2 Etude de l'évolution de la charge totale surfacique	84
II Survie du virus à la surface des matériaux.....	88
II.1 Etude de la charge virale infectieuse initiale sur les matériaux	88
II.2 Etude de l'évolution de la charge totale surfacique	91
CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE.....	94
CONCLUSION.....	102
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	104
ANNEXES.....	110

FIGURES

Figure 1 Représentation d'un virus non enveloppé ou nu (a) et enveloppé (b) (Minor, 2007).....	15
Figure 2 Photographie du virus grippaux observés en microscopie électronique (Beby-Defaux <i>et al.</i> , 2003)	16
Figure 3 : Schéma d'un virus grippal de type A (Beby-Defaux <i>et al.</i> , 2003).	16
Figure 4 Cycle de réplication du virus Influenza A. modifié de (Fodor <i>et al.</i> , 2002). Fixation et endocytose du virus (1), fusion de la membrane virale avec l'endosome et libération du matériel viral dans le cytoplasme (2), réplication et transcription de l'ARN viral dans le noyau (3), synthèse et maturation des protéines virales dans le cytoplasme (4), assemblage et bourgeonnement des virions néoformés (5).	17
Figure 5 Mécanismes d'action des antiviraux pour le virus Influenza (Abed et Boivin, 2006).....	21
Figure 6 Répartition des particules en fonction du domaine de taille : (A) au niveau de la surface d'échantillonnage pour un essais sans colorant, (B) à la bouche, répartition recalculée à partir d'un modèle d'évaporation, à partir des données de (Xie <i>et al.</i> , 2009). N= nombre de particules par classe de taille, Ntotal = nombre de total de particules émises.	26
Figure 7 Photographie d'un éternuement humain (modifiée) (Tang <i>et al.</i> , 2006).....	28
Figure 8 Trajectoire de gouttelettes de différents diamètres dans un jet non isotherme (Xie <i>et al.</i> , 2007)..	28
Figure 9 Schéma des couches ioniques entre un virus et une surface (Gerba, 1984)	30
Figure 10 Survie de <i>Herpes simplex virus</i> (A) et de <i>Vaccinia virus</i> (B) sur une lame de verre en fonction de l'humidité relative à 25°C - à partir des données de (Mahl et Sadler, 1975).....	39
Figure 11 Survie des virus () TGEV et () MHV sur de l'acier inoxydable à 20°C et à différentes humidités relatives (a) 20%, (b) 50%, (c) 80% (Casanova <i>et al.</i> , 2010).	40
Figure 12 Survie des virus () TGEV et () MHV sur de l'acier inoxydable à 50 % d'humidité relative à différentes températures (a) 4°C, (b) 20°C, (c) 40°C (Casanova <i>et al.</i> , 2010).....	40
Figure 13 Comparaison de la survie de plusieurs virus sur une surface en fonction de la dose de rayonnement UV-C à 55% HR et 25-28°C. Virus à ADN simple (Phi X174), ADN double brin (T7) et virus à ARN simple (MS2) et ARN double brin (Phi 6) (Tseng et Li, 2007)	41
Figure 14 Transfert par contact indirect. A partir des données de (Pancic <i>et al.</i> , 1980)	43
Figure 15 Transfert par contact direct. A partir des données de (Pancic <i>et al.</i> , 1980).....	43
Figure 16 Représentation schématique de la démarche expérimentale	45
Figure 17 Observation au microscope à platine inversée grossissement ×200 d'un tapis de cellules MDCK en croissance.	49
Figure 18 Photographie de l'isolateur	51
Figure 19 Représentation schématique du dispositif expérimental (1) Nébuliseur Collison, (2) Colonne de séchage, (3) Chambre d'homogénéisation, (4) <i>Electrical Low Pressure Impactor</i> (ELPI), (5) Bio- collecteur SKC, (6) Impacteur Andersen	52
Figure 20 Photographie d'un nébuliseur Collinson (www.bgiusa.com)	53
Figure 21 Schéma du nébuliseur Collison	53
Figure 22 Photographie d'un Impacteur liquide SKC (www.skinc.com)	54
Figure 23 Schéma du Biosampler (Lin <i>et al.</i> , 1999).....	54

Figure 24 Principe de fonctionnement et photo de l'ELPI (www.dekati.com)	55
Figure 25 Photographie impacteur Andersen à 1 étage	56
Figure 26 Schéma de l'impacteur Andersen à 1 étage et schéma de principe.....	56
Figure 27 Représentation schématique d'un dépôt de gouttes sur une surface et localisation des dépôts à la surface des coupons	57
Figure 28 Chronologie de l'analyse après contamination	57
Figure 29 Répartition des coupons dans l'impacteur Andersen	58
Figure 30 Photographie modifiée pour observer des zones de contamination sur le matériau	58
Figure 31 Chronologie de l'analyse après aérobio-contamination.....	59
Figure 32 Illustration du principe de la PCR en temps réel avec une sonde Taq Man® (www.ilm.pf).....	62
Figure 33 Représentation d'une amplification par PCR d'un fragment d'ADN – Roto Gene 6.....	62
Figure 34 Représentation schématique et photographie du dispositif expérimental (1) Nébuliseur Collison, (2) Colonne de séchage, (3) Chambre d'homogénéisation, (4) <i>Electrical Low Pressure Impactor</i> (ELPI), (5) Bio-collecteur SKC, (6) Impacteur Andersen	66
Figure 35 Evolution de la concentration particulaire de 0,21 à 0,81 µm à partir d'une suspension virale en substitut salivaire (HR 30%, 20°C, suspension à 3×10 ⁹ unités génomiques/mL)	67
Figure 36 Evolution au cours du temps de la granulométrie de l'aérosol de 0,04 à 5 µm	67
Figure 37 Profil granulométrique moyen de l'aérosol (HR 30%, 20°C, suspension à 3×10 ⁹ unités génomiques/mL)- ELPI (<i>DEKATI Ltd</i>).....	68
Figure 38 Distribution en nombre et en volume de l'aérosol.....	69
Figure 39 Estimation de la dispersion de l'analyse par PCR (Extraction d'ARN et analyse RT-PCRq) - A et du titre infectieux - B.	69
Figure 40 Profil granulométrique des particules virales quantifiées par PCRq.....	70
Figure 41 Profil granulométrique des particules virales quantifiées par VPA.	70
Figure 42 Profils granulométriques normalisés	71
Figure 43 Concentration virale de l'inoculum dans le nébuliseur après 10 minutes de fonctionnement. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur la méthode d'analyse PCRq ou VPA.....	72
Figure 44 Concentration virale en aérosol. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur la méthode d'analyse PCRq ou VPA.....	73
Figure 45 Quantité de virus déposée à t ₀ sur un coupon d'acier après 10 min d'impaction et estimée après extraction. L'incertitude correspond à un min-max sur l'acier et à l'erreur sur l'analyse en aérosol.	74
Figure 46 Photographies réalisées au MEB. Effet du temps d'impaction sur l'aspect du dépôt sur acier. (A) 10 min d'impaction et (B) 1 min d'impaction.....	75
Figure 47 Photographies réalisées au MEB d'une impaction de 1 min sur acier.....	75
Figure 48 Impact du temps d'impaction sur la quantité d'unités génomiques extraite à t ₀ . les barres d'erreur représentent des min max.	76
Figure 49 Impact du temps d'impaction sur la quantité de virus infectieux extrait à t ₀ . Les incertitudes correspondent à des min max.	76
Figure 50 Variation de l'aérobiocontamination en fonction de l'emplacement des coupons dans l'impacteur. Les incertitudes correspondent à l'incertitude sur l'analyse PCRq.....	77

Figure 51 Variation de l'aérobiocontamination après deux impactions successives avec le même inoculum. Les barres d'erreurs correspondent à l'incertitude sur l'analyse PCRq.....	78
Figure 52 Estimation de la reproductibilité de la contamination par impaction. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur l'extraction.	78
Figure 53 Quantité de virus infectieux après dépôt de gouttelette sur acier. Les barres d'erreur représentent un min-max.....	79
Figure 54 Estimation de la dispersion sur la quantité de virus infectieux déposée par voie liquide sur acier. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur la méthode d'analyse par PCRq.	80
Figure 55 Estimation de la reproductibilité de la contamination par dépôt de gouttelettes. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur l'extraction.	80
Figure 56 Photographies réalisées au MEB d'un dépôt sur acier, après séchage, de gouttelettes du substitut salivaire sans virus. La marque noire est un repère pour localiser le dépôt à la surface du matériau.	81
Figure 57 Quantité d'unités génomiques après dépôt d'aérosols sur les matériaux. Les barres représentent l'incertitude sur la reproductibilité de l'aérobiocontamination décrite dans CHAPITRE III :I.4.D.	82
Figure 58 Quantité d'unités génomiques après dépôt de gouttelettes sur les matériaux. Les barres d'incertitudes représentent des min-max.	83
Figure 59 Evolution de la charge virale totale déposée sur les matériaux par aérobiocontamination à 50% d'HR et 21°C. Les barres représentent l'incertitude sur la reproductibilité de l'aérobiocontamination.....	84
Figure 60 Evolution de la charge virale totale déposée sur l'acier, le verre, le PVC et le papier par dépôt de gouttelettes. Ambiance à 50% d'HR et 21°C. Les barres représentent l'incertitude sur la reproductibilité de la contamination	85
Figure 61 Evolution de la charge virale totale déposée sur le cuivre et le linoléum par dépôt de gouttelettes. Ambiance à 50% d'HR et 21°C. Les barres représentent l'incertitude sur la reproductibilité de la contamination	86
Figure 62 Quantité de virus infectieux après aérobiocontamination sur les matériaux. Les barres d'incertitudes représentent la reproductibilité de l'aérobiocontamination.	88
Figure 63 Quantité de virus infectieux après contamination par dépôt de gouttelettes sur les matériaux. Les barres d'incertitudes représentent des min-max.	89
Figure 64 $R_{(I/T)}$ à après contamination par dépôt de gouttelettes sur les matériaux. Les barres d'incertitudes correspondent à des min-max.....	90
Figure 65 Evolution de la survie du virus Influenza sur les supports après une contamination par voie liquide à 21°C et HR à 50%. Les barres d'erreurs représentent l'incertitude sur la reproductibilité de la contamination.....	92
Figure 66 Ratio de survie du virus Influenza à t_2 après aérobiocontamination en fonction de l'hydrophobicité des matériaux, Aucune survie détectée.....	100
Figure 67 Goutte d'un liquide en équilibre	110
Figure 68 Schéma d'une goutte de liquide lors de l'inclinaison du plateau.(Abrakhi, 2011)	111

TABLEAUX

Tableau 1 Tableau récapitulatif des résultats bibliographiques.	24
Tableau 2 Liste des forces impliquées dans l'adsorption des virus sur une surface (Chattopadhyay et Puls, 1999).....	31
Tableau 3 Conditions expérimentales et survie de virus respiratoires sur les surfaces à partir des données de (Boone et Gerba, 2007) et complété.	35
Tableau 4 Matériaux utilisés.....	47
Tableau 5 Composition commerciale modifiée d'un substitut salivaire constitué à partir des données de (Meyer-Lueckel et Kielbassa, 2002).....	50
Tableau 6 Spécification des étages de l'ELPI : nombre d'orifices, d_{50} (μm) et pression (kPa).....	55
Tableau 7 Caractéristiques de l'impacteur Andersen à 1 étage utilisé pour l'aérobiocontamination de matériaux.....	56
Tableau 8 Composition, volumes des réactifs et programme PCRq pour l'amplification du virus Influenza	63
Tableau 9 Proportion de particules virales et de virus infectieux	71
Tableau 10 Réduction du génome viral en Log_{10} après un temps de contact.....	87
Tableau 11 Ratio de survie du virus Influenza à t_0 après aérobiocontamination	89
Tableau 12 Evolution de la survie du virus Influenza sur les supports après aérobiocontamination à 21°C et HR à 50%.....	91
Tableau 13 Influence des matériaux à 2h, (++) effet important, (+) effet, (-) pas d'effet; R(I/T): (+) dégradation structure membranaire, (?) dégradation membranaire et/ou génomique	101
Tableau 14 : Valeurs des tensions superficielles des liquides utilisées ainsi que leurs composantes	111

INTRODUCTION

Les espaces clos constituent des lieux où la plupart des pathologies infectieuses sont contractées. Le temps passé et le confinement dans ces environnements favorisent notamment l'émergence et la transmission de certaines viroses respiratoires, posant de réelles difficultés en termes de gestion du risque infectieux et de politique de santé publique.

Par exemple, le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) est le principal responsable des épidémies saisonnières de bronchiolite, particulièrement répandue chez les jeunes enfants. Il est responsable d'une augmentation des consultations pédiatriques durant les périodes hivernales.

De même, Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le virus de la grippe affecte plusieurs millions de personnes par an à travers le monde, avec une mortalité élevée (500 000 décès/an) malgré les vaccins et traitements médicaux. En France, la grippe saisonnière constitue la première cause de mortalité par maladie infectieuse. Elle représente aussi une part prépondérante des consultations de médecine générale pendant l'automne et l'hiver. En moyenne 2 à 8 millions de personnes seraient concernées chaque année (Source GEIG). Pour les entreprises, les flambées de gripes sont sources d'absentéisme professionnel, et de perte de productivité. Les dépenses directes et indirectes, attribuables à la grippe (consultation, hospitalisation, pharmacie, indemnités journalières et pertes professionnelles) varient selon l'intensité des épidémies, de un à trois milliard d'euros par an. La grippe compte donc parmi les infections les plus graves en termes de conséquences sanitaires, sociales et économiques.

La grippe est une infection virale aiguë qui se propage facilement d'une personne à l'autre. En effet, elle possède plusieurs modes de transmission qui permettent au virus de pénétrer dans l'organisme via les muqueuses respiratoires. L'infection se développe alors dans la partie haute de l'arbre respiratoire (larynx, pharynx) ou dans la partie basse (bronches, poumons).

Après multiplication, les virus sont excrétés hors de l'organisme via des gouttelettes respiratoires lors d'épisodes de toux ou d'éternuement et via la parole. Ces gouttelettes peuvent être transportées par l'air ou se déposer sur les supports (fomites). Les gouttelettes les plus grosses se déposent par sédimentation tandis que les plus fines, le sont par diffusion turbulente résultant du mouvement propre de l'air.

Les émissions d'origines humaines contribuent pour une part importante à la biocontamination présente dans les environnements intérieurs. Des travaux ont montré que certaines surfaces étaient fréquemment contaminées dans ces espaces. Il a également été mis en évidence un lien entre la présence de virus sur les surfaces et des cas d'infections déclarées chez les enfants. En 2009, lors de l'émergence du nouveau virus *Influenza A H1N1*, l'Institut National de Science Médicale et de Nutrition de Mexico a fait part de la contamination de surfaces par le virus dans un contexte hospitalier. Il apparaît cependant que certaines surfaces pourraient être capables d'influencer la persistance des virus.

En dehors de rares études expérimentales, la propension des supports à inhiber la transmission des virus reste cependant très peu documentée. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est d'étudier les matériaux et produits de construction sur cette question.

L'originalité de ce travail réside :

- Dans le développement de méthodologies de contamination pour reproduire la contamination des surfaces par une émission oropharyngée. En effet un substitut salivaire est associé à deux modes de contamination des surfaces : l'aérobiocontamination et le dépôt de gouttelettes.
- L'utilisation d'une approche quantitative basée sur l'ARN des particules virales et une approche quantitative basée sur l'infectiosité des particules virales.

Le manuscrit de la thèse s'articule autour de quatre chapitres. Le **chapitre 1** fait une présentation générale sur le virus Influenza et le point sur les connaissances actuelles relatives à la contamination des environnements intérieurs. Ce chapitre permet d'appréhender les enjeux scientifiques de la thèse.

Le **chapitre 2** concerne le matériel et méthode, avec une partie sur la contamination expérimentale et une deuxième sur les méthodologies d'analyses.

Le **chapitre 3** décrit les caractéristiques de la contamination de surface, de la production d'un aérosol viral, de l'aérobiocontamination et de la contamination par gouttelettes.

Enfin le **chapitre 4** présente les résultats des contaminations de matériaux en s'intéressant en premier lieu à la charge virale déposée puis à son infectiosité.

Pour terminer le **chapitre 5** discute l'ensemble des résultats et synthétise les conclusions.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce premier chapitre présentant l'étude bibliographique sur les virus et les environnements intérieurs est divisé en deux grandes parties. Dans un premier temps quelques généralités sur les éléments de virologie sont présentées, puis une description du virus respiratoire étudié est réalisée. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la contamination virale des surfaces des environnements intérieurs de la source jusqu'aux surfaces. Ainsi, nous aborderons les émissions respiratoires source de la contamination, le transport des particules, le dépôt des agents pathogènes et les facteurs influençant la persistance des virus sur les surfaces.

I RAPPELS SUR LES VIRUS ET CAS PARTICULIER D'INFLUENZA

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui utilisent la machinerie de biosynthèse de la cellule hôte pour se répliquer. Ce sont des agents infectieux de taille généralement comprise entre 25 à 400 nm suivant les virus, qui abondent dans la nature et sont capables d'infecter toutes les formes de vie : Eucaryotes (vertébrés, invertébrés, plantes et champignons) et Procaryotes (bactérie et archée) (Brown, 2001; Minor, 2007). Ces entités biologiques existent sous une forme extra cellulaire, ils sont alors appelés virion, ou intracellulaire.

Concernant la structure des virus, ils sont, a minima, constitués :

- d'un génome viral qui peut être un acide désoxyribonucléique (ADN) ou un acide ribonucléique (ARN) simple ou double brin. Il peut être linéaire, circulaire, voire segmenté.
- d'une capsidie qui consiste en une succession de sous unités protéiques identiques, les nucléoprotéines, et a vocation à protéger le matériel génétique viral. Associée à l'acide nucléique la capsidie est désignée par le terme de nucléocapsidie.

A l'instar des *Influenza*, certains virus possèdent une enveloppe lipidique empruntée à la cellule hôte (Brown, 2001; Mc Kenna et Faulkner, 2001; Minor, 2007) (Figure 1).

Outre des glycoprotéines, présentes à sa surface sous forme de spicules, l'enveloppe lipidique est constituée de deux autres composants mineurs ; la protéine de matrice M1 qui sous-tend l'ensemble de l'enveloppe et la protéine M2 enchâssée dans la bicouche lipidique.

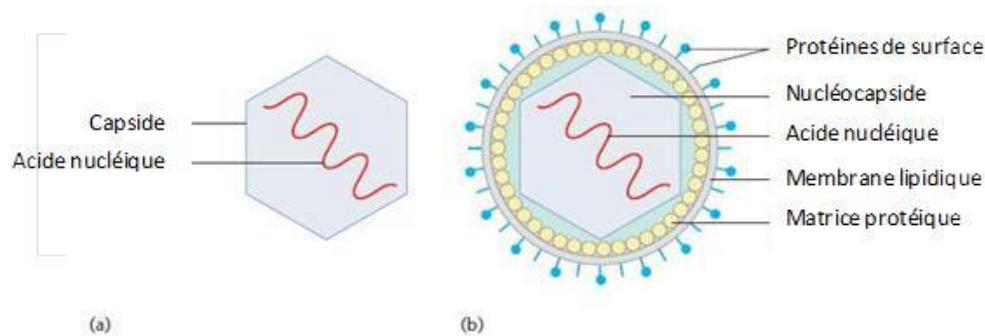


Figure 1 Représentation d'un virus non enveloppé ou nu (a) et enveloppé (b) (Minor, 2007)

I.1 NOMENCLATURE

Concernant leur classification, de par leur nature, les virus ne peuvent pas être ajoutés à la classification phylogénétique des êtres vivants. Aujourd'hui, deux classifications leur sont dédiées :

- La classification Baltimore, proposée par David Baltimore, lauréat du prix Nobel de médecine en 1975, qui est basée sur le type d'acide nucléique des virus (ADN ou ARN). Les virus y sont ainsi classés en sept groupes.
- La classification de l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) utilise quant à elle un système de nomenclature semblable à la classification de Linné pour les êtres vivants. Les virus sont rangés par Ordre (suffixe « -virale »), Famille (suffixe « -viridae »), sous-famille (suffixe « -virinae »), genre (suffixe « -virus ») et espèce (généralement le nom courant de l'espèce) (Büchen-Osmond, 2003).

Il est possible au sein de l'espèce de distinguer des types, sous types, des variants et des souches.

Le virus *Influenza* responsable de la grippe est rattaché selon la classification Baltimore au Groupe V des virus à ARN monocaténaire à polarité négative. Selon l'ICTV, il appartient à la famille des *Orthomyxoviridae*. Cette famille comprend un genre *Influenzavirus* avec trois types A, B et C. Les sous types sont de la forme HxNy et sont définis par l'expression de deux protéines de surface ; l'hémagglutinine et la neuraminidase. A ce jour, 16 hémagglutinines et 9 neuraminidases différentes ont été identifiées. Il existe 24 combinaisons découvertes soit 24 sous types viraux de *Influenza* A (Neumann et Kawaoka, 2007).

La nomenclature complète pour tout virus de la grippe isolé pendant une épidémie comprend les informations concernant le type de virus (description antigénique des nucléoprotéines A, B ou C), l'hôte d'origine (sauf pour l'homme), l'origine géographique de l'isolat, le numéro de la souche et l'année d'isolement. En dernier le caractère antigénique du sous type (HxNy) est ajouté entre parenthèses (Fleury, 2002; Neumann et Kawaoka, 2007).

A titre d'exemple, on peut citer le virus *Influenza* de type A de sous type H1N1.

I.1.A Structure du virus Influenza

Les virus *Influenza* sont pléomorphes avec des morphologies rondes ou allongées (Figure 2). Les formes rondes ont un diamètre de 80 à 120 nm (Neumann et Kawaoka, 2007; Nayak *et al.*, 2009).

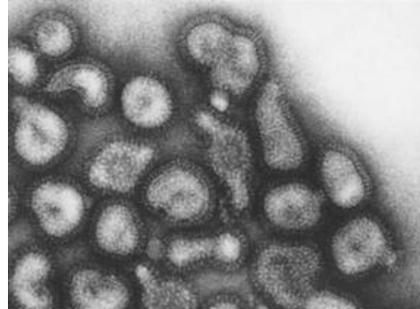


Figure 2 Photographie du virus grippaux observés en microscopie électronique (Bebey-Defaux *et al.*, 2003)

Il s'agit de virus à acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité négative. Le génome, dont la longueur, de l'ordre de 13 à 15000 nucléotides, diffère d'un type à l'autre, est segmenté en huit morceaux pour les virus de types A et B et sept pour le virus de type C (Manugerra et Hannoun, 1999; Fleury, 2002; Neumann et Kawaoka, 2007).

Le virus de la grippe possède autant de capsides qu'il y a de segments d'ARN. Les nucléoprotéines déterminent le type viral A, B ou C (Manugerra et Hannoun, 1999).

Ce sont des virus enveloppés sur la membrane desquels sont fixées des spicules d'hémagglutinine (HA) et de neuraminidase (NA) (Figure 3).

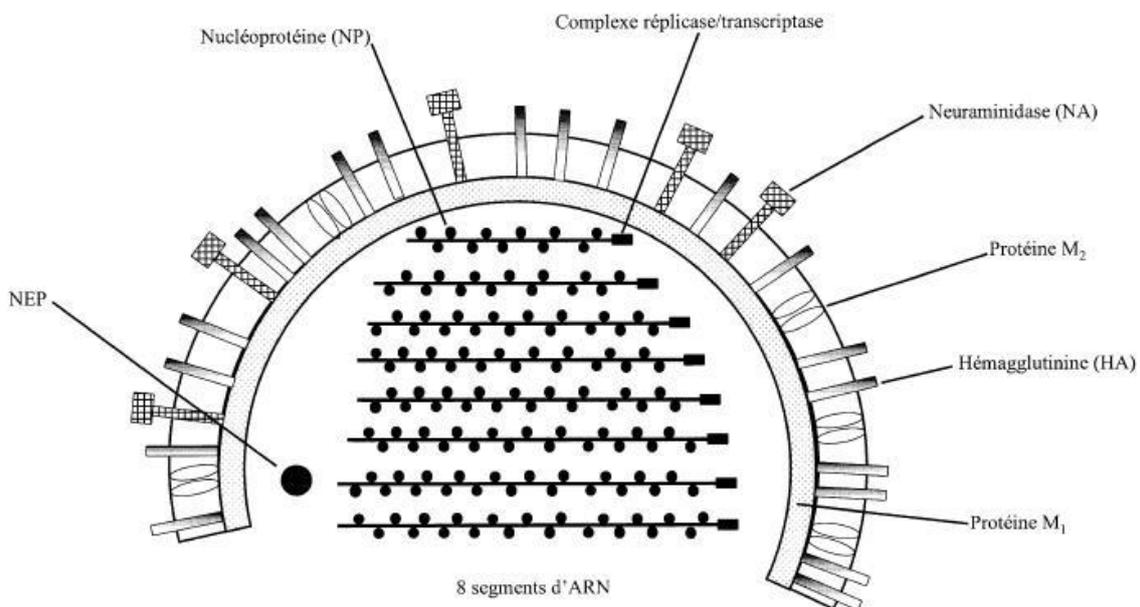


Figure 3 : Schéma d'un virus grippal de type A (Bebey-Defaux *et al.*, 2003).

L'hémagglutinine, qui représente environ 80% des protéines de la membrane, permet la fixation du virus à la surface des cellules ciliées de l'épithélium du tractus respiratoire. La neuraminidase, qui représente environ 17% des protéines membranaires, permet la libération

des virions néoformés à la surface des cellules. C'est une fonction primordiale aussi bien au niveau de la libération des virus que de la transmission entre hôtes (Nayak *et al.*, 2009).

Le génome des virus est hautement conservé à l'exception des sections codant pour les sous-types (Neumann et Kawaoka, 2007).

I.1.B Cycle viral du virus Influenza

Les virus respiratoires ont pour organe-cible principal l'arbre respiratoire. Ils peuvent infecter la partie haute de l'arbre respiratoire (Larynx, pharynx) ou la partie basse (Bronches, poumons). La plupart des infections à virus respiratoires sont des « infections localisées », établies au niveau de la muqueuse respiratoire et n'allant généralement pas plus profondément dans les voies aériennes.

Le virus *Influenza* infecte dans un premier temps les cellules épithéliales du tractus respiratoire supérieur. Le cycle de multiplication virale peut être schématisé en 5 étapes (Figure 4).

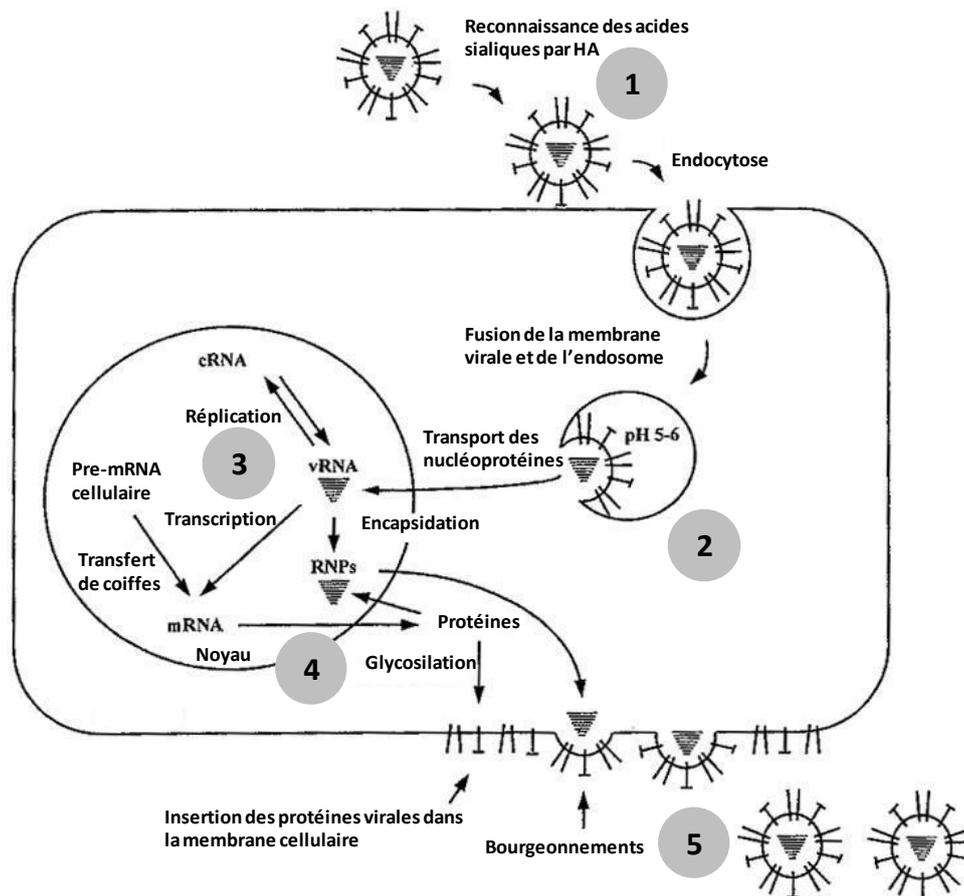


Figure 4 Cycle de réplication du virus Influenza A. modifié de (Fodor *et al.*, 2002). Fixation et endocytose du virus (1), fusion de la membrane virale avec l'endosome et libération du matériel viral dans le cytoplasme (2), réplication et transcription de l'ARN viral dans le noyau (3), synthèse et maturation des protéines virales dans le cytoplasme (4), assemblage et bourgeonnement des virions néoformés (5).

Le cycle viral débute par la phase d'attachement du virus à la membrane cytoplasmique de la cellule respiratoire grâce à l'hémagglutinine. Le virus est ensuite internalisé par endocytose. L'activation du canal ionique permet l'entrée de protons dans l'endosome ce qui entraîne une acidification du milieu et déclenche la fusion des membranes endosomale et virale. L'acidification des endosomes provoque également la dissociation de la protéine M1 et des nucléoprotéines. Les nucléoprotéines libérées sont transportées vers le noyau de la cellule. Dans le noyau, les ARN polymérases vont transcrire l'ARN viral en ARN messagers (ARNm) afin de synthétiser les protéines virales. En parallèle, les segments d'ARN viraux se répliquent donnant naissance aux ARN viraux néoformés. Une partie des protéines est sécrétée à la surface de l'appareil de Golgi après glycosylation (HA et NA) tandis que le reste est ramené vers le noyau pour l'encapsidation des ARN viraux néoformés avant d'être exportés vers le cytoplasme. Les nucléocapsides formées migrent vers un renflement situé à la surface de la cellule, créé par l'accumulation des glycoprotéines HA et NA. Le virus mature va alors bourgeonner de la cellule dans son enveloppe constituée des phospholipides de la membrane cellulaire. La libération du bourgeon va se faire grâce à l'action de la neuraminidase. La neuraminidase assure également la diffusion des virions dans le mucus (Freymuth, 2001; Fleury, 2002; Fodor *et al.*, 2002; Beby-Defaux *et al.*, 2003; Neumann et Kawaoka, 2007).

I.2 EFFETS SUR LA SANTE

I.2.A Les signes cliniques

Le virus *Influenza* est responsable d'une maladie respiratoire : la grippe. L'infection du virus Influenza entraîne classiquement l'apparition des symptômes après une courte incubation de 1 à 2 jours. Les premiers symptômes à apparaître sont généraux avec une forte fièvre (température pouvant atteindre voire dépasser 40°C sans traitement) accompagnée de douleurs musculaires, articulaires, de céphalées et de malaises. Puis rapidement apparaît une inflammation des voies respiratoires hautes (pharyngite) suivie éventuellement d'une conjonctivite. Peu à peu l'infection gagne le système respiratoire profond. Après quelques jours, la fièvre peut osciller (« V » grippal) avant de disparaître. Les symptômes généraux cèdent la place aux symptômes locaux respiratoires avec une broncho-pneumonie et une toux sèche. Généralement, la guérison se fait spontanément en 4 à 7 jours avec une période de convalescence de 10 à 15 jours. Il existe cependant des cas rares de gripes plus sévères dites malignes, souvent mortelles, observables lors de pandémie. Elle entraîne souvent une insuffisance respiratoire importante à l'origine d'un œdème aigu irréversible. Après une grippe, les surinfections sont fréquentes et impliquent souvent des staphylocoques, streptocoques, pneumocoques, haemophiles ou klebsielles.

La grippe est une infection virale aiguë qui se propage facilement d'une personne à l'autre. Il existe plusieurs modes de transmission mais le virus pénètre toujours dans l'organisme via les muqueuses respiratoires. Le virus se fixe sur les récepteurs membranaires, pénètre dans la cellule et s'y multiplie. Après libération des nouveaux virus, sous l'effet de la neuraminidase

ils diffusent dans les sécrétions respiratoires vers l'ensemble des voies respiratoires supérieures, bronches et parfois bronchioles. Au cours de l'infection grippale, le fonctionnement ciliaire des cellules épithéliales est interrompu, l'épithélium est endommagé ce qui entraîne une réaction inflammatoire et une hypersécrétion de mucus à l'origine de l'obstruction des bronches et bronchioles. La mise à nu des cellules épithéliales entraîne une surinfection bactérienne. La mise en place des défenses antibactériennes amplifie l'inflammation et la sécrétion de mucus (Freymuth, 2001). Une évolution rare et controversée de l'infection par le virus Influenza est une virémie, soit une diffusion générale du virus dans l'organisme. Cependant des complications extra pulmonaires ont déjà été observées, ainsi que des complications au niveau du système nerveux central, au niveau du cœur et des muscles (Kuiken et Taubenberger, 2008).

I.2.B Données épidémiologiques

Sur la saison 2014-2015, 2,9 millions de consultations pour syndrome grippal ont été comptabilisées par les réseaux de surveillance. Pendant l'épidémie de grippe, 18 300 décès observés à 90% sur les sujets âgés de plus de 65 ans.

Au-delà du bilan humain, le coût de la maladie représente une charge financière importante pour l'état. Le groupe d'étude et d'information de la grippe estime, selon l'intensité de la grippe, entre 230 et 840 millions d'euros la seule prise en charge en médecine ambulatoire, hors hospitalisations et pertes de production annuelle (<http://www.grippe-geig.com>).

Dans les pays tempérés la grippe sévit en hiver et au printemps et dure 6 à 8 semaines. Dans les régions intertropicales le virus circule de façon sporadique et continue pendant la saison des pluies.

L'Homme est le principal hôte naturel des virus grippaux de type B et C alors que le type A se retrouve dans de nombreuses espèces mammifères, mais aussi surtout chez les oiseaux. Les trois types ont une importance très inégale dans l'émergence d'épidémies. Ainsi seuls les types A et B sont responsables des épidémies saisonnières (Beby-Defaux *et al.*, 2003).

I.3 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE ET PREVENTION

I.3.A Méthodes de diagnostic

Le diagnostic permet de confirmer les cas de grippe et, de ce fait, est primordial pour la surveillance épidémiologique, la mise à jour des compositions de vaccins et la mise en place d'un traitement prophylactique à l'aide d'antiviraux. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande, pour réaliser un diagnostic, un prélèvement rhinopharyngé réalisé dans les 3 jours après la déclaration des symptômes. Le test de diagnostic doit permettre d'identifier le virus grippal et d'exclure les autres infections respiratoires virales communes le plus rapidement possible. Les méthodes de diagnostic disponibles à ce jour sont :

- **Culture virale.** La culture virale ou isolement viral permet d'étudier la variabilité génétique et antigénique. Cependant l'obtention des résultats est lente car le virus de la grippe cultive en 9 à 11 jours dans le liquide amniotique ou allantoïque d'un embryon d'œuf et en 2 à 4 jours sur cellules canines (Madin-Darby canine kidney). La détection du virus en embryon d'œuf se fait par hémagglutination et pour les cultures cellulaires par immunofluorescence et hémagglutination. L'identification du type est réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux. L'identification plus précise du sous type est effectuée par inhibition de l'hémagglutination à l'aide de sérum polyclonaux (Beby-Defaux *et al.*, 2003).
- **Méthodes immunologiques.** Les résultats peuvent être obtenus en 15 à 30 minutes. On distingue :
 - Test d'immunochromatographie sur membrane dit « diagnostic réalisé au chevet du malade ». Ces tests sont disponibles dans le commerce.
 - Immunofluorescence est une méthode basée sur la détection d'antigène viral dans les cellules desquamées à l'aide d'anticorps monoclonaux. Elle est largement employée pour le diagnostic des infections à virus grippal de types A et B et de celles dues à cinq autres virus respiratoires importants sur le plan clinique.
 - Test immunoenzymatique (ELISA) dédié à la recherche de la nucléoprotéine (NP) du virus grippal de type A.
- **PCR et RT-PCR en temps réel.** Des séries d'amorces spécifiques des virus grippaux sont de plus en plus largement utilisées. Les résultats sont disponibles en quelques heures à partir de prélèvements cliniques ou de cultures cellulaires infectées.

I.3.B Traitement et Vaccination

Le traitement de la grippe consiste en l'administration d'antiviraux dont on distingue deux familles :

- L'amantadine. Apparue en 1969, cette famille d'antiviraux inhibe une des premières étapes de la réplication du virus, en bloquant l'étape de décapsidation par l'inactivation de la protéine M2. Cette action rend le virus inerte.

- Les Inhibiteurs de Neuraminidase Virale (INV) qui interviennent lors de la dernière étape du cycle de réplication en inhibant le clivage des résidus d'acide sialique attachés aux glycoprotéines virales et aux glycolipides cellulaires. De fait, les INV empêchent la libération des virus et favorisent leur agglutination compromettant ainsi leur dispersion (Abed et Boivin, 2006).

La Figure 5 schématise les mécanismes d'action de ces antiviraux.

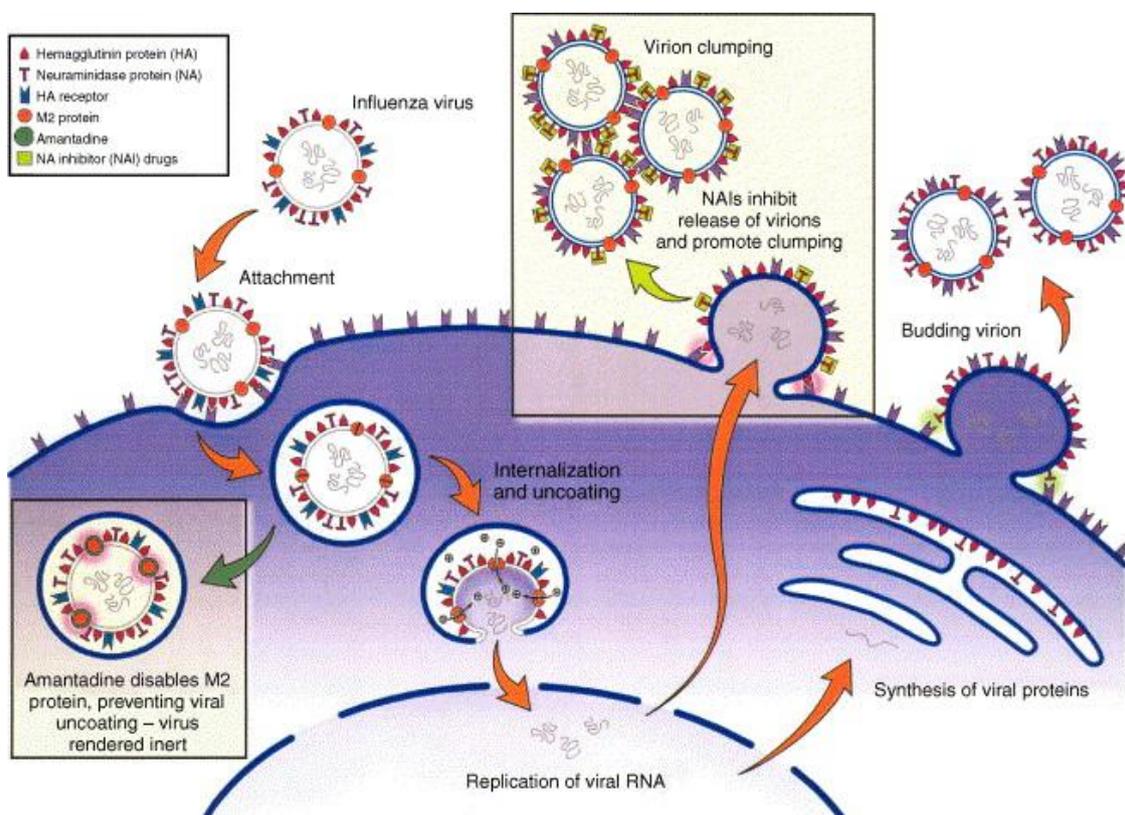


Figure 5 Mécanismes d'action des antiviraux pour le virus Influenza (Abed et Boivin, 2006).

Il est à noter que l'amantadine est inefficace contre le virus Influenza de type B. Les virus peuvent également acquérir une résistance au cours du traitement. Les INV peuvent aussi perdre en efficacité car le virus développe une résistance et devient moins dépendant de la neuraminidase pendant l'étape de bourgeoisement.

Concernant les vaccins, ils sont produits après culture en embryons d'œufs puis inactivés. Il existe différents types de vaccins qui contiennent soit le virus complet, le virus fractionné ou les antigènes de surface d'hémagglutinines et de neuraminidase purifiés par centrifugation (Nicholson *et al.*, 2003). L'OMS recommande des vaccins composés de deux sous types de virus A et un virus de type B. Les vaccins sont administrés par voie intramusculaire ou injection sous cutanée. Ces vaccinations parentérales présentent cependant des inconvénients car elles offrent une immunité circulante, par les IgG induits, mais pas d'immunité dans les sécrétions respiratoires (IgA). Les vaccins sont toujours « en retard d'une mutation » et si la mutation est une cassure alors le vaccin est inefficace. De plus, le temps de protection est de courte durée, il est donc nécessaire de recommencer la vaccination chaque année.

Pour pallier ces inconvénients de nouveaux types de vaccins sont en développement parmi lesquels :

- Un vaccin de type virosomal pour lequel des hémagglutinines sont fixées à un virosome, ce qui le rend plus immunisant qu'un vaccin inactivé conventionnel.
- Un vaccin par voie nasale capable d'induire une immunité mucoale à médiation humorale et cellulaire (Fleury, 2002; Nicholson *et al.*, 2003) apte à protéger l'épithélium respiratoire cilié, porte d'entrée du virus Influenza.

I.3.C Surveillance environnementale

La grande variabilité des virus grippaux impose une surveillance continue. La connaissance précoce de l'arrivée de l'épidémie saisonnière peut permettre de limiter son retentissement sur le système de soin, telles la désorganisation de la prise en charge en ville et à l'hôpital liée à l'afflux des patients ou les ruptures de stocks médicamenteux...). La connaissance des souches de virus grippal en circulation permet d'assurer l'adéquation de la composition des vaccins, évaluée annuellement.

Cette surveillance est organisée au niveau mondial par l'OMS. Elle s'appuie sur un réseau composé de 110 centres nationaux de référence (CNR) répartis dans 80 pays et quatre centres mondiaux de référence (Londres pour l'Europe). En France, il existe deux CNR, l'un à l'Institut Pasteur de Paris pour la France Nord, l'autre à la faculté de médecine de Lyon pour la France Sud.

Au niveau national il existe deux réseaux de surveillance épidémiologique de la grippe : le réseau « Sentinelles » de l'Inserm et le réseau des Grog (groupes régionaux d'observation de la grippe) qui intègre en plus des données virologiques. Leur but est de signaler le début et la fin des épidémies de grippe et d'en étudier l'impact sur la population générale. Ces réseaux sont constitués de médecins généralistes ou pédiatres volontaires qui transmettent chaque semaine des renseignements sur leur activité et sur les syndromes grippaux observés. L'information est directement centralisée par l'intermédiaire d'Internet pour le réseau « Sentinelles » alors qu'elle est relayée par des coordinations régionales au nombre de 19 pour les Grog. Les médecins des Grog effectuent également des prélèvements rhinopharyngés qu'ils transmettent au laboratoire de virologie régional. Un diagnostic rapide de grippe est rendu au médecin pour information, une recherche par culture est menée pour isoler les virus grippaux qui, après identification de type et de sous-type seront adressées au CNR de la région concernée pour étude plus approfondie des variants (Bebby-Defaux *et al.*, 2003).

II LA CONTAMINATION DES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS

II.1 LA SOURCE DE LA CONTAMINATION

II.1.A Les émissions oropharyngées

Les activités respiratoires humaines : respirer, tousser, éternuer et parler ; sont à l'origine de l'émission de particules formées dans les voies respiratoires, principalement pendant les phases d'inspiration et d'expiration, sous l'action de forces de cisaillement. Sous l'effet de la circulation de l'air des perturbations apparaissent au niveau du mucus des voies respiratoires et conduisent à la formation de particules (Fiegel *et al.*, 2006). La vibration des cordes vocales semble être aussi une source importante de gouttelettes formées à partir des sécrétions de lubrification (Morawska *et al.*, 2009).

Les publications sur la caractérisation des émissions oropharyngées présentent des résultats variés en fonction des techniques employées (compteur analyseur optique, microscopie, impacteur, IMI) et des activités étudiées (Tableau 1).

Tableau 1 Tableau récapitulatif des résultats bibliographiques.

Techniques	Références	Activités	Colorant	Etat de santé	Distance de prélèvement (mm)	Intervalles de diamètre mesuré (µm)	Diamètre majoritaire ^a (µm)	Nombre de particules	Concentration ^b (part/L)
Compteur Analyseur optique	(Gerone <i>et al.</i> , 1966)	Eternuer	Non	S	Volume	≤1-15	≤1	1,6×10 ⁶	
		Tousser					≤1	9×10 ⁵	
	(Fairchild et Stampfer, 1987)	Respirer	Non	N.I	masque	0,1-3	< 0,3	-	222
		Tousser						-	590
		Parler						-	622
	(Papineni et Rosenthal, 1997)	Respirer	Non	N.I	-	0,3-<8	< 1	-	5
		Tousser						-	83
		Parler						-	19
	(Edwards <i>et al.</i> , 2004)	Respirer	Non	AS	pièce buccale	0,085->0,5	< 0,2	faible prod < 500/6h super prod > 500/6h	
	(Yang <i>et al.</i> , 2007)	Tousser	Non	AS	masque	0,02-30	1-2-8,35	-	10 ⁶ à 2,3×10 ⁶
	(Fabian <i>et al.</i> , 2008)	Respiration	Non	S	masque	0,3-≥5	< 0,5	-	724
		Respirer					<0,8-1,8	-	50-92
	(Morawska <i>et al.</i> , 2009)	Tousser	Non	AS	10 à 1500	0,3-20	<0,8-1,8	-	640
		Parler					<0,8-1,8-3,5-5	-	307
(Holmgren <i>et al.</i> , 2010)	Respirer					0,07	-	10 ⁴ à >5×10 ⁵	
	Expirer complètement	Non	AS	pièce buccale	0,01 à >20 µm	entre 0,2 et 0,5	-	3×10 ⁴ à >5×10 ⁵	

Techniques	Références	Activités	Colorant	Etat de santé	Distance de prélèvement (mm)	Intervalles de diamètre mesuré (µm)	Diamètre majoritaire ^a (µm)	Nombre de particules	Concentration ^b (p/L)
Microscopie	(Duguid, 1946)	Eternuer			152,4		entre 4 et 8	10 ⁶	-
		Tousser	Oui	N.I	152,4	<1-2000	entre 8 et 16	5000	-
		Parler			76,2		entre 8 et 16	250	-
	(Loudon et Roberts, 1967)	Tousser	Oui	N.I	Volume 508x305x366	<1-1470	≈ 3 et 55	465	-
		Parler					≈ 85 µm	1764	-
	(Xie <i>et al.</i> , 2009)	Tousser	Non				entre 50 et 100	40	-
		Parler	Non	AS	Volume 508x305x366	<1-1500	entre 50 et 75	760	-
		Oui				entre 50 et 75	2273	-	
Impaction	(Hersen <i>et al.</i> , 2008)	Tousser	Non	AS/S	-	0,03-9,97	<5	10 ⁵ /10 ⁶ p/s	-
Interferometric Mie Imaging (IMI)	(Chao <i>et al.</i> , 2009)	Tousser	Non	S	10/60	2-2000	13,5/12,3	-	2400 à 5200
		Parler					16/13,4	-	4 à 223

^aDiamètre majoritaire, correspond à un mode ou une gamme de taille comptant le plus grand nombre de particules - ^bConcentration, dépendante de la publication et précisée à titre indicatif - AS : Asymptomatique - S: Symptomatique - N.I : Non infecté

L'étude des diamètres des particules montre des particules submicroniques à millimétriques jusqu'à 2000 μm (diamètre après évaporation) et un nombre de particules émises qui peut évoluer de quelques dizaines jusqu'au million de particules.

Ainsi les premières expérimentations destinées à caractériser la taille des particules émises utilisaient des techniques de comptage par microscopie après dépôt et coloration de la salive (Duguid, 1946; Loudon et Roberts, 1967). Ces études ont mis en évidence pour la toux, l'éternuement et la parole une émission de particules de taille comprise entre 5 et 2000 μm .

L'observation des aérosols inférieurs au micromètre émis a débuté en 1987, un compteur optique de particules (COP) a permis de mesurer des particules inférieures à 0,3 μm lors de l'expiration dans un masque (Fairchild et Stampfer, 1987). Une autre étude a mesuré avec un COP et observé au microscope à transmission, des particules comprises entre 0,4 et 7,6 μm pour la respiration, la parole et l'éternuement (Papineni et Rosenthal, 1997).

En 2009, Xie *et al* ont étudié les particules émises par la parole et la toux pour des sujets de 20 à 40 ans, non-fumeurs. L'analyse des marques laissées sur les surfaces ont révélé des diamètres de particules déposées inférieurs à 75 μm pour 65% des émissions par la parole et 40 % pour la toux. Le diamètre des particules à la sortie de la bouche a été recalculé par les auteurs en prenant en compte l'évaporation des particules déposées (Figure 6).

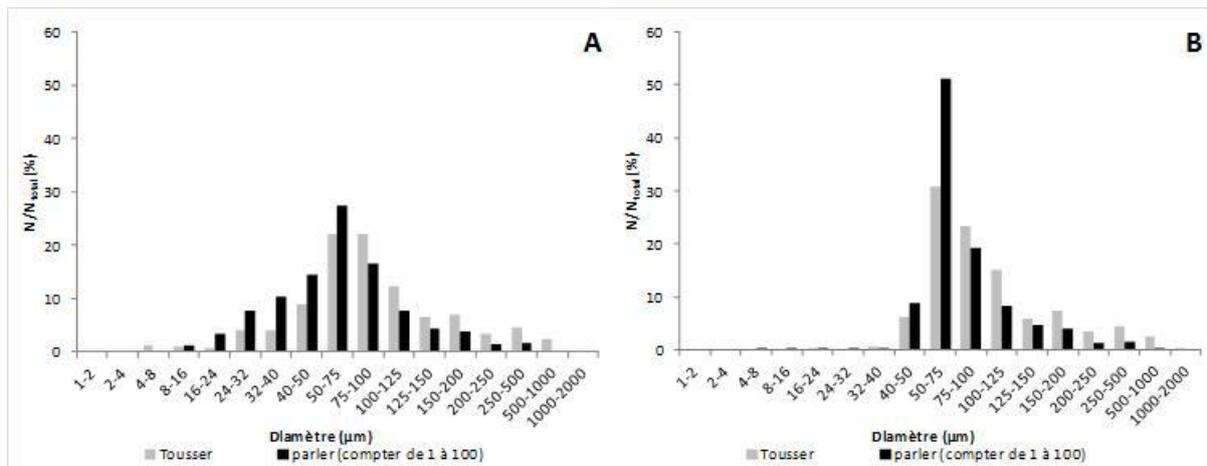


Figure 6 Répartition des particules en fonction du domaine de taille : (A) au niveau de la surface d'échantillonnage pour un essai sans colorant, (B) à la bouche, répartition recalculée à partir d'un modèle d'évaporation, à partir des données de (Xie *et al.*, 2009). N= nombre de particules par classe de taille, Ntotal = nombre de total de particules émises.

II.1.B Les virus dans les émissions oropharyngées

La caractérisation des émissions oropharyngées a mis en évidence le fait que les activités respiratoires génèrent des particules avec des caractéristiques différentes en termes de taille, de nombre et de composition. Néanmoins peu d'études ont cherché à y mettre en évidence la présence de virus, ou à en mesurer l'infectiosité .

En 2008, Huynh *et al* ont étudié par PCR les émissions de 20 volontaires adultes pour la toux, la parole et la respiration. Parmi les sujets, 9 souffraient de symptômes respiratoires et présentaient une contamination virale du mucus nasal. Pour collecter les émissions, les auteurs utilisèrent un masque associé à une surface polarisée (électret). Ils cherchèrent la présence de *Influenza A* et *B*, *paraInfluenza* 1, 2 et 3, du virus respiratoire syncytial (VRS) et du métapneumovirus humain (MPVH). La PCR permit de détecter, pour 6 des 9 malades, le virus dans les particules émises pour au moins une des activités respiratoires observées (Huynh *et al.*, 2008).

En 2009 une équipe analysa les aérosols générés pendant la toux, la parole, et la respiration par RT PCR à la recherche de 9 virus respiratoires. Les aérosols étaient collectés grâce à un masque et une surface polarisée (électret). L'étude portait sur 50 sujets dont 33 présentaient des symptômes au niveau du système respiratoire supérieur et 17 étaient asymptomatiques. Parmi les sujets symptomatiques, 21 étaient positifs à au moins un virus. Au sein des sujets asymptomatiques, 4 étaient positifs à un virus. Au total, rhinovirus fut détecté pour 19 sujets, *Influenza* pour 4 individus, *paraInfluenza* pour 2 personnes, MPVH chez une personne et deux sujets présentaient une double infection. Sur les 25 individus présentant une contamination nasale virale, le même virus fut détecté pendant les activités respiratoires. De plus, dans le cas du rhinovirus, une étude par culture cellulaire a montré que les virus étaient toujours infectieux (Stelzer-Braid *et al.*, 2009).

D'autres travaux ont cherché à quantifier l'émission et à identifier dans quelle gamme de taille des émissions oropharyngées se retrouvaient les virus.

Fabian *et al.* ont détecté et quantifié sur les filtres en téflon équipant un masque oronasal 3 à 20 copies d'ARN *Influenza*/h pour des particules inférieures à 1µm mesurées par un compteur optique (Fabian *et al.*, 2008).

Milton *et al.* ont trouvé que les patients atteints de la grippe émettent en respirant 33 ARN viral/min pour des particules \geq à 5 µm et 187 ARN viral/min pour des particules $<$ à 5 µm (Milton *et al.*, 2013). La collecte a été réalisée avec un système de collecte conique équipé d'un impacteur.

Lindsley *et al.* ont montré lors d'une toux que 81% des patients positifs au virus *Influenza* émettent une quantité de virus en aérosol suffisante pour être détectée. Dans l'aérosol, 65 % de l'ARN viral était associé à des particules $<$ à 4 µm, avec parmi eux des virus infectieux (Lindsley *et al.*, 2010). L'étude a été réalisée avec un système de collecte équipé d'un embout buccal.

II.2 COMPORTEMENT DES PARTICULES EMISES

Les particules et les virus émis hors des voies respiratoires peuvent être distingués selon deux modes granulométriques illustrés, pour un éternuement, par Tang *et al* en 2006 (Figure 7) : les aérosols constitués de particules fines et les grosses particules.



Figure 7 Photographie d'un éternuement humain (modifiée) (Tang *et al.*, 2006)

Les plus fines particules faiblement influencées par la gravité ont tendance à rester en suspension dans l'air et à se disperser sur de longues distances en suivant les flux d'air. A l'inverse, les particules de taille plus importante avec une masse plus élevée sont davantage influencées par la gravité que par les flux d'air. Elles suivent des trajectoires balistiques et se déposent rapidement au sol (Tang *et al.*, 2006).

Ces comportements ont été reproduits par simulation numérique par Xie *et al* en 2007 (Figure 8).

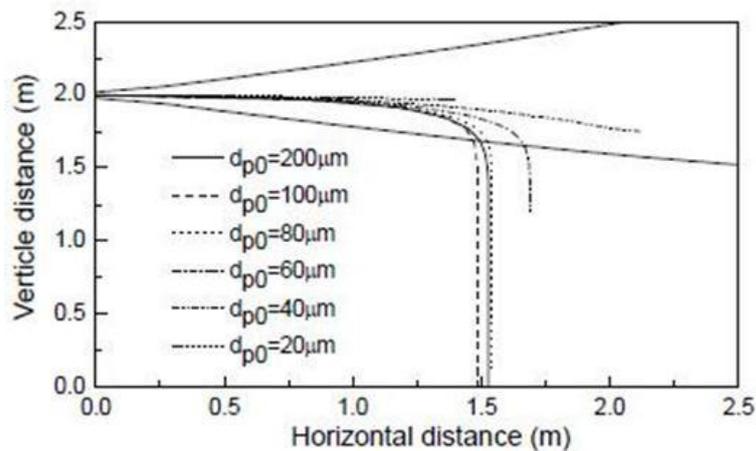


Figure 8 Trajectoire de gouttelettes de différents diamètres dans un jet non isotherme (Xie *et al.*, 2007)

Les auteurs ont obtenu la dispersion des gouttelettes pour plusieurs activités respiratoires, en reprenant les travaux de Well de 1934. Lors des simulations, ils ont considéré les gouttelettes d'eau salée à 9 g/L et simulé des écoulements non isothermes avec des vitesses initiales de 1, 5, 10, 20 et 50 m/s simulant respectivement une respiration normale, la parole, la toux et

l'éternuement. Dans l'exemple (Figure 8), les auteurs ont simulé une toux avec une vitesse initiale de 10 m/s, une ouverture de bouche de 4 cm, une humidité relative ambiante de 50% et une température ambiante de 20°C.

Les résultats de simulation montrent que dans un premier temps, toutes les particules suivent le cône du flux d'air. Puis dans un deuxième temps, les particules influencées par la gravité quittent le flux d'air tandis que les fines gouttelettes suivent le flux d'air pour former des résidus solides en s'asséchant. Des gouttelettes de tailles intermédiaires peuvent quitter le jet mais s'évaporent avant de toucher le sol

Les aérosols sont ensuite principalement influencés par les flux d'air créés dans un environnement clos par la ventilation naturelle ou forcée, les déplacements (personnes, objets,...) et la convection thermique (écarts de température).

Les particules les plus grosses, influencées par la gravité, quittent le flux d'air et se déposent sur les surfaces. Ces particules peuvent néanmoins parcourir des distances supérieures au mètre avant de sédimenter.

II.3 L'ADHESION DES VIRUS AUX SURFACES

II.3.A Aspects théoriques

Les virus portent des charges électriques négatives. Néanmoins, dans un système colloïdal, ils demeurent entièrement neutres à un pH proche de la neutralité (Bitton, 1975). Cette caractéristique du colloïde est expliquée par la théorie de la double couche. La particule virale chargée attire des ions de charge opposée (contre-ions) présents dans la solution. Les contre-ions forment une couche compacte autour du virus appelé la couche de Stern et qui assure en partie la neutralité du colloïde. Une seconde couche dite diffuse, la couche de Gouy, permet de compléter la neutralité (Figure 9).

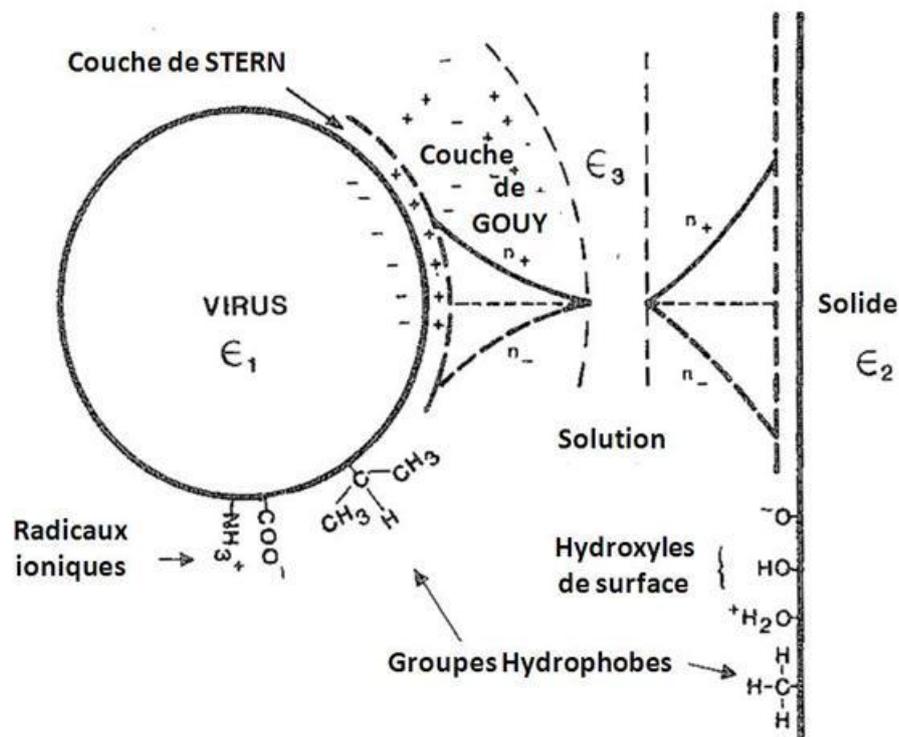


Figure 9 Schéma des couches ioniques entre un virus et une surface (Gerba, 1984)

La taille de cette seconde couche permet de déterminer la force et la distance avec lesquelles les particules se repoussent les unes des autres. Les interactions électrostatiques qui forment la double couche ne sont pas les seules forces électriques mises en jeu dans un système colloïdal. Les forces de van der Waals, créées par les interactions entre dipôles permanents, exercent quant à elles exclusivement une attraction. Ainsi la stabilité d'un colloïde et les interactions entre deux particules virales en solution sont la résultante entre les phénomènes de répulsion de la double couche et les phénomènes d'attraction des forces de van der Waals décrites par la théorie de la DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek).

En 1999, Chattopadhyay et Puls ont proposé que les forces qui conduisent à l'adhésion d'un virus à une surface solide étaient divisibles en 3 groupes : les interactions électrostatiques, les

forces électrodynamiques de Lifshitz-van der Waals et les forces polaires ou les interactions acide-base (Tableau 2). Les forces de van der Waals et les interactions acide-base sont dépendantes de l'hydrophobicité du virus et de la surface. Les calculs thermodynamiques de Chattopadhyay et Puls révèlent un effet de l'hydrophobicité dans les phénomènes d'adhésion. Ainsi l'importance des forces mises en jeu dans l'adsorption va dépendre de la nature du virus, de la surface et de l'environnement (Bitton, 1975; Gerba, 1984).

Tableau 2 Liste des forces impliquées dans l'adsorption des virus sur une surface (Chattopadhyay et Puls, 1999)

Type de Force	Sous classes	Caractéristiques
Van der Waals	Debye	Liaison de faible énergie mais présente en grand nombre
	London	
	Keesom	
Electrostatique	Force de Coulomb	Liaison de forte énergie, interaction à longue distance. Uniquement en présence d'une surface chargée
Polaire/Hydrophobe	Force d'attraction hydrophobe	Uniquement en milieu aqueux. Liaison de forte énergie, interaction à longue distance

II.3.B Facteurs influençant l'adhésion

II.3.B.a La nature du virus

L'adhésion dépend grandement des caractéristiques du virus étudié. Les différences de charges de surfaces ou d'hydrophobicité jouent un rôle important dans l'adsorption du virus sur les supports solides. Les virus sont souvent habillés d'une couche de protéines polypeptidiques composées d'acides aminés portant des acides faibles et des groupements basiques (ex : carboxyle et amine) (Figure 9). Ces groupements ionisables confèrent au virus une charge électrique variable et hétérogène à sa surface en fonction du pH (Jin et Flury, 2002). A un pH caractéristique, défini comme le point isoélectrique (pI), les virus existent dans un état de charge nul. A ce pH, les virus possèdent des charges locales positives ou négatives en fonction de leur composition en acides aminés (Gerba, 1984; Zhuang et Jin, 2003). Des différences de pI ont été observées entre les types de virus mais également entre souches (Gerba *et al.*, 1980).

Les virus enveloppés, tels les virus *Influenza*, possèdent un grand nombre de sites hydrophobes non masqués à leur surface. Cette caractéristique implique la prépondérance des

interactions hydrophobes dans l'adhésion (Gerba 1984). Dans le cas d'un virus non enveloppé la configuration des protéines est telle que leur partie hydrophobe est protégée par les parties hydrophiles qui se lient avec les molécules d'eau (Gerba, 1984).

II.3.B.b La nature de la surface solide

L'adhésion des virus dépend également de la charge du support solide défini par le pI du matériau. En considérant uniquement les facteurs électrostatiques d'adsorption, les surfaces avec des points isoélectriques élevés sont de meilleurs adsorbants de virus.

La capacité des matériaux à générer d'importants potentiels de Van der Waals est l'un des plus importants facteurs d'adhésion. Les surfaces métalliques sont de meilleurs adsorbants que les surfaces organique au regard de leur potentiel de Van der Waals (Gerba, 1984).

II.3.B.c La nature de la solution virale

Dans une solution avec une force ionique élevée, les virus ont tendance à s'adsorber fortement (Gerba, 1984). La propriété colloïdale des virus fait que la présence de cations divalents renforce l'adhésion en réduisant l'épaisseur des couches de Stern et Gouy (Gerba, 1984; Jin et Flury, 2002).

Le pH joue également un rôle dans l'adsorption des virus sur les surfaces. En générale, un pH basique favorise des virus libres et à l'inverse un milieu acide favorise l'adsorption. Ces interactions en fonction du pH sont évidemment liées avec les pI du virus et de la surface (Gerba, 1984).

La présence de matière organique dans la solution virale va également intervenir dans les phénomènes d'adsorption. La matière organique a tendance à entrer en compétition avec les sites d'adsorption virale et de ce fait à réduire l'adsorption des virus (Gerba, 1984).

Ainsi, il existe des variables influençant l'adsorption des virus : le pH, la force ionique de la solution, la présence de composés en compétition pour l'adsorption (matière organique), les propriétés du virus (pI et hydrophobicité) et les propriétés de la surface.

II.4 LES VIRUS SUR LES SURFACES DES ENVIRONNEMENTS INTERIEURS

Lors de l'émergence du nouveau virus *Influenza A H1N1* en 2009, l'Institut National de Science Médicale et de Nutrition de Mexico, a fait part de ses observations. Afin d'identifier la cause de la prolifération des cas de grippe au sein du personnel, et ce, malgré le port de masques et les consignes d'hygiène, les auteurs ont réalisé des contrôles des surfaces par écouvillonnages. Après analyse par PCR, les résultats ont montré la présence du virus sur de nombreuses surfaces (souris d'ordinateur, rampe de lit, canapé...).

Pappas *et al.* ont recherché par PCR la présence d'ARN viral spécifique de 3 virus respiratoires (picornavirus, VRS, et *Influenza A* et B) sur les jouets de salles d'attente pédiatriques. Des prélèvements de surfaces ont été réalisés par écouvillonnage sur divers supports solides ou en tissus pendant les mois d'octobre, janvier et mars. L'analyse montre que l'ARN des trois virus recherchés a été retrouvé sur 20% des jouets échantillonnés (Pappas *et al.*, 2010).

Boone et Gerba en 2005 se sont intéressés aux surfaces à l'intérieur de 8 maisons de particuliers et de 14 garderies pour enfants. Sur les huit maisons investiguées, cinq hébergeaient au moins un enfant présentant les symptômes de la grippe depuis 3 jours ou plus. Les maisons avec les enfants malades ont été échantillonnées en mars tandis que les autres sans enfants ni adultes malades ont été échantillonnées en aout. L'étude des surfaces au sein des maisons a confirmé la variabilité saisonnière. Le virus a été détecté sur les surfaces uniquement dans les maisons avec un enfant malade (Boone et Gerba, 2005). Les mêmes auteurs, ont également analysées par RT-PCR pendant l'automne 2004, 328 fomites de 12 bureaux différents issus de 5 villes des Etats-Unis à la recherche du virus para*Influenza* 1. Les résultats ont montré que 37% des surfaces des bureaux étaient contaminés. Le virus a été fréquemment retrouvé sur 47 % des bureaux, 46% des souris d'ordinateur et 45 % des téléphones analysés (Boone et Gerba, 2010).

Ces résultats étayant la thèse d'une transmission par contact indirect et renforcent l'importance des fomites dans la prolifération du virus (Macias *et al.*, 2009). Ce mode de transmission implique un transfert de l'agent infectieux à un hôte potentiel par l'intermédiaire d'un objet et d'une surface contaminée (fomite) (CDC, 1996; Brankston *et al.*, 2007; CDC, 2007).

II.5 PERSISTANCE DES VIRUS SUR LES SURFACES EN FONCTION DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES

La probabilité pour qu'un agent infectieux soit transmis via des surfaces et entraîne l'infection d'un nouvel hôte dépend uniquement de la conservation de son potentiel infectieux. Le statut de parasite intracellulaire obligatoire du virus implique la décroissance, au cours du temps, de la quantité virale infectieuse sur les surfaces. (Boone et Gerba, 2007).

Les études menées sur la conservation du caractère infectieux de virus déposés sur une surface au cours du temps ont montré une persistance de quelques minutes à plusieurs jours. (Tiwari *et al.*, 2006). Parmi les facteurs déterminants de cette persistance, la présence ou non d'une enveloppe lipidique joue un rôle majeur (Weber et Stilianakis, 2008; Weber et Stilianakis, 2008 B; Vasickova *et al.*, 2010). Les virus non enveloppés présentent une résistance plus importante au séchage et à la dessiccation. Reovirus, un virus non enveloppé est ainsi resté infectieux sur une surface en PVC, après dessiccation dans une matrice organique, pendant 30 jours contre 3 jours pour Sindbis virus (enveloppé) (Howie *et al.*, 2008).

II.5.A Surfaces inanimées

Plusieurs études ont comparé la survie de différents virus sur des surfaces poreuses et non poreuses. Ces travaux ont montré que la plupart des virus survivait plus longtemps sur les surfaces non poreuses (Bean *et al.*, 1982; Abad *et al.*, 1994; Tiwari *et al.*, 2006; Weber et Stilianakis, 2008). Bean *et al.* ont observé que les surfaces non poreuses tel que l'acier inoxydable et le plastique permettaient une persistance du virus *Influenza* pendant 48 à 72 heures. Tandis que le virus persistait entre 8h et 48h sur du tissu et du papier (Bean *et al.*, 1982). Une observation identique a été réalisée pour le virus parainfluenza. Il persistait également plus longtemps sur une surface non poreuse comme de l'acier inoxydable. La persistance était de 10 heures sur les surfaces non poreuses contre 4 heures pour les surfaces poreuses (Brady *et al.*, 1990).

Le type de métal peut également affecter les virus. Une étude réalisée en 2007, a montré que l'inactivation en 24h du virus *Influenza A* était plus importante sur du cuivre que sur de l'acier inoxydable. Les résultats ont montré une inactivation de 75% du virus sur l'acier inoxydable après 24h, contre une inactivation de 99,9% du virus après 6h sur le cuivre à 22°C et 60% d'humidité relative (Noyce *et al.*, 2007).

Le Tableau 3 présente plusieurs travaux de survie de virus respiratoires réalisés sur différentes surfaces.

Les travaux montrent des survies variables allant de quelques minutes à plusieurs jours pour le même virus. Cependant les virus restent capables de persister sur un grand nombre de surfaces.

Tableau 3 Conditions expérimentales et survie de virus respiratoires sur les surfaces à partir des données de (Boone et Gerba, 2007) et complété.

Virus et références	Contamination	Milieu de suspension	T (°C)	HR (%)	Surface	Extraction	Survie max (h)	t₉₀ (h)	t₉₉ (h)
Virus Influenza A (Bean <i>et al.</i> , 1982)	Vd: 100 µL 10 ^{3.5} TCID ₅₀ /100µL	Dulbecco's PBS ^a	27,8-28,3	35-40	Acier inoxydable	Ec	72	30	47
					Magasine, plastique		48	3	10
					Pyjama, mouchoir		24	4	10
Virus Infleunza B (Bean <i>et al.</i> , 1982)	Vd: 100 µL -	Dulbecco's PBS	26,7-28,9	55-56	Acier inoxydable	Ec	72	12	37
					Magasine		24	<1	2
					Mouchoir; tissus		48	<1	<1
Virus Influenza Aviaire (Tiwari <i>et al.</i> , 2006)	Vd: 10 µL 3,1 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /10µL	EMEM ^b avec Earle's salts	T _{amb}	Non spécifié	Acier inoxydable	Elution + Vortex	144	0	48
					Gants latex		144	0	0
					Cotton		144	0	0
					Plume		144	24	48
Coronavirus 229E (Sizun <i>et al.</i> , 2000)	Vd: 10 µL 5,5 x10 ³ TCID ₅₀ /10µL	Dulbecco's PBS	21	55-70	Aluminium	Bain + Sonication	12	5,25	9
					Eponges stériles		12	5,75	7
					Gants Latex		6	4,1	5,75
Coronavirus OC43 (Sizun <i>et al.</i> , 2000)	Vd: 10 µL 5,15 x10 ³ TCID ₅₀ /10µL	Dulbecco's PBS	21	55-70	Aluminium	Bain + Sonication	3	1,5	3
					Eponges stériles		2	1	1
					Gants Latex		2	1	1

Virus et références	Contamination	Milieu de suspension	T (°C)	HR (%)	Surface	Collecte	Survie max (h)	t ₉₀ (h)	t ₉₉ (h)
Parainfluenza virus 2 (Boone et Gerba, 2005)	-	MEM ^c	22	Non spécifié	Acier inoxydable	?	10	3,75	6
					Blouse		6	ND ^e	ND
					Mouchoir papier		2	ND	ND
Respiratory Syncytial Virus (Hall <i>et al.</i> , 1980)	-	MEM mélangé avec des sécrétions nasales	22-25	35-50	Formica	?	8	2,8	3,3
					Formica + sécrétion		8	0,5	2,5
					Gants		5	0,25	0,4
					Vetement		2,5	0,5	0,75
Rhinovirus 14 (Sattar <i>et al.</i> , 1987)	Vd:10 µL 10 ⁵ pfu/10µL	TPB ^d ou sécrétion nasale	22	15-25	45-55	Bain	>25	25	>25
				Acier + TPB			>25	2,5	4
				Acier +TPB			>25	25	>25
				Acier + sécrétion			>25	6	8
				Acier +TPB			>25	25	>25
Acier + sécrétion	>25	4	8						

Virus et références	Contamination	Milieu de suspension	T (°C)	HR (%)	Surface	Collecte	Survie max (h)	t ₉₀ (h)	t ₉₉ (h)
Influenza A PR8 (Boone et Gerba, 2005; Greatorex <i>et al.</i> , 2011)	Vd: 10µl 1,5x10 ⁸ TCID ₅₀ /ml	DMEM + 1% BSA ^f	17-21	23-24	Acier inoxydable		9	ND	ND
					Aluminium		<24h	ND	ND
					Polymère plastique (clavier ordinateur)		<24h	ND	ND
					Verre		<24h	ND	ND
					Bois (chêne)		<24h	ND	ND
					Polymère plastique (plaque de culture)		9h	ND	ND
Influenza A Paris 2009 (Dublineau <i>et al.</i> , 2011)	Vd: 50µL 0,5x10 ^{7.28} TCID ₅₀ /50µL	MEM+10% FCS ^g	4	28	Verre	Elution	>8j	8j	ND
			25	16			>8j	>8j	ND
			35	12			>3j	<3j	ND
Influenza A (Mukherjee <i>et al.</i> , 2012)	Vd: 20µL 5,88x10 ³ TCID ₅₀ /20µL, 4,3x10 ³ TCID ₅₀ /20µL	Echantillon rhinopharyngé+ VTM ^h	Non spécifié	Non spécifié	Tissu (oreiller)	Ec	60min	ND	ND
					Formica		30min	ND	ND
					Vinyl		15min	ND	ND
					Acier inoxydable		5-30 min	ND	ND
					Mouchoir		5-15 min	ND	ND

Virus et références	Contamination	Milieu de suspension	T (°C)	HR (%)	Surface	Collecte	Survie max (h)	t ₉₀ (h)	t ₉₉ (h)
Influenza A PR8 (Noyce <i>et al.</i> , 2007)	20µL	PBS	22	50-60	Acier inoxydable	Bain	>24h	>24h	ND
	5x10 ⁴ particules/20µL				Cuivre		>60 min	>60 min	<24h
Rhinovirus 2 (Reed, 1975)	2-5 µL 4-5x10 ⁴ pfu	PBS+milieu	Non spécifié	Non spécifié	Acier inoxydable	Ec	>24h	24h	ND
	2-5 µL 5,5-15x10 ² pfu				Polymère plastique (table)		>24h	>24h	ND

^a PBS, phosphate buffer solution - ^b EMEM, Eagle's minimal essential medium - ^c MEM, minimal essential medium - ^d TPB, tryptose phosphate broth - ^e ND, non déterminé - ^f BSA, bovin serum albumin - ^g FCS, fetal calf serum - ^h VTM, virus transport medium

t₉₀, temps pour avoir 90% de perte

t₉₉, temps pour avoir 99% de perte

Ec, Ecouvillonnage - Vd, Volume déposé

II.5.B L'humidité relative et température

Les études sur l'influence de l'humidité sur l'infectiosité des virus à la surface de matériaux ont montré le rôle majeur de l'enveloppe virale. Ainsi, il est avéré que la conservation de l'infectiosité des virus enveloppés est meilleure dès lors que l'humidité relative est inférieure à 50%. A l'inverse les virus nus sont capables de persister plus longtemps pour des humidités relatives supérieures à 80%.

Ainsi en 1962 Buckland et Tyrrell ont étudié la conservation de l'infectiosité de 19 virus dont 4 virus enveloppés déposés sur du verre à 20°C. Dans le cas du virus Influenza après 2h30 de contact une perte de 1,7 log a été observée pour une humidité relative de 20% contre 3,5 log à 84% (Buckland et Tyrrell, 1962).

Ce phénomène a également été observé en 1975 par Mahl et Sadler sur du verre avec herpex simplex virus (enveloppé) avec une persistance de l'infectiosité de 8 semaines pour une exposition à une humidité relative de 7 % quand l'inactivation était constatée après 1 jour d'exposition à 96% d'humidité relative (25°C) (Figure 10- A). Pour autant, certaines entités virales se distinguent, à l'instar de Vaccinia virus, un virus enveloppé, dont l'infectiosité a perduré jusqu'à 5 semaines quelles que soient les conditions d'humidité relative de 7% ou de 96% (25°C) (Figure 10- B).

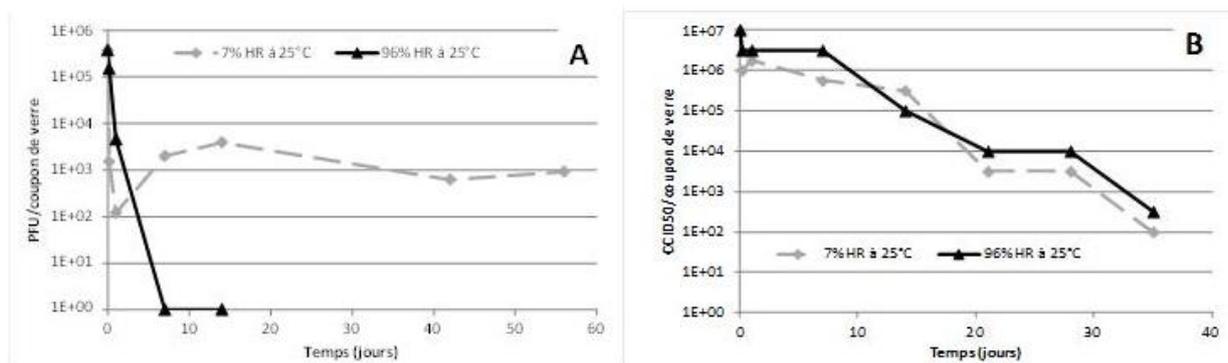


Figure 10 Survie de *Herpes simplex virus* (A) et de *Vaccinia virus* (B) sur une lame de verre en fonction de l'humidité relative à 25°C - à partir des données de (Mahl et Sadler, 1975)

Il semble également exister parmi les virus non enveloppés des différences de résistance. Ainsi *adénovirus* a conservé son potentiel infectieux 8 semaines à 96% quand *Coxsackie virus* et *Poliovirus2* ne sont restés infectieux que pendant 2 semaines (Mahl et Sadler, 1975).

Un autre comportement des virus face à l'humidité a également été observé: une persistance de l'infectiosité dite en « V ». Ce comportement a été rapporté par Casanova et son équipe lors de travaux sur deux simulants des virus responsables du *severe acute respiratory syndrome* (SRAS) : le *transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) et le *mouse hepatitis virus* (MHV). Si ces virus enveloppés exposés à une humidité relative de 20% (20°C) étaient inactivés moins rapidement et persistaient plus longtemps, les auteurs ont également remarqué que l'inactivation la plus rapide était observée à 50% d'humidité et non à 80% (20°C) (Figure 11) (Casanova *et al.*, 2010).

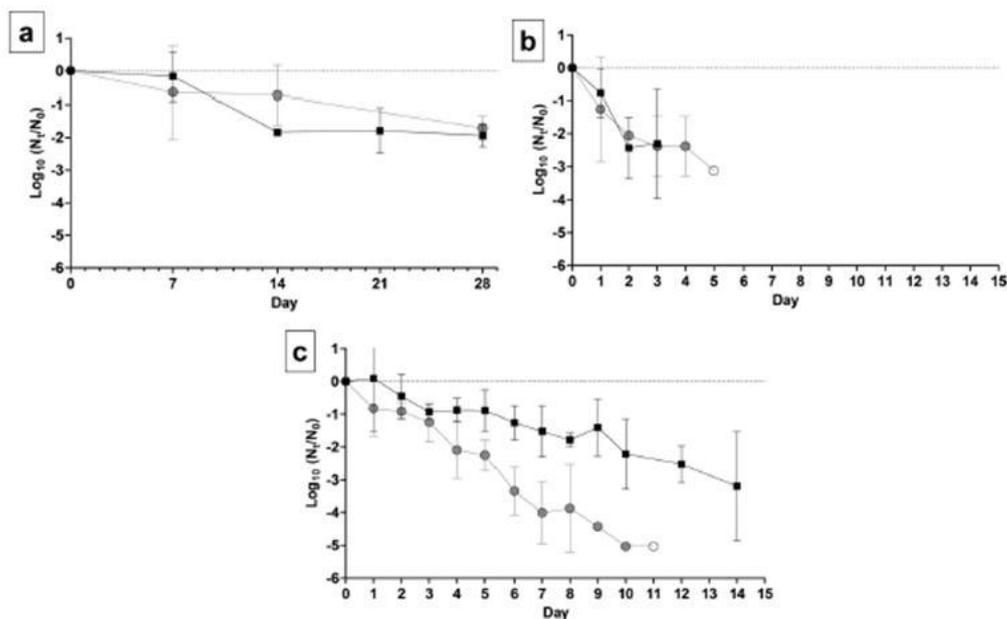


Figure 11 Survie des virus (■) TGEV et (○) MHV sur de l'acier inoxydable à 20°C et à différentes humidités relatives (a) 20%, (b) 50%, (c) 80% (Casanova *et al.*, 2010).

L'équipe de Casanova a également travaillé sur l'influence de la température sur les virus TGEV et MHV. Ils ont observé des résultats similaires aux études en aérosols ; les virus déposés sur une surface en acier inoxydable sont plus stables pour des températures basses (Figure 12) (Casanova *et al.*, 2010). Les températures basses préservent l'infectiosité des virus (Abad *et al.*, 1994).

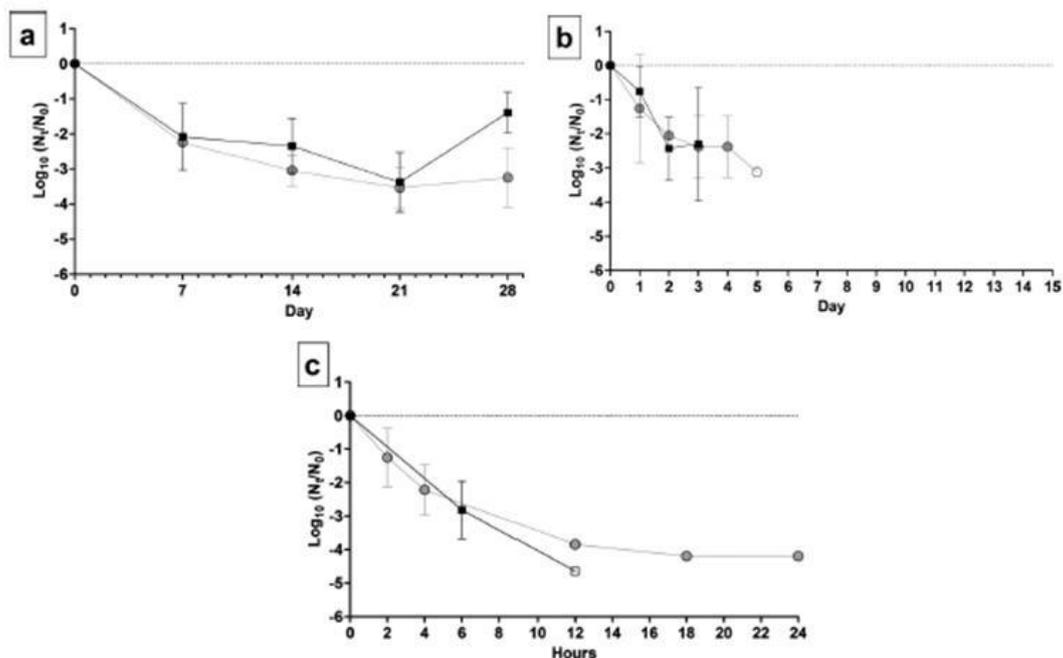


Figure 12 Survie des virus (■) TGEV et (○) MHV sur de l'acier inoxydable à 50 % d'humidité relative à différentes températures (a) 4°C, (b) 20°C, (c) 40°C (Casanova *et al.*, 2010).

II.5.C Rayonnements UV

C'est en 1941, que l'effet virucide des rayonnements UV a été observé sur le virus Influenza A, l'agent ayant conservé son pouvoir infectieux plus longtemps à l'obscurité qu'à la lumière du jour près d'une fenêtre (Edward, 1941). Toutefois, cet effet varie selon le type d'acide nucléique, les virus simple brin d'ARN ou d'ADN apparaissant plus sensibles aux rayonnements UV (Figure 13).

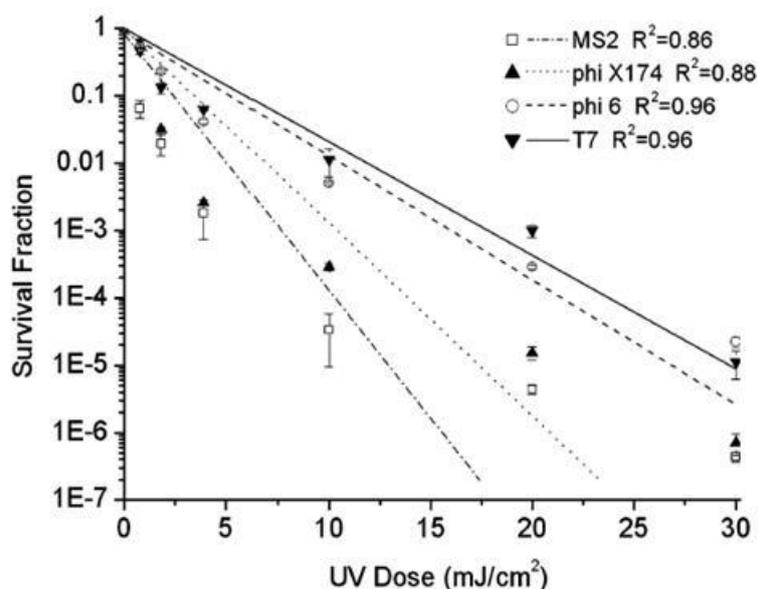


Figure 13 Comparaison de la survie de plusieurs virus sur une surface en fonction de la dose de rayonnement UV-C à 55% HR et 25-28°C. Virus à ADN simple (Phi X174), ADN double brin (T7) et virus à ARN simple (MS2) et ARN double brin (Phi 6) (Tseng et Li, 2007)

A contrario, les virus à doubles brins semblent moins affectés. Gerba *et al.*, 2002 et Tseng et Li, 2007 expliquent cette résistance par le fait que la détérioration se fait généralement sur un seul brin. Ainsi, le brin non endommagé sert ensuite d'image pour la réparation par les enzymes de la cellule hôte.

Lors de l'étude de Tseng et Li, la sensibilité des virus aux rayonnements pouvait être atténuée par une humidité relative élevée. L'eau adsorbée à la surface des virus conférerait d'après les auteurs une protection contre les UV-C (Tseng et Li, 2007).

II.5.D Polluant gazeux

L'efficacité de l'ozone comme germicide est bien documentée, pour des concentrations de l'ordre de 1000 ppm. Cependant peu d'études traitent de l'effet de l'ozone sur des virus fixés à la surface de matériaux à des concentrations plus faibles.

En 2007, Hudson *et al.* ont exposé durant 20 minutes à 20-25 ppm d'ozone *Felin Calicivirus*, déposé sur différentes surfaces (table, tapis, mur...). A l'issue de cette exposition les auteurs ont constaté que l'ARN viral ne pouvait plus être amplifié par PCR, soupçonnant ainsi une dégradation du génome viral (Hudson *et al.*, 2007).

En 2009, Tanaka *et al.* ont étudié l'efficacité de l'ozone sur des fomites. Ils ont montré que l'ozone à 20 ppm après 2,5 heures de contact causait une perte de 99,999% d'infectiosité sur le virus Influenza asséché sur du plastique et du verre (Tanaka *et al.*, 2009).

Tseng et Li ont quant à eux observé que l'efficacité de l'ozone sur les virus à la surface de matériaux était majorée par une humidité relative élevée (Tseng et Li, 2008).

II.5.E Supports de contamination : transfert par les mains

Les virus respiratoires enveloppés tel que *paraInfluenza* virus et *Influenza* virus ont une très faible survie sur les mains (Weber et Stilianakis, 2008). Une persistance de l'ordre de 5 min a été observée par Bean et al en 1982 après un transfert du virus *Influenza* d'une surface vers les mains (Bean *et al.*, 1982).

Dans le cas d'un dépôt direct de virus sur la peau, la perte d'infectiosité a été observée dans les dix premières minutes de contact. La perte d'infectiosité du virus *paraInfluenza* 3 était de plus de 90% après 10 min et de 99% après 1 heure (Ansari *et al.*, 1991).

La faible persistance sur les mains des virus respiratoires peut sembler un obstacle à la transmission. Cependant, un contact répété avec les surfaces contaminées permet d'y renouveler constamment la charge de virus susceptible d'être mise en contact avec les muqueuses du nez et des yeux à une fréquence maximale de l'ordre de 0,4 fois par heure (Weber et Stilianakis, 2008). Les contacts répétés avec les surfaces contaminées et les muqueuses accentuent les risques de transmission par contact.

La transmission d'un virus via un objet a été étudiée entre autres par Pancic *et al.* en 1980. Les auteurs ont ainsi considéré deux types de transfert :

- le transfert du rhinovirus de mains contaminées « donneuses » vers une surface (poignées de porte, robinets) puis du fomite vers de nouvelles mains « receveuses »
- Le transfert direct des mains « donneuses » vers les mains « receveuses ».

Les résultats sont présentés par la Figure 14 et la Figure 15.

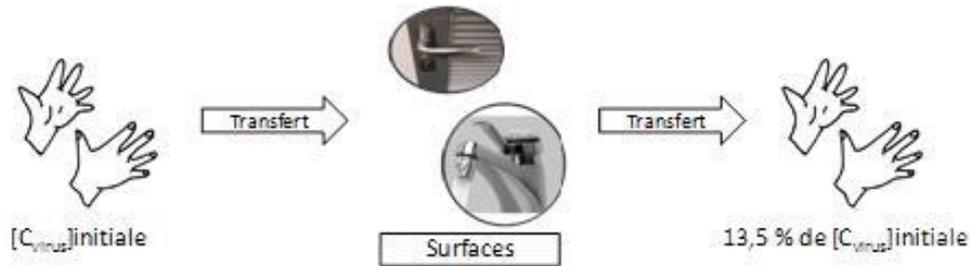


Figure 14 Transfert par contact indirect. A partir des données de (Pancic *et al.*, 1980)

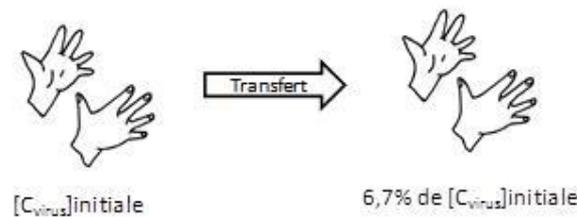


Figure 15 Transfert par contact direct. A partir des données de (Pancic *et al.*, 1980)

Les auteurs ont ainsi constaté que le passage du virus par un fomite conduisait à une contamination des mains « receveuses » deux fois supérieure à celle obtenue par contact cutané direct.

Rheinbaben *et al.*, quant à eux, ont étudié le nombre de personnes infectées à partir d'un fomite, en l'occurrence une poignée de porte contaminée avec un bactériophage, selon que la transmission était horizontale (nombre de personnes se contaminant à partir d'un contact direct avec un unique fomite) ou verticale (nombre de personnes infectées successivement à partir d'un seul individu en contact avec un fomite).

Ainsi il est apparu qu'avec 14 personnes contaminées contre 6, la transmission horizontale était la plus critique.

Une étude récente utilisant également des bactériophages (MS2, ϕ X174 et fr) a montré qu'un simple contact entre les doigts et une surface en verre permettait le transfert de 23% des virus présents initialement sur l'une des surfaces (Julian *et al.*, 2010).

DEMARCHE

Les virus sont des entités qui nécessitent la présence d'un hôte pour se multiplier. Ils sont capables d'infecter toutes les formes de vie. Il en existe un grand nombre mais ils possèdent tous une structure autour de leur génome. Le virus Influenza responsable de la grippe est un virus enveloppé avec un génome à ARN. Il utilise les cellules épithéliales des voies respiratoires en détournant la machinerie cellulaire afin de se multiplier et de répliquer son génome.

La propagation de ce virus qui entraîne des épidémies de grippe présente un enjeu de santé publique au vu du nombre d'individus contaminés et de décès chaque année mais aussi un enjeu économique vis-à-vis des pertes financières directes (consultation, hospitalisation et traitement) et indirectes (absentéismes et pertes de productivité). Les épidémies sont dites « explosives » car le cycle d'incubation du virus est court, l'infection entraîne entre autre une inflammation des voies respiratoires qui favorise la dispersion des virus hors de l'organisme via les activités respiratoires. Le virus est ainsi transmis facilement d'une personne à une autre, transmission qui est accentuée par la proximité et le confinement des individus.

Il existe peu de traitements pour lutter contre la grippe. Aujourd'hui deux familles d'antiviraux sont utilisées contre l'infection d'un virus Influenza. Cependant leur efficacité dépend du type de virus, mais aussi de la capacité du virus à développer une résistance. Afin de réduire l'utilisation des antiviraux, le recours aux vaccins permet de limiter l'apparition et la propagation du virus. Néanmoins, les mutations régulières des virus entraînent l'apparition de nouveaux virus Influenza diminuant ainsi l'efficacité de la vaccination. Ces mutations constantes imposent de produire régulièrement de nouveaux vaccins afin de « tenir à jour » le système immunitaire.

Au vu des difficultés à traiter les infections grippales et à protéger les populations à l'aide de vaccins, il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur la transmission du virus dans les environnements que nous fréquentons. Les environnements intérieurs tels que la maison, les transports et le bureau favorisent la transmission du virus de par leur confinement et la proximité des occupants.

Les activités respiratoires humaines (la toux, l'éternuement, la parole et la respiration) sont à l'origine de l'émission de gouttelettes dans un domaine de taille étendue (<1 μm à 2000 μm). Certaines activités respiratoires émettent un grand nombre de particules telles que la toux et l'éternuement. Dans le cas d'un individu malade, celui-ci va excréter des virus au niveau de ses voies respiratoires hautes qui vont être véhiculés par ces gouttelettes.

Les gouttelettes contaminées vont alors en fonction de leur taille initiale et de leur évaporation soit se retrouver dans l'air sous forme d'aérosols ou bien se déposer sur les surfaces environnantes. Les surfaces vont être contaminées par des virus, nous parlons alors de « fomites ».

Les virus déposés sur ces surfaces vont plus ou moins adhérer en fonction des forces qui entrent « en jeu » et qui sont liées à la nature du virus, de la surface et du liquide contenant le virus.

La présence des virus sur les surfaces d'environnements intérieurs en périodes épidémiques a été démontrée par plusieurs études épidémiologiques. Un grand nombre de surfaces échantillonnées présentent une contamination virale en présence d'individus malades. Cependant, ces études ne précisent pas le caractère infectieux des virus retrouvés sur ces surfaces. Seules des études en laboratoire ont étudié le pouvoir infectieux de ces virus.

Les travaux montrent que les virus et notamment ceux de la grippe sont capables de conserver leur pouvoir infectieux de quelques minutes à plusieurs jours. Cependant certains paramètres de l'environnement: le type de surfaces, l'humidité relative, la température, les rayonnements ou bien des polluants chimiques peuvent réduire ou accroître le temps pendant lequel le virus reste infectieux. Toutefois la majeure partie des travaux en laboratoires étudient les virus déposés dans du milieu de culture avec des dépôts dont la taille, le volume et la concentration virale sont peu représentatifs d'une contamination réelle. Pourtant, pour appréhender la survie des virus sur les surfaces, il est nécessaire de s'approcher au plus près de la réalité.

Dans ce contexte, ce travail de recherche vise à étudier le rôle des fomites en tant que vecteur de la contamination virale. La littérature a permis d'identifier des paramètres caractérisant la contamination d'un support : La matrice d'émission dans laquelle se trouve le virus, la charge virale, l'état d'hydratation de la particule contenant les virus, les conditions environnementales et le matériau contaminé.

Ainsi, la démarche proposée cherche à reproduire en laboratoire une contamination de surface en simulant une contamination oropharyngée en terme de composition, de charge virale et d'état d'hydratation des particules (Figure 16).

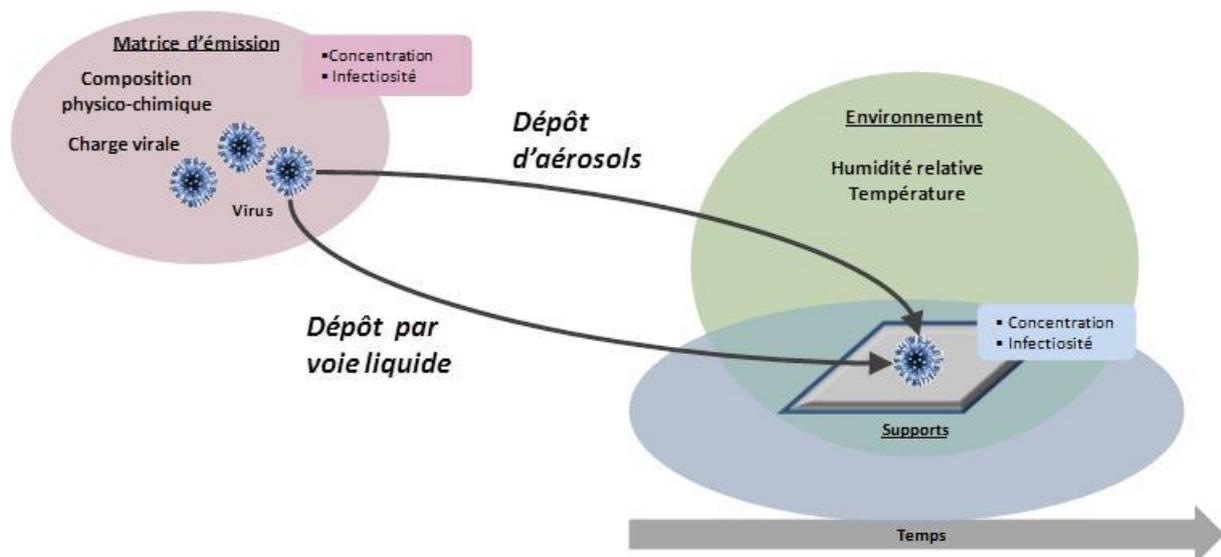


Figure 16 Représentation schématique de la démarche expérimentale

Le choix de la souche virale a été guidé par la volonté de travailler avec une souche représentative d'un risque infectieux. Le virus de la grippe ou virus Influenza affecte plusieurs millions de personnes par an à travers le monde, avec une mortalité élevée jusqu'à 500 000 décès. Ainsi dans un premier temps, une suspension de virus Influenza A a été élaborée dans un substitut salivaire. La composition des substituts salivaires est ce qui se rapproche le plus

de la composition de la salive naturelle (Gal *et al.*, 2001). La charge virale de la suspension salivaire a été calibrée de façon à reproduire la charge virale présente dans les sécrétions nasales des individus malades. Pour s'assurer de la bonne reproductibilité des essais, la maîtrise du matériel biologique est nécessaire. Un pool viral a donc été constitué et dédié à l'ensemble des manipulations de contamination.

Dans un second temps, des outils expérimentaux ont été développés de manière à simuler les émissions particulières oropharyngées.

- Une contamination par voie liquide : des gouttelettes de suspension virale ont été mises en contact avec les surfaces à contaminer pour reproduire une contamination par des gouttelettes qui suivent une trajectoire balistique. Il s'agit d'une méthode classiquement employée dans la littérature pour les essais de contamination.
- Une contamination aérienne : un aérosol viral asséché a été déposé sur les supports, afin de simuler un aérosol oropharyngé. Pour cela, une génération par voie humide a été employée. A ce jour, il n'existe dans la littérature aucun dispositif ayant pour but la contamination contrôlée des surfaces par un aérosol viral.

Les conditions environnementales d'essais ont été fixées par le taux de température et d'humidité dit "optimal de confort" par l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur et le choix des matériaux à contaminer a été guidé par leurs usages au sein des environnements intérieurs.

Enfin pour notre étude, la caractérisation de la flore virale totale a été obtenue avec une approche moléculaire par *quantitative Polymerase Chain Reaction* et la survie du virus sur les matériaux a été déterminée avec une technique culturale en *Viral Plaque Assay*.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre nous décrivons les conditions et outils mis en œuvre pour réaliser des contaminations de surfaces. Dans une première partie sont détaillés les supports étudiés, le matériel biologique, les dispositifs et les procédures de contamination de surfaces. Dans une seconde partie sont présentés les procédures et les outils de quantification du virus nécessaire pour l'étude.

I CONTAMINATION EXPERIMENTALE DES SUPPORTS

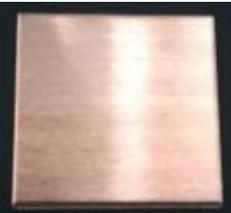
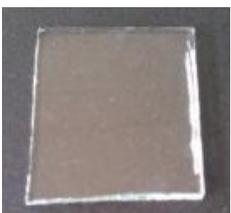
I.1 CHOIX ET PREPARATION DES MATERIAUX

I.1.A Présentation des matériaux

Les matériaux utilisés sont représentatifs de support pouvant être une source de contamination dans les environnements intérieurs ou pouvant être utilisés dans un équipement de protection individuelle. Les supports sont également sélectionnés pour des propriétés de surfaces différentes (métallique, poreux, fibreux).

Les surfaces sélectionnées sont présentées dans le Tableau 4 ci-dessous:

Tableau 4 Matériaux utilisés

	Matériaux	Application	Fournisseur
	Acier inoxydable A 304	Ustensiles alimentaires, articles de bureau, poignée de porte	GoodFellow
	Cuivre	Poignée de porte	GoodFellow
	Verre	Plans de travail, ustensiles alimentaires	Knitell Glass

	PVC blanc	Articles de bureau, jouets, ustensiles chirurgicaux	Leroy Merlin
	Linoléum	Revêtement de sol	échantillon CSTB
	Papier	Masques chirurgicaux	Justinesy

I.1.B Conditionnement des matériaux avant et après contamination

Chaque matériaux n'est utilisé qu'une seule fois, il est découpé sous forme de coupon de 2×2 cm. Les surfaces sont nettoyées à l'éthanol (à l'exclusion du matériau fibreux) et décontaminées dans une chambre (Friocell, Bioblock scientific) par exposition aux UV-C (254 nm) à 600 mW/cm^2 pendant 1 heure. Après décontamination, les matériaux sont stockés dans des flacons stériles hermétiques.

Après contamination, les matériaux sont placés dans une ambiance contrôlée en humidité et température. Le taux d'humidité est ajusté par l'ajout d'une solution de Nitrate de Magnésium dans le fond de dessiccateurs étanches. L'humidité relative des essais est fixée à $\approx 50\%$ et 21°C (température régulée du laboratoire).

I.2 PRODUCTION ET MAITRISE DU MATERIEL BIOLOGIQUE

I.2.A Choix du modèle viral et de la lignée cellulaire

Le modèle viral utilisé possède une enveloppe lipidique, une caractéristique structurale régulièrement retrouvée chez la plupart des virus respiratoires comme les coronavirus, le virus respiratoire syncytial (VRS), les virus *paraInfluenza* et virus *Influenza*.

La souche utilisée est une souche *Influenza A/PR/8/34* (VR-1469, ATCC). La multiplication du virus et la caractérisation de son pouvoir infectieux a nécessité la mise en place au laboratoire d'une lignée cellulaire Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) (CCL-34, ATCC) (Figure 17). Ces cellules de rein de chien sont en lignée établie. En théorie, leur subculture est possible de manière infinie. Ces cellules sont sensibles à l'infection des virus *Influenza*. Ils provoquent un Effet CytoPathogène (ECP).

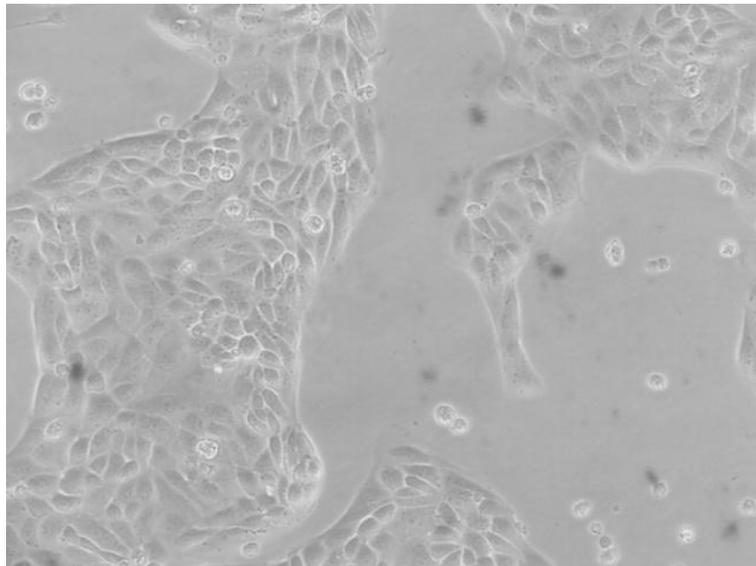


Figure 17 Observation au microscope à platine inversée grossissement $\times 200$ d'un tapis de cellules MDCK en croissance.

I.2.B Préparation de la suspension virale

La multiplication du virus se fait sur un tapis continu (cellules jointives) de cellules MDCK, cultivées en milieu Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) modifié, contenant 2 mM de L-glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium et 1500 mg/L de bicarbonate de sodium (30-2003, ATCC) complété à 10% de sérum de veau fœtal (FBS) inactivé par chauffe à 56°C pendant 30 minutes (F2442, Sigma). Les flacons sont débarrassés de leur milieu de culture et lavés avec du tampon PBS. Les cellules sont ensuite directement infectées à la MOI (*Multiplicity of Infection*) de 10^{-3} avec :

$$\text{MOI} = \frac{\text{Nb de virus infectieux}}{\text{Nb de cellules}}$$

et incubées pendant 30 minutes à 35°C à 5% de CO₂. Puis les flasques sont complétées avec du milieu de culture *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12* (DMEM F12) (D8437, Sigma) implémenté avec du sérum d'albumine bovine à 35% et de la trypsine-TPCK à 1 µg/mL (T8802, Sigma). Après 48h d'incubation à 35°C et 5% de CO₂ (Etuve BINDER), les cellules et les débris cellulaires du surnageant sont éliminés par centrifugation (10,000 g, 60 min, 4°C). Les virus dans le surnageant sont recueillis sur une membrane (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-100 membrane*) après filtration et centrifugation (5,000 g, 25 min, 4°C).

Les virus sont mis en suspension dans une solution dont la composition en sels est celle d'un substitut salivaire et réalisée avec de l'eau ultra-pure (Tableau 5), puis répartis en tubes de 5 mL et conservé à -80°C. Un aliquote du pool est utilisé pour chaque expérimentation et est titré par *Viral Plaque Assay* (VPA) et *Real-time Polymerase Chain Reaction* (Q-PCR) (méthodologies décrites en II.2 et II.3).

Le pool viral ainsi constitué possède un titre de $(6\pm 1)\times 10^6$ virus infectieux/mL et $(3\pm 1)\times 10^9$ unités génomiques/mL. Les incertitudes représentent l'évolution au cours du temps de la concentration du pool.

Le pourcentage de virus infectieux sur les virus totaux est de 0,2%. Ce taux n'est pas inhabituel dans la multiplication de virus Influenza car lié au processus d'assemblage et de bourgeonnement des virions néoformés qui entraîne la formation de virions non infectieux (Wei *et al.*, 2007).

Tableau 5 Composition commerciale modifiée d'un substitut salivaire constitué à partir des données de (Meyer-Lueckel et Kielbassa, 2002)

Sels	g/ 50 mL
Potassium chloride	0,0012
Sodium chloride	0,0422
Magnesium chloride (6H ₂ O)	0,0026
Calcium chloride (2H ₂ O)	0,0073
Potassium monohydrogen phosphate	0,0171

I.3 MONTAGE D'AEROBIOCONTAMINATION

La mise au point d'un dispositif d'aérobiocontamination est nécessaire pour réaliser les contaminations aériennes reproductible avec un aérosol viral asséché.

I.3.A L'environnement d'essai

La génération d'un aérosol contenant du virus influenza est réalisée dans une enceinte confinée de type P3 (Figure 18).

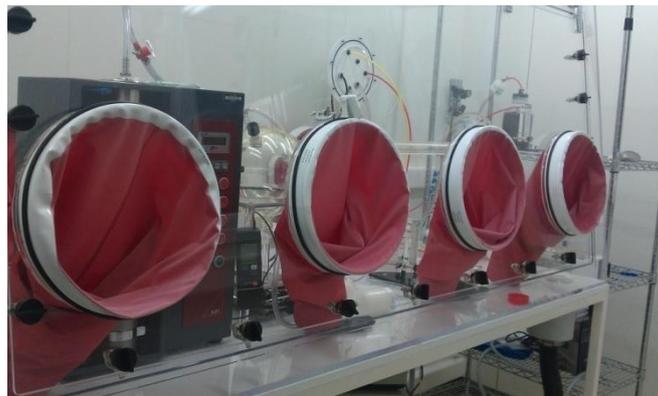


Figure 18 Photographie de l'isolateur

Une dépression de -60 Pa et un renouvellement d'air de 20 volumes/heure est assuré par un coffret de ventilation.

La préfiltration de l'air est assurée par des filtres type G4 (efficacité 90 % gravimétrique) et la filtration par des filtres absolus type BAG (efficacité 99,99% pour des particules diamètre > 0,3 μm). La filtration est doublée en sortie. Une alarme indique les défauts de débit et de pression. Le dispositif de confinement possède un sas d'entrée et une sortie pour les déchets.

Les manipulations se font à travers 7 gants (4 gants en face avant et 3 en face arrière) montés sur des manchettes souples. Une platine de passage de fluides permet entre autres le raccord du montage expérimental à l'air comprimé et l'eau. La façade avant de l'isolateur peut s'ouvrir après décontamination pour permettre l'introduction d'équipements volumineux. L'étanchéité de la face avant est assurée par des loquets de compression (Figure 18).

La décontamination de l'isolateur est assurée par fumigation à l'aide d'un générateur de vapeur (LOGI-STE-1SR, Gilles Mercey Ingénierie) qui assure la décontamination des surfaces. La solution utilisée est un mélange dilué et prêt à l'emploi constitué de peroxyde d'hydrogène, d'acide acétique et péracétique, le Soproper. Un cycle dure 135 minutes (45 minutes de vaporisation et 90 minutes de ventilation). Les surfaces de l'isolateur sont également nettoyées par pulvérisation d'un décontaminant (Amphospray 41, ANIOS).

I.3.B Schéma et principe de fonctionnement

Le dispositif expérimental de contamination des surfaces par un aérosol de virus est présenté par la Figure 19.

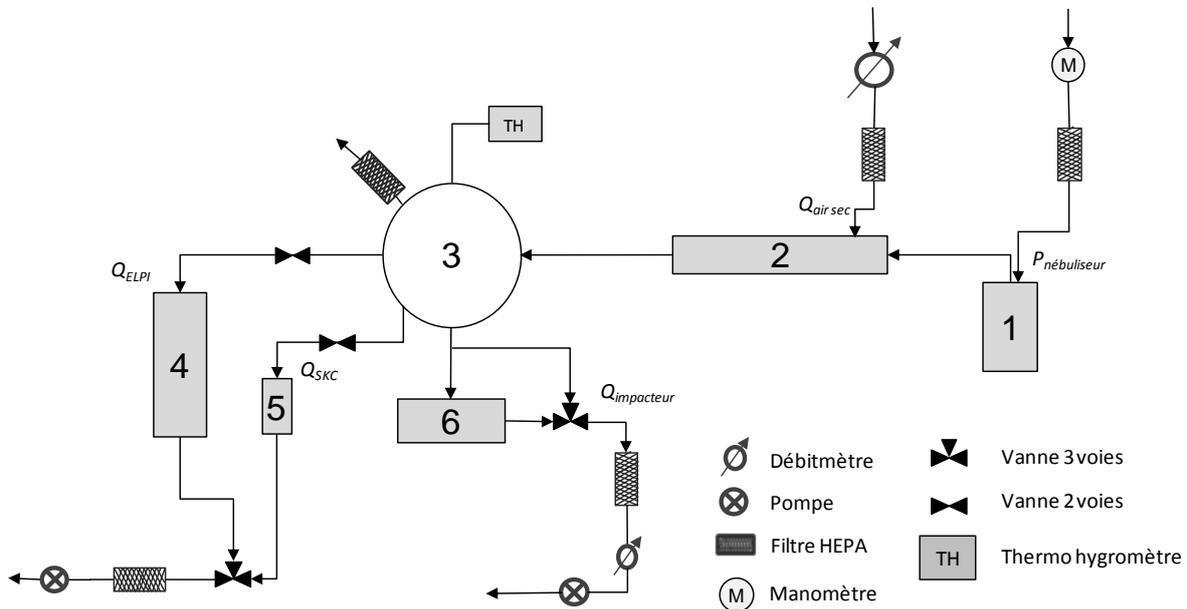


Figure 19 Représentation schématique du dispositif expérimental (1) Nébuleuseur Collison, (2) Colonne de séchage, (3) Chambre d'homogénéisation, (4) Electrical Low Pressure Impactor (ELPI), (5) Bio-collecteur SKC, (6) Impacteur Andersen

Il est composé d'une chaîne de production de l'aérosol, d'un volume de conditionnement avec une hygrométrie et température contrôlées, associé à une métrologie spécifique permettant de caractériser la taille, la concentration.

L'aérosol viral est produit avec un nébuleuseur (Colison, BGI Inc) (1) à une pression de $P_{nébuleuseur} = 1$ bar soit $Q_{nébuleuseur} = 7,9$ L/min. L'aérosol généré est asséché et dilué avec un apport d'air sec filtré de $Q_{air\ sec} = 20$ L/min. L'aérosol viral est acheminé vers un volume d'homogénéisation de 2 litres (3). Un impacteur basse pression (ELPI, Dekati Ltd.) (4) prélève les aérosols à un débit de $Q_{ELPI} = 10$ L/min. Un biocollecteur SKC (5) est utilisé à un débit de $Q_{skc} = 12,5$ L/min pour échantillonner l'aérosol viral. Un impacteur Andersen mono-étage (Andersen Instrument Inc) (6) est utilisé à débit de $Q_{impacteur} = 28,3$ L/min pour contaminer de façon reproductible des coupons de matériaux. Le contrôle de la température dans le banc expérimental est assuré par une circulation d'eau thermostatée (Bain thermostaté M3 et un groupe froid DLK10 LAUDA) dans la double enveloppe de la colonne de séchage et de la chambre d'homogénéisation.

L'humidité relative est assurée par le mélange d'air sec de la colonne et d'air humide du générateur. La température et l'humidité relative sont mesurées par un thermo-hygromètre (TESTO 625, Testo). La température se stabilise à $20 \pm 0,5$ °C en une dizaine de minutes et l'humidité relative s'équilibre à 31 ± 5 % en 2 minutes de production.

I.3.C Chaîne de production de l'aérosol viral

La chaîne de production est constituée d'un nébuliseur et d'une colonne de séchage.

L'aérosol viral est produit avec un nébuliseur brise jet à 3 buses (Collison, BGI Inc) (1) à une pression relative de $P_{nébuliseur} = 1$ bar soit un débit de 7,9 L/min avec un réservoir de 5 mL (Figure 20). La consommation en suspension virale à une pression de 1 bar est de 4,8 mL/h.



Figure 20 Photographie d'un nébuliseur Collinson (www.bgiusa.com)

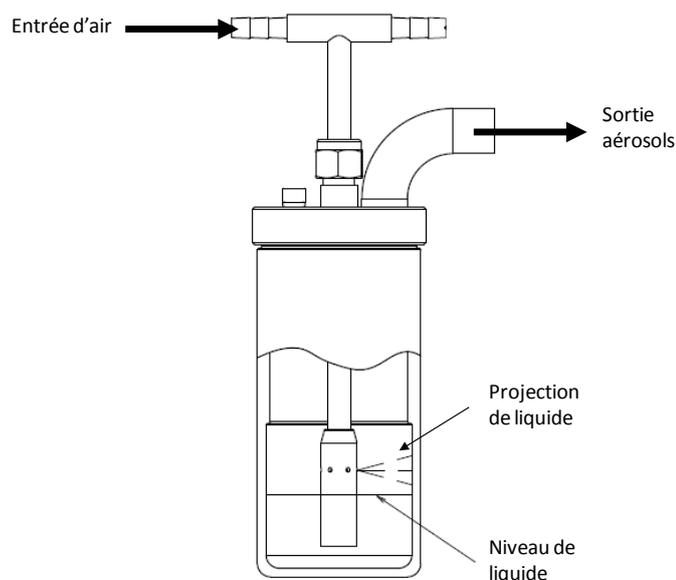


Figure 21 Schéma du nébuliseur Collison

Le principe de fonctionnement de cet atomiseur est basé sur l'effet trompe. La pression d'air comprimé fait remonter le liquide du réservoir vers la tête. L'effet d'entraînement du jet d'air aspire un filet de liquide qui est dispersé sur la paroi du flacon (Figure 21). La plupart des grosses gouttelettes formées retombent et sont entraînées dans le flux de liquide alors que les plus fines remontent et sortent, formant l'aérosol humide. Le nébuliseur Collison produit un aérosol polydispersé dont le diamètre médian en masse est de 2 μm .

L'aérosol produit est dilué et asséché par un apport d'air sec à 20 L/min dans une colonne de 90 cm de long. Le débit du générateur et l'air sec donnent une vitesse d'air de 1,4 m/s. Le temps de séjour est estimé à 0,6 seconde dans la colonne.

I.3.D Mesure de l'aérosol

La caractérisation de l'aérosol a été réalisée avec deux types de dispositifs. Un impacteur liquide qui va permettre de déterminer la concentration du virus en aérosols ainsi que son infectiosité après collecte sur 5 mn, et un impacteur ELPI qui va permettre par une mesure dynamique de déterminer la granulométrie de l'aérosol produit.

I.3.D.a Impacteur en milieu liquide

Un impacteur liquide (SKC, Biosampler[®]) (Figure 22) a été utilisé pour les prélèvements de l'aérosol en milieu liquide. Le SKC est un bio-collecteur qui fonctionne avec un système déprimogène. Les 3 buses positionnées tangentiellement permettent de faire passer un débit d'air de 12,5 L/min (Figure 23). L'écoulement d'air au travers des buses crée un vortex avec le liquide d'impaction. Le mouvement de rotation permet de collecter en douceur les aérosols. De plus la rotation du liquide limite le rebond et forme peu de bulles ce qui limite la ré-aérosolisation. Le liquide de recueil de l'échantillon est constitué par 20 mL de milieu DMEM F12 complété avec du sérum d'albumine bovine à 35%.



Figure 22 Photographie d'un Impacteur liquide SKC (www.skcinc.com)

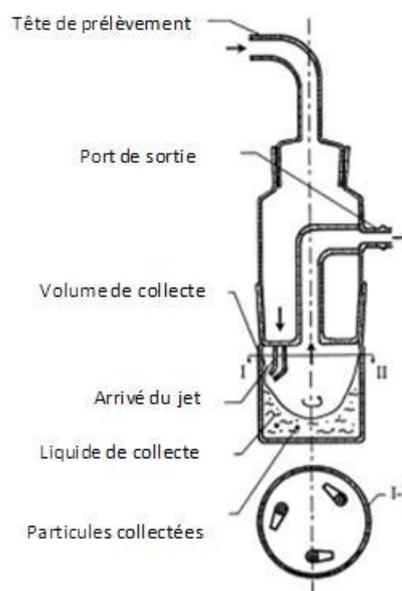


Figure 23 Schéma du Biosampler (Lin *et al.*, 1999)

I.3.D.b Impacteur basse pression (ELPI)

La mesure dynamique de la granulométrie de l'aérosol produit est effectuée avec un impacteur ELPI (Figure 24).

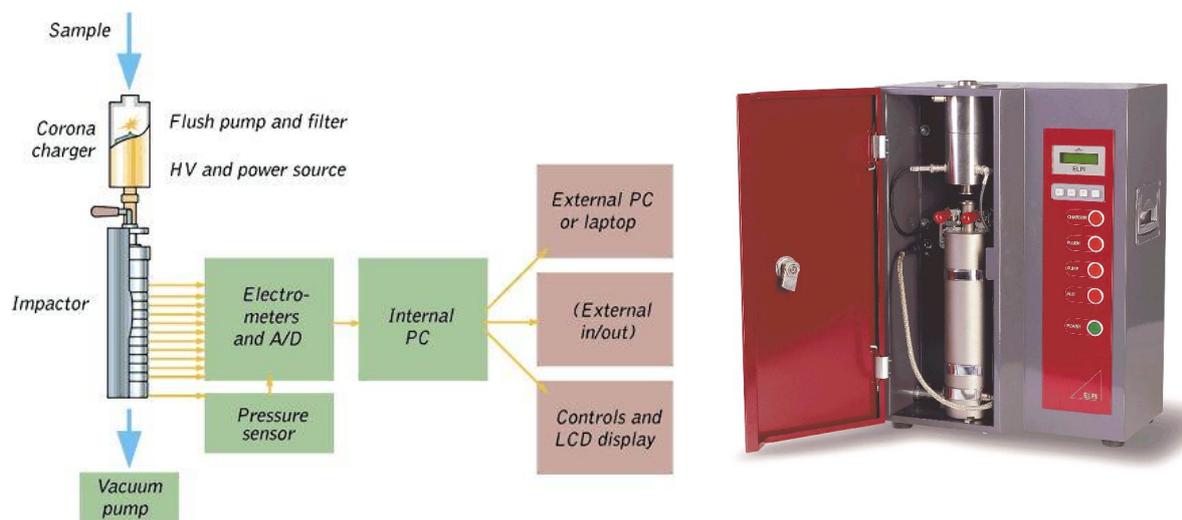


Figure 24 Principe de fonctionnement et photo de l'ELPI (www.dekati.com)

L'ELPI est un impacteur basse pression à détection électrique fonctionnant à un débit de 10 L/min qui dispose de 13 étages de collecte (Tableau 6). Les particules collectées par l'ELPI sont chargées par un chargeur Corona. L'impaction en cascade à basse pression sur les 13 étages reliés à des électromètres permet la séparation des particules en fonction du diamètre aérodynamique puis la mesure du signal électrique induit par le dépôt des particules permet de déterminer en temps réel la taille des particules et la concentration dans un domaine de taille compris entre 30 nm et 10 µm.

Tableau 6 Spécification des étages de l'ELPI : nombre d'orifices, d_{50} (µm) et pression (kPa)

Etages	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
d_{50} (µm)	0,0287	0,0559	0,0933	0,157	0,264	0,385	0,617	0,954	1,61	2,40	4,02	6,72	9,97
Nombre d'orifices	69	58	21	19	27	50	48	20	17	14	3	1	1
Pression (kPa)	10,00	22,44	38,02	68,27	89,14	97,16	99,65	100,52	101,00	101,18	101,24	101,30	101,32

L'ELPI est également utilisé pour collecter les différentes fractions granulométriques de l'aérosol viral. A cet effet, des filtres 0,22 µm (Millipore) enduits de glycérol sont disposés sur les 13 plateaux afin de limiter les phénomènes de rebond des particules. Après impaction les particules virales sont extraites des filtres par agitation au vortex dans 2 mL de milieu DMEM F12. Le milieu d'extraction est alors titré par Q-PCR et par VPA.

I.3.D.c Impacteur à 1 étage

Un impacteur à 1 étage (*Andersen Instrument Inc*) est utilisé pour contaminer les matériaux (Figure 25). Le milieu de culture classiquement utilisé dans ce type d'appareillage est remplacé par un disque de PMMA sur lequel seront disposés les coupons de matériau (2×2 cm). Cet appareillage, dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 7, est un impacteur à crible. L'air, aspiré à raison de 28,3 L/min, est accéléré par passage au travers d'orifices. En fonction de leur inertie, les particules vont, soit suivre les lignes de courant, soit s'impacter sur la surface de collection (support) pour celles possédant l'inertie la plus importante (Figure 26).

Tableau 7 Caractéristiques de l'impacteur Andersen à 1 étage utilisé pour l'aérobiocontamination de matériaux

Préleveur	Débit de prélèvement $Q_{\text{impacteur}}$ (L/min)	Vitesse d'air U_0 (m/s)	Nombre de trous	Diamètre d'un orifice (mm)	Diamètre aérodynamique de coupure d_{50} (μm)
Impacteur Andersen à 1 étage	28,3	23,3	400	0,25	0,65



Figure 25 Photographie impacteur Andersen à 1 étage

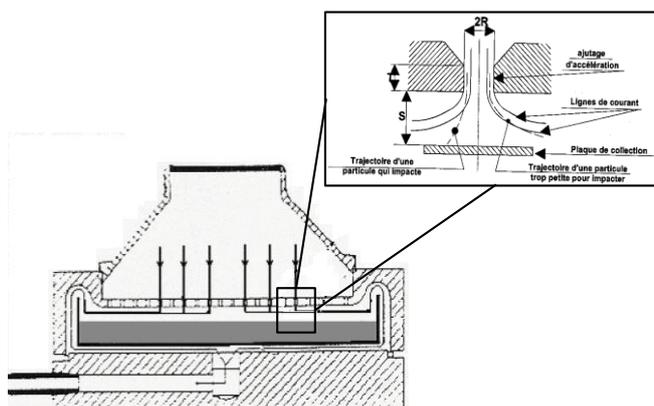


Figure 26 Schéma de l'impacteur Andersen à 1 étage et schéma de principe

I.4 PROCEDURE DE CONTAMINATION DES MATERIAUX

I.4.A Dépôt des virus en gouttelettes

Après décongélation à température ambiante d'un aliquote du pool, 10 gouttelettes de 2 μL sont déposées par contact à l'aide d'une pipette automatique P2 sur la surface des matériaux (Figure 27), ce qui correspond à 10 gouttelettes de 1,5 mm de diamètre avec $(6\pm 1)\times 10^3$ virus infectieux et $(3\pm 1)\times 10^9$ virus totaux par gouttelettes.

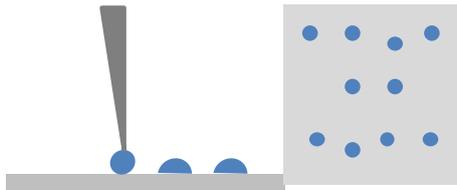


Figure 27 Représentation schématique d'un dépôt de gouttes sur une surface et localisation des dépôts à la surface des coupons

Les résultats de contamination sont rapportés en Unités Génomiques ou virus infectieux par unité de surface (cm^2).

La Figure 28 représente la chronologie d'un dépôt de gouttelettes.

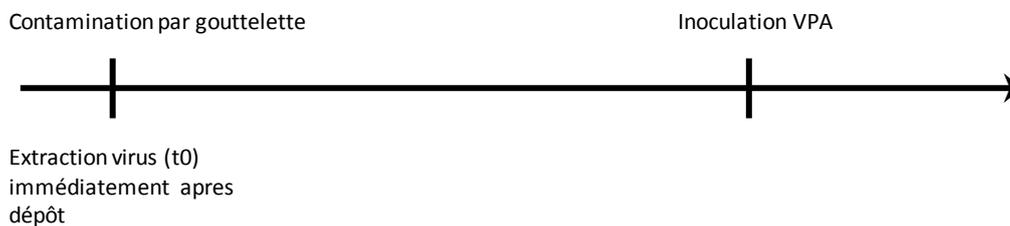


Figure 28 Chronologie de l'analyse après contamination

I.4.B Dépôt des virus par aérobiocontamination

Avant chaque aérobiocontamination, l'isolateur est mis en marche pour protéger l'expérimentateur. La température de l'air du montage est équilibrée à 20°C à l'aide du bain thermostaté. Le blanc particulaire du montage est vérifié à l'aide de l'ELPI. Les matériaux à contaminer sont placés dans l'impacteur Andersen sur le disque de PMMA (Figure 29). L'impacteur est placé directement sous la sphère d'homogénéisation.

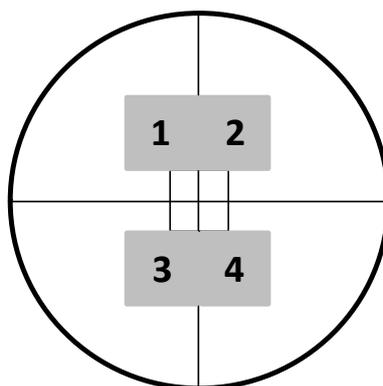


Figure 29 Répartition des coupons dans l'impacteur Andersen

L'inoculum viral issu du pool est décongelé juste avant la nébulisation. L'inoculum est homogénéisé au vortex 2 à 3 secondes puis un volume de 5 mL est introduit dans le générateur préalablement stérilisé.

La pression appliquée au nébuliseur est réglée à 1 bar à l'aide d'un manomètre. Le débit d'air sec de dilution est réglé à 20 L/min. L'humidité relative du montage est alors équilibrée à 31% en 2 minutes.

La pompe de l'impacteur est alors mise en route. Dans un premier temps, l'air contaminé passe directement de la sphère vers le système de filtration. Puis dans un second temps, l'aérosol viral est prélevé à partir de la sphère d'homogénéisation en orientant le flux d'air vers l'impacteur. Lorsque le temps d'impaction de 1 min est écoulé, le flux est réorienté sur le système d'équilibrage des pressions et les matériaux peuvent être retirés de l'impacteur.

Les 4 cm² de surface qu'offrent les coupons de matériaux permettent d'obtenir 35 zones de contamination par coupon (Figure 30).

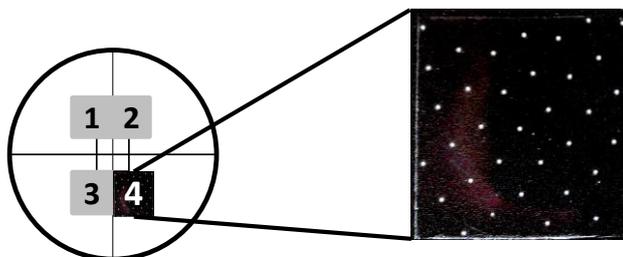


Figure 30 Photographie modifiée pour observer des zones de contamination sur le matériau

La Figure 31 représente la chronologie de l'aérocontamination.

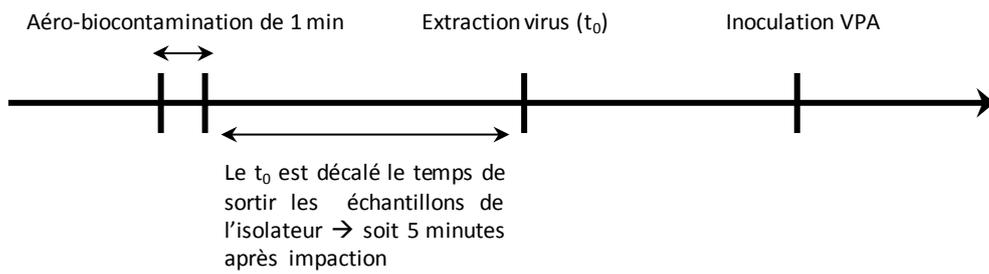


Figure 31 Chronologie de l'analyse après aérobio-contamination

Les résultats de contamination sont présentés en Unité Génomique ou virus infectieux par unité de surface (cm^2).

II DENOMBREMENT DES VIRUS EXTRAITS DU MATERIAU

II.1 PROCEDURE D'EXTRACTION

Le procédé d'extraction de virus d'une surface présenté par la littérature est généralement l'écouvillonnage. Nous avons relevé que ce procédé d'extraction possède des inconvénients pour l'étude:

- L'écouvillonnage est dépendant de l'opérateur
- l'écouvillon représente un second support pour le virus.

Pour notre étude, le procédé d'extraction retenu est un bain en milieu de culture avec une agitation mécanique par vortex. La sonication du bain a été écarté pour limiter les effets sur le virus.

Les virus déposés par dépôt goutte ou impaction sur les matériaux sont extraits par immersion du coupon dans 2 mL de milieu de culture DMEM F12 complété avec du sérum d'albumine bovine à 35%. Le bain est soumis à une agitation par vortex de 2 fois 20 secondes. Le milieu d'extraction est récupéré puis analysé par PCRq et VPA.

II.2 EVALUATION DE LA FLORE TOTALE PAR QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION

Le génome viral du virus *Influenza* est un ARN segmenté monocaténaire de polarité négative. Une technique de quantification du génome viral par la technique de *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) en temps réel a été réalisée. Pour cela 3 étapes successives sont nécessaires :

- Une extraction de l'ARN viral : L'extraction permet de libérer les fragments d'ARN viraux de la membrane lipidique et des capsides qui forment la structure des virions. Pour ce faire, un kit commercial *HIGH PURE RNA ISOLATION KIT* (Roche Applied Sciences, réf. : 11 828 665 001) a été employé.
- Une rétro-transcription de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) : La PCR ne pouvant amplifier que des séquences d'ADN, pour une matrice ARN, comme c'est le cas pour le virus *Influenza*, une étape préalable de reverse transcription est nécessaire. Cette réaction implique l'utilisation d'une enzyme spécifique : la reverse transcriptase (ADN polymérase ARN-dépendante), capable de synthétiser un brin d'ADN complémentaire à partir d'une matrice ARN. La température de réalisation de cette phase est fixée à 50 °C. L'étape de reverse transcriptase est réalisé par le kit TaqMan[®] Avian Influenza Virus (AIV-M) Reagents (Applied Biosystème AMBION).

- Une PCR : La PCR (Polymérase Chain Reaction) est utilisée pour amplifier, in vitro, une région spécifique d'ADN donné, afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Cette amplification consiste en 3 étapes :
 - séparer les deux brins complémentaires de l'ADN (dénaturation),
 - reconnaître la séquence cible et y fixer les amorces spécifiques (hybridation),
 - réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire (élongation).

La réaction PCR ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles). L'ADN néoformé (amplicon) à la fin d'un cycle sert de matrice au suivant. Ainsi l'alternance de température une quarantaine de fois, permet d'obtenir 2^{40} soit 10^{12} copies de la seule séquence cible présente initialement dans la matrice.

Le système de détection des amplicons Taqman[®] a été utilisée pour quantifier l'amplification de l'ARN par PCR.

II.2.A Méthode de détection des amplicons

La méthode de détection à partir de la sonde TaqMan est basée sur l'utilisation de l'activité exonucléasique 5'-3' de l'enzyme Taq polymérase (Figure 32 Illustration du principe de la PCR en temps réel avec une sonde Taq Man[®] (www.ilm.pf). Ces sondes sont marquées, à leurs extrémités, par un "Reporter" et un "Quencher", le « Reporter » n'étant fluorescent que s'il est suffisamment loin d'un « Quencher ». En effet, le Quencher a la propriété d'absorber l'énergie émise par le Reporter, par un mécanisme appelé FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfert*). Ainsi, initialement le Reporter de la sonde Taq Man ne fluoresce pas.

Lorsque la Taq polymérase synthétise un nouveau brin d'ADN, lors de la phase d'élongation, la sonde est hydrolysée et les « Reporter » et « Quencher » se retrouvent alors en solution et suffisamment éloignés pour que le « Reporter » émette dans sa longueur d'onde caractéristique (Figure 32).

Cette technique présente l'avantage d'être plus spécifique de par la présence de la sonde supplémentaire (TaqMan) et de pouvoir détecter plusieurs cibles en utilisant des sondes TaqMan dont le Reporter émet à différentes longueurs d'ondes (Moletta, 2005).

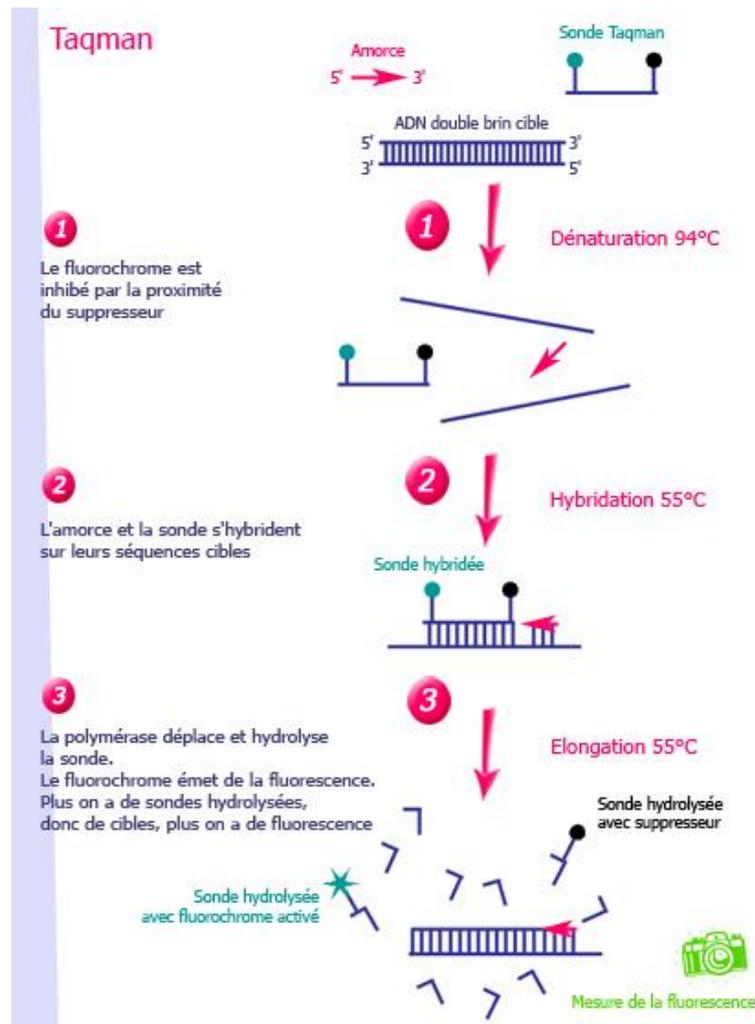


Figure 32 Illustration du principe de la PCR en temps réel avec une sonde Taq Man® (www.ilm.pf)

II.2.A.a Détermination de la concentration initiale en virus

L'analyse PCRq d'une gamme étalon du matériel génétique cible, dont le nombre de copies est connu, permet de tracer un ensemble de courbes d'amplification (Figure 33).

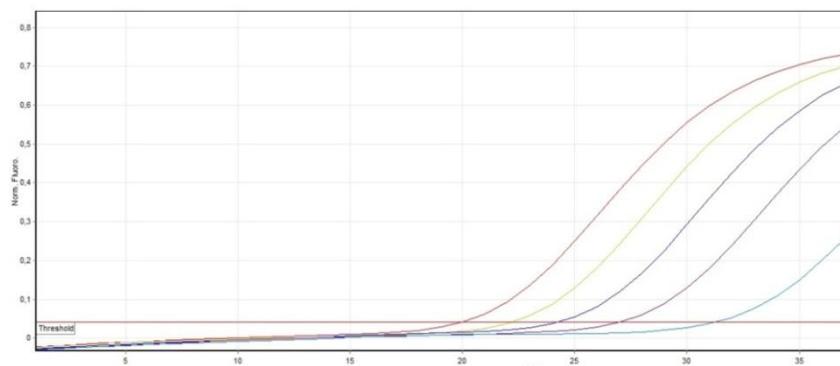


Figure 33 Représentation d'une amplification par PCR d'un fragment d'ADN – Roto Gene 6.

L'axe des abscisses correspond au nombre de cycles (45) et l'axe des ordonnées à l'augmentation de la fluorescence, directement proportionnelle à la quantité du produit

amplifié. L'intersection de chaque courbe d'amplification et de la ligne de seuil, placée automatiquement par le logiciel d'analyse Rotor Gene, au-dessus du bruit de fond et au niveau de la phase exponentielle de fluorescence, indique, par projection sur l'axe des abscisses, un cycle seuil (Ct, *Threshold Cycle*). Le Ct est inversement proportionnel au nombre de cibles amplifiées initialement présentes dans le milieu réactionnel.

Ainsi, deux échantillons ayant un nombre de copies différent auront deux Ct différents.

II.2.B Système et programmes utilisés pour la quantification du virus Influenza

Le système utilisé est : TaqMan® Avian Influenza Virus (AIV-M) Reagents (Applied Biosystème AMBION). Le Tableau 8 présente la composition du mix réactionnel et le programme PCRq utilisé pour le virus Influenza.

Tableau 8 Composition, volumes des réactifs et programme PCRq pour l'amplification du virus Influenza

Réactifs	volume par tube (en µl)	Phase	Température	Durée
Tampon RT-PCR	12,5	RT	45°C	10 min
Mix sondes et amorces AIV-M	1	Dénaturation initiale	95°C	10 min
Mix RT-PCR enzymes	1	Dénaturation	95°C	15 sec
Détection Enhancer	1,7	Hybridation/Elongation	60°C	45 sec

Les résultats d'une quantification par Q-PCR sont exprimés en unités génomiques/µL.

II.3 EVALUATION DES VIRUS INFECTIEUX PAR VIRAL PLAQUE ASSAY

Le principe du test de *Viral Plaque Assay* repose sur l'observation des plages de lyse causées par des effets cytopathogènes suite à l'inoculation de virus sur un tapis cellulaire. Ce test se réalise en plaque 6 puits sur des cellules MDCK infectées par des dilutions en cascade de l'échantillon viral. La lecture des plaques de titration consiste à dénombrer les plages de lyses cellulaire obtenues après inoculation et incubation du virus sur les tapis cellulaires immobilisés par un milieu gélosé. Le nombre de plages de lyse est utilisé afin de déterminer la quantité de virus infectieux.

II.3.A Préparation des cellules MDCK

Pour réaliser les titrations VPA, un pool de cellules MDCK a été constitué pour éviter toutes dérives cellulaires. Un aliquote de cellules est remis en culture pour chaque titration.

Les cellules sont cultivées en adhérence en flasques de 75 cm² avec du milieu MEM modifié. Dès que le tapis a recouvert toute la surface disponible, les cellules arrêtent leur multiplication, se décollent et meurent. Il faut donc traiter le tapis avant ce stade de manière à obtenir une suspension cellulaire capable de "repartir" dans un milieu neuf.

Pour cela, des lavages au tampon PBS (Sigma, P4417) sont réalisés afin d'éliminer les cellules mortes et les traces de sérum. Les cellules sont par la suite décollées sous l'action de trypsine-EDTA à 0,25% (Sigma, T4049). L'étape de trypsination permet de décoller les cellules adhérentes à la flasques (enzyme protéolytique) détruit certaines protéines de liaison et brise ainsi les liens entre les cellules, sans les altérer. Pour finir, les cellules sont dénombrées, 10⁶ cellules sont remises en culture dans du milieu neuf. Les cellules vont sédimenter, se fixer sur le fond du flacon et se multiplier jusqu'à former à nouveau un tapis de cellules confluentes en 48h-72h. Les cellules sont réensemencées 3 fois avant d'être utilisées pour une titration.

Le protocole mis en place dans le cadre de cette étude est adapté des travaux de Lindsley *et al* en 2010.

La veille de la titration les cellules MDCK sont réensemencées en plaque six puits (Corning, T3516) à raison de 2 mL par puits d'une suspension à 10⁶ cellules/mL en milieu MEM modifié. Les plaques sont ensuite incubées à 35°C avec 5% de CO₂ le temps de former un tapis cellulaire confluent. Le jour de l'inoculation les cellules sont rincées avec du tampon PBS.

II.3.B Infection du tapis cellulaire

L'échantillon viral est dilué en milieu DMEM F12 compété avec du sérum d'albumine bovine à 35%. Le virus est dilué par des dilutions successives de raison 10. A partir des dilutions virales (10⁻² à 10⁻⁷), 1000 µL sont respectivement déposées sur les tapis cellulaire des 6 puits de la plaque de titration. Après 45 min de contact à 35°C+5% de CO₂ et avec une agitation toutes les 20 min, les *inocula* sont directement lavés avec 2 mL de tampon PBS puis retirés.

Un milieu gélosé composé d'agarose à 2%, de milieu de culture, de trypsine TPCK et de dextran à 1% est ensuite coulé sur le tapis cellulaire infecté. La plaque de titration est ensuite incubée à 35°C +5 % de CO₂ pendant 48-72h.

II.3.C Révélation et lecture de la plaque

Les tapis cellulaire de la plaque de titration sont fixés en ajoutant directement sur les géloses 2 mL de formaldéhyde à 9%. Après 30 min, les géloses sont retirées précautionneusement à l'aide d'un scalpel. Les tapis sont ensuite colorés à l'aide d'une solution de cristal violet. Après 15 min de coloration, les tapis sont lavés avec de l'eau distillée puis séchés.

Le dénombrement est réalisé en priorité sur les puits dont le nombre de plages est compris entre 30 et 100. Le titre infectieux est déterminé grâce à la formule suivante :

$$\text{Titre infectieux (PFU/mL)} = \frac{\text{Nb de plaques} \times \text{Dilution}}{pE}$$

Les résultats d'une quantification par VPA sont exprimés en Plaque Forming Unit (PFU)/mL. La limite de quantification est de 30 PFU/mL.

CHAPITRE III : MISE AU POINT DES TECHNIQUES D'ETUDE

I DISPOSITIF D'AEROBIOCONTAMINATION VIRALE

Un outil laboratoire d'aérobiocontamination (Figure 34) a été élaboré afin d'étudier le rôle des supports sur la persistance du virus Influenza. L'objet de ce banc expérimental est d'obtenir une contamination maîtrisée et reproductible par un aérosol viral stable et viable dans un environnement sécurisé.

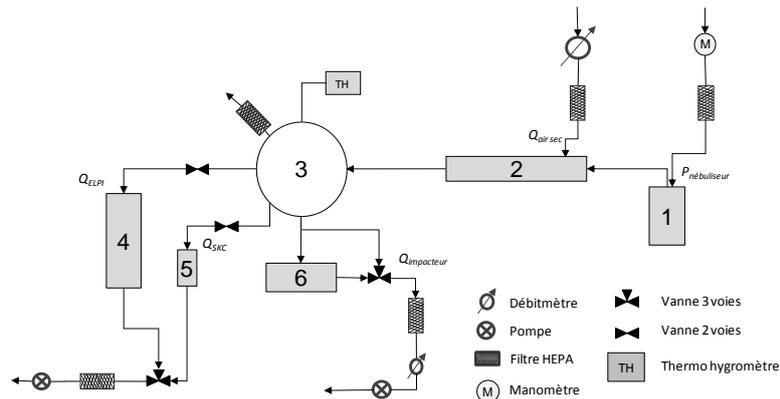


Figure 34 Représentation schématique et photographie du dispositif expérimental (1) Nébuliseur Collision, (2) Colonne de séchage, (3) Chambre d'homogénéisation, (4) *Electrical Low Pressure Impactor* (ELPI), (5) Bio-collecteur SKC, (6) Impacteur Andersen

Il est composé d'une chaîne de production de l'aérosol, d'un volume de conditionnement avec une hygrométrie et une température contrôlées, associé à une métrologie spécifique (Chapitre II : 1.3) permettant de caractériser la taille et la concentration des aérosols produits.

I.1 STABILITE DE L'AEROSOL

De manière à vérifier les constantes physiques du banc expérimental nous avons vérifié la stabilité de la production en aérosol. Pour ce faire, nous avons mesuré à l'aide de l'ELPI sur une tranche granulométrique de 0,04 et 5 μm la concentration particulaire au cours du temps. Cette dernière se stabilise rapidement en 2 min de nébulisation. La stabilité de la concentration est maintenue pendant 10 min avec une dispersion évaluée à $\pm 3\%$ (Figure 35).

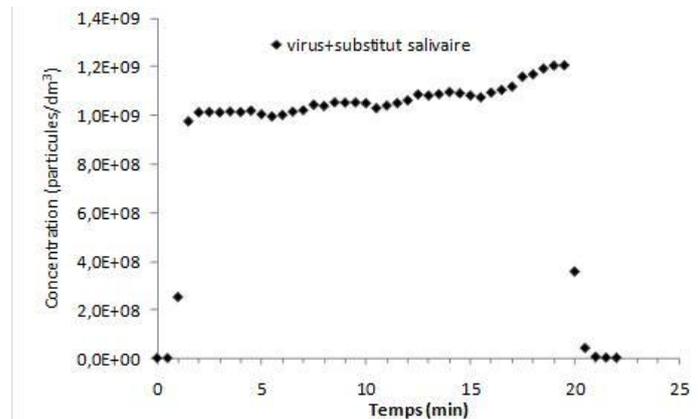


Figure 35 Evolution de la concentration particulaire de 0,21 à 0,81 μm à partir d'une suspension virale en substitut salivaire (HR 30%, 20°C, suspension à 3×10^9 unités génomiques/mL).

Au bout de 10 minutes la concentration particulaire commence à augmenter. Ce phénomène est attribué à l'accroissement de la concentration de la suspension de génération durant le fonctionnement du système (Baron et Willeke, 1993).

La Figure 36 correspond au suivi du profil granulométrique moyen pendant 1 min de l'aérosol. Au cours de ces 10 minutes, la granulométrie évolue seulement pour les particules très fines inférieures à 0,06 μm . L'accroissement observé pour les particules fines est lié à l'augmentation de la concentration en sels.

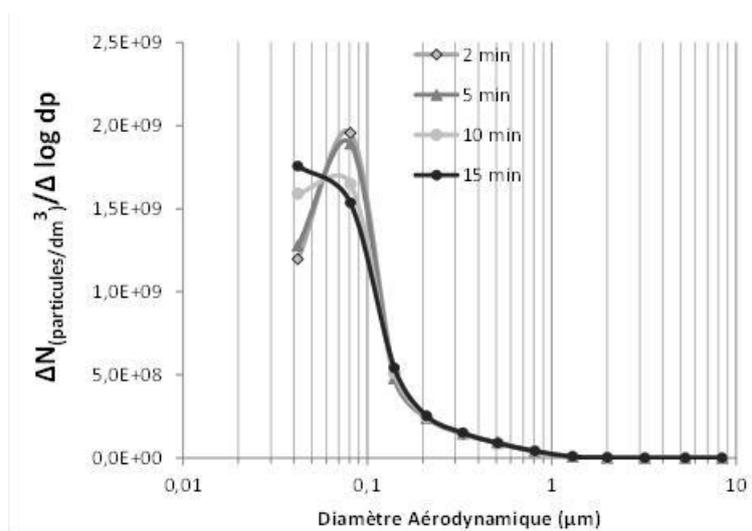


Figure 36 Evolution au cours du temps de la granulométrie de l'aérosol de 0,04 à 5 μm

I.2 TAILLE DES PARTICULES VIRALES AEROSOLISEES

L'étude de la granulométrie de l'aérosol produit à partir de la suspension virale en substitut salivaire est réalisée après 2 minutes de stabilisation de la concentration et sur une concentration moyenne mesurée pendant 5 minutes. La distribution granulométrique en nombre (Figure 37) est obtenue grâce à l'impacteur l'ELPI. Afin de discerner l'impact de la composition du milieu d'atomisation sur le profil granulométrique de l'agent biologique, un témoin « suspension » sans virus a également été atomisée.

L'aérosol produit à partir de la suspension virale est composé de particules comprises entre 0,04 et 9 μm . L'analyse de ce profil moyenné sur une durée de 5 minutes d'atomisation, montre une distribution polydispersée ($\sigma_g = 1,6$) avec un mode à 0,08 μm Figure 37).

Un profil identique, non tributaire de la présence des virions, mais reflétant la composition en sels du milieu de génération est obtenu avec le témoin « suspension ». Ainsi, le profil granulométrique des virions est masqué par la composition en sels du milieu d'atomisation, résultat également observé dans les travaux de (Fabian *et al.*, 2009).

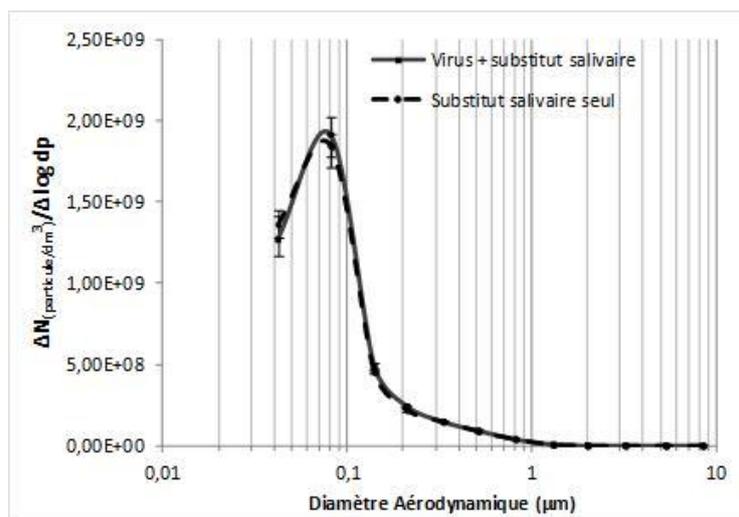


Figure 37 Profil granulométrique moyen de l'aérosol (HR 30%, 20°C, suspension à 3×10^9 unités génomiques/mL)- ELPI (DEKATI Ltd).

En considérant une particule sphérique, non poreuse et d'une masse volumique égale à 1g/cm^3 , nous avons étudié la répartition en volume de l'aérosol. La distribution montre un profil complètement différent. En effet, nous pouvons observer un mode à 0,8 μm (Figure 38).

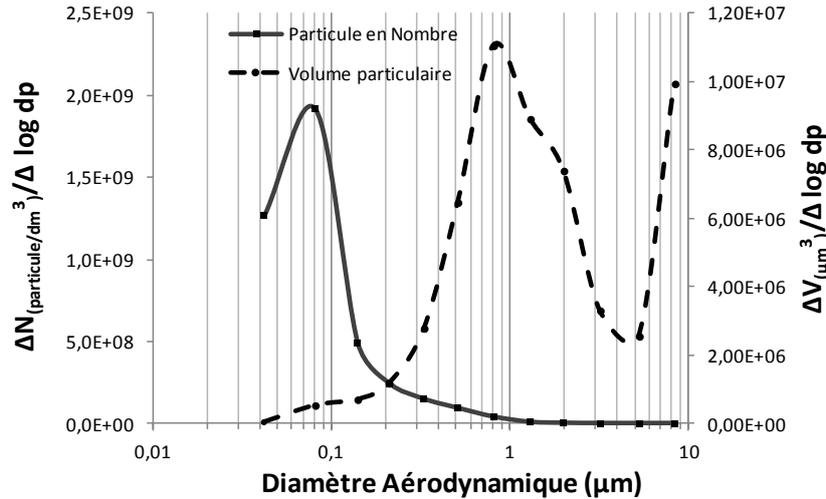


Figure 38 Distribution en nombre et en volume de l'aérosol

Afin de compléter cette mesure physique et accéder à la taille des particules contenant des virus, nous avons déployé une méthode moléculaire (PCRq) associée à la mesure du titre infectieux (VPA). Pour ce faire, les particules virales sont recueillies pendant 5 minutes sur les étages de l'ELPI recouverts d'un support en polycarbonate enduit de glycérol.

Nous avons au préalable testé la répétabilité des méthodes analytiques employées. Ainsi, la dispersion des mesures (Figure 39), évaluée à partir des extractions et analyses en PCRq et VPA répétées d'un même inoculum viral, a été estimée à 17% pour le virus Influenza (n=6). Cette répétabilité apparaît suffisante pour analyser la granulométrie et le devenir sur les supports des aérosols de virus.

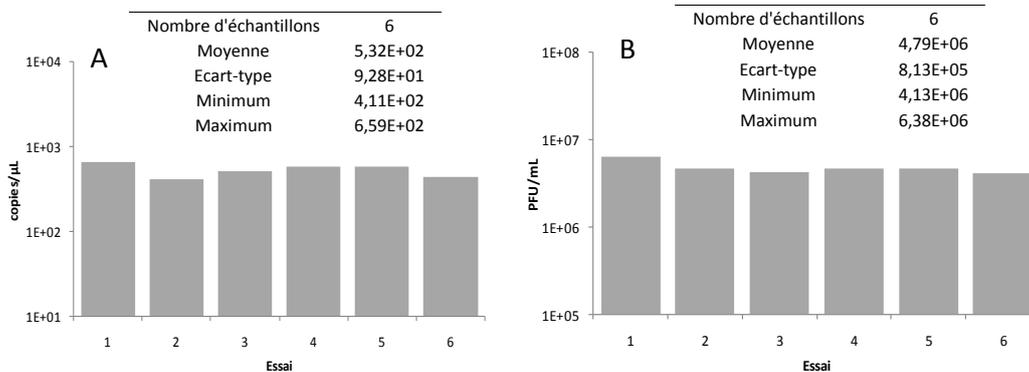


Figure 39 Estimation de la dispersion de l'analyse par PCR (Extraction d'ARN et analyse RT-PCRq) - A et du titre infectieux - B.

Concernant la taille des virus en aérosol produit dans le banc expérimental, nous avons représenté leur granulométrie dans la Figure 40 et la Figure 41. Ainsi, le mode centré à 0,08 µm du aux sels n'est plus observé. La répartition granulométrique des particules infectieuses est similaire à la mesure des unités génomiques obtenue par PCRq. Les particules virales sont comprises dans une gamme de tailles comprises entre 0,04 et 5 µm, avec une répartition bimodale (modes à 0,25 et 0,75 µm).

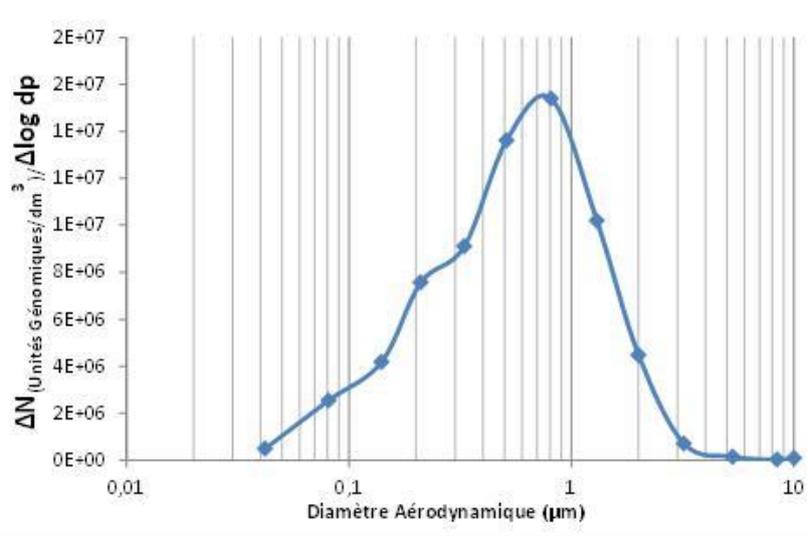


Figure 40 Profil granulométrique des particules virales quantifiées par PCRq.

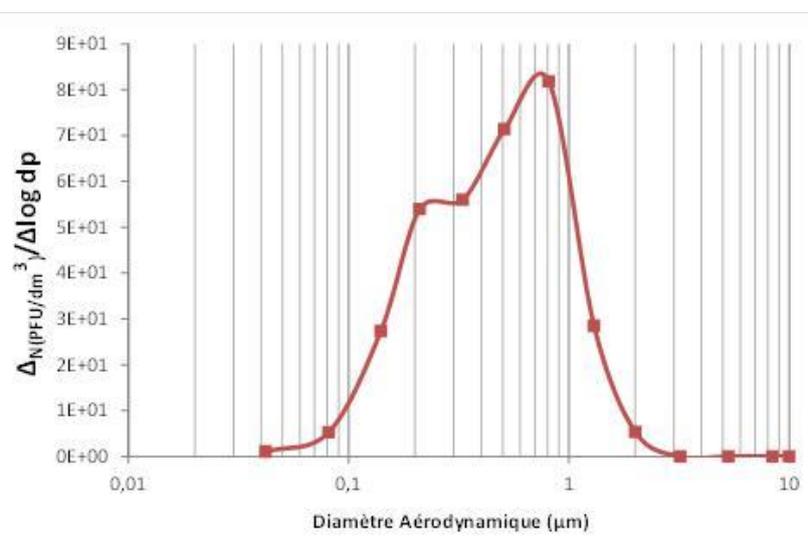


Figure 41 Profil granulométrique des particules virales quantifiées par VPA.

Les travaux ont permis d'établir sur une période de 5 minutes les rapports présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 Proportion de particules virales et de virus infectieux

Diamètre (µm)	Nombre de particules virales/nombre total de particules	Nombre de virus infectieux/nombre de particules virales <i>R(I/T) aérosol</i>
0,042	1/100000	2/1000000
0,081	4/100000	2/1000000
0,14	2/10000	6/1000000
0,21	9/10000	7/1000000
0,33	2/1000	6/1000000
0,51	5/1000	5/1000000
0,81	1/100	5/1000000
1,3	4/100	2/1000000
2	8/100	2/1000000
3,2	1/10	0
5,3	2/10	0
8,4	2/100	0

Les résultats montrent que le nombre de virus infectieux collectés est bien inférieur au nombre de particules virales collectées. Ce rapport met en évidence un impact probable de l'aérosolisation et la collecte par impaction.

Nous observons bien sur la Figure 42 que le profil granulométrique reste sensiblement le même entre les virus infectieux et les particules virales.

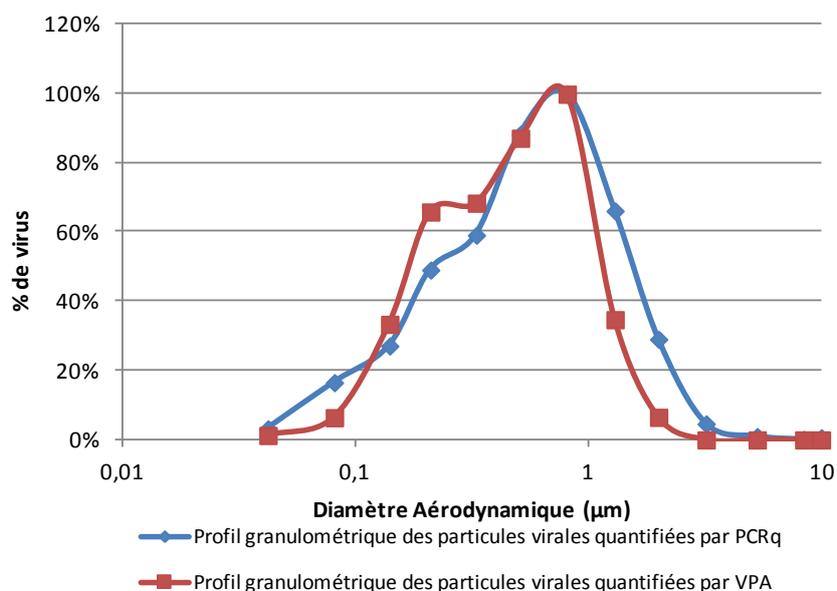


Figure 42 Profils granulométriques normalisés

I.3 INFECTIOSITE DU VIRUS DANS LE GENERATEUR ET EN AEROSOL

L'inoculum issue du pool viral et utilisé pour l'aérosolisation est à $(6\pm 1)\times 10^6$ virus infectieux/mL et $(3\pm 1)\times 10^9$ unités génomiques/mL. Le pourcentage de virus infectieux sur les virus totaux est de 0,2%. Ce taux n'est pas inhabituel dans la multiplication de virus Influenza car lié au processus d'assemblage et de bourgeonnement des virions néoformés qui entraîne la formation de virions non infectieux (Wei *et al.*, 2007).

La conservation de l'infectiosité de la suspension virale est vérifiée après une durée de 10 min de fonctionnement.

La concentration en virus infectieux est mesurée par *Viral Plaque Assay* avant (t_0) et après 10 min de fonctionnement (pression 1 bar dans le nébuliseur). Un « témoin paillasse » est réalisé en conservant un échantillon de la suspension virale à température ambiante pendant 10 min (Figure 43).

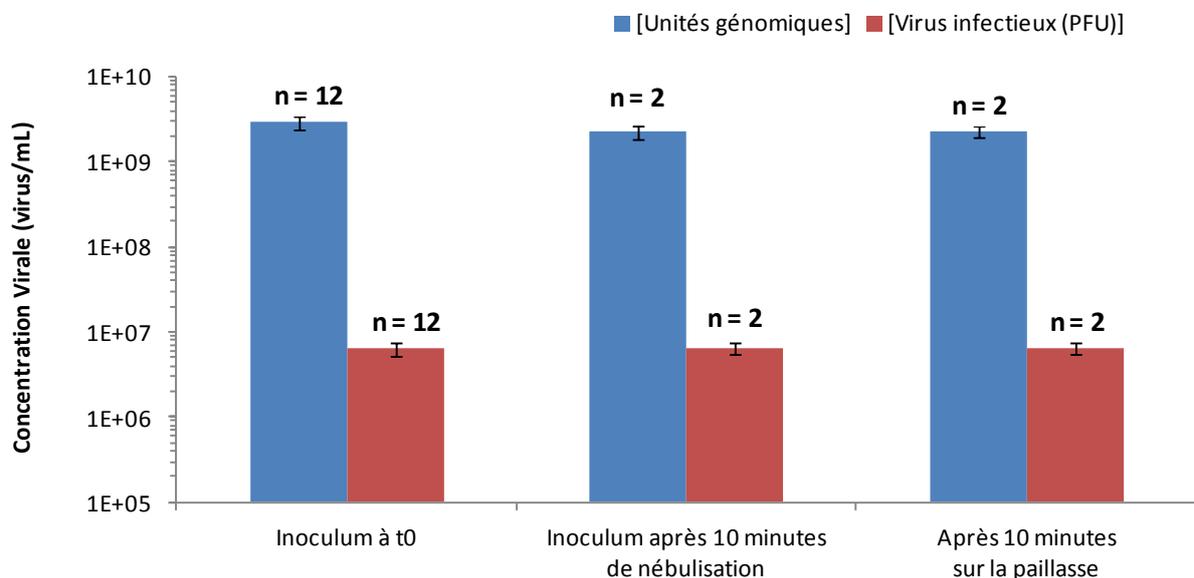


Figure 43 Concentration virale de l'inoculum dans le nébuliseur après 10 minutes de fonctionnement. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur la méthode d'analyse PCRq ou VPA.

La concentration en virus infectieux reste constante après 10 minutes de fonctionnement. Aucune perte d'infectiosité n'est observée avec le « témoin paillasse ». Le fonctionnement du nébuliseur n'affecte ainsi pas l'infectiosité de l'agent biologique permettant une production de cet aérosol sur une durée de 10 minutes.

L'infectiosité du virus est également vérifiée en aérosol au moyen de prélèvements en milieu liquide SKC (Figure 44).

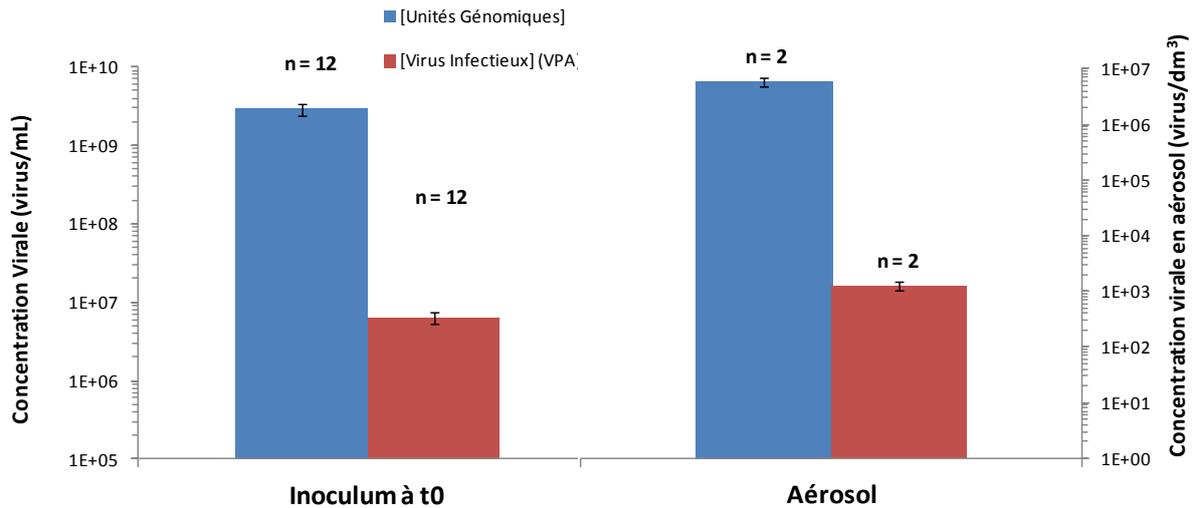


Figure 44 Concentration virale en aérosol. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur la méthode d'analyse PCRq ou VPA.

La nébulisation de l'inoculum viral permet d'aérosoliser $(1\pm 2)\times 10^3$ virus infectieux/dm³ et $(6\pm 1)\times 10^6$ unités génomiques/dm³.

Le rapport $R_{(I/T)}$ entre la concentration infectieuse et la concentration en unité génomique peut être calculé. Il traduit l'infectiosité de la suspension virale :

- $R_{(I/T) \text{ inoculum}}$ est de $\approx 10^{-3}$
- $R_{(I/T) \text{ aérosol}}$ est de $\approx 10^{-4}$.

Les résultats $R_{(I/T) \text{ aérosol}}$ sont différents des résultats observés lors de l'analyse de la granulométrie avec l'ELPI. Dans ce dernier cas le rapport $R_{(I/T) \text{ aérosol}}$ est plus élevé car la méthode de collecte est différente (impaction sur un filtre enduit de glycérol contre impaction liquide). De plus, des travaux ont montré que le bio-collecteur SKC n'induisait pas de perte d'infectiosité du virus Influenza, lorsqu'il était collecté pendant 5 min en PBS additionné de calcium et magnésium (Fabian *et al.*, 2009). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, la diminution d'infectiosité observée entre l'inoculum et l'aérosol traduit une perte d'infectiosité liée au passage à l'état d'aérosol.

I.4 AEROCONTAMINATION DE SURFACE

La maîtrise et l'évaluation de l'aérocontamination des virus Influenza sont abordées dans cette partie. Nous avons étudié sur l'acier inoxydable: la quantité de virus déposés et leur infectiosité après dépôt. L'aspect du dépôt est également examiné.

I.4.A Quantité de virus impactés

L'évaluation de la contamination virale à t_0 pour un temps d'aérobiocontamination de 10 min est réalisée sur un matériau de référence (acier inoxydable) (Figure 45). L'aérosol viral est produit à partir d'un nouvel inoculum issu du pool viral pour chacun des essais.

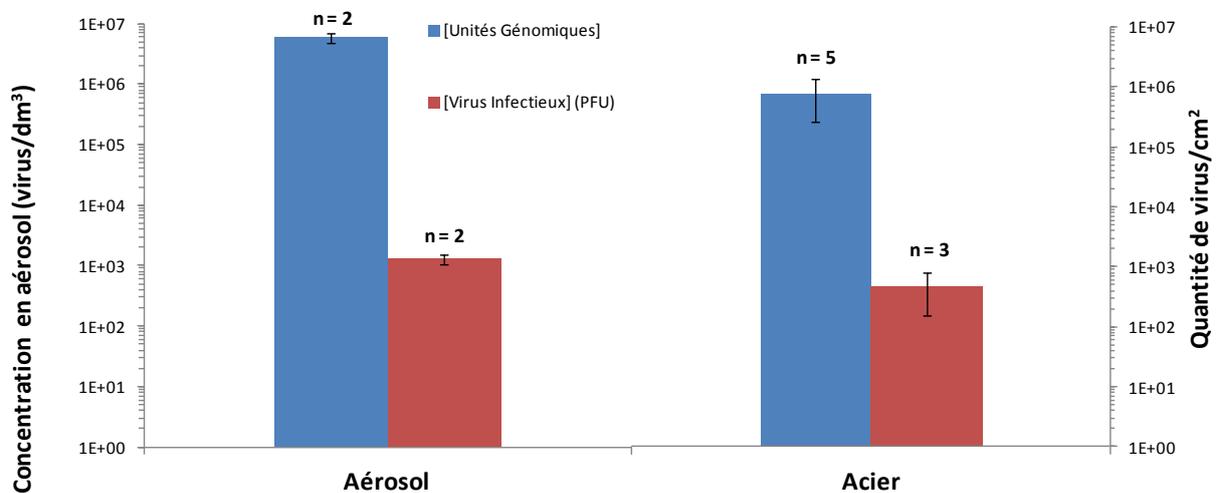


Figure 45 Quantité de virus déposée à t_0 sur un coupon d'acier après 10 min d'impaction et estimée après extraction. L'incertitude correspond à un min-max sur l'acier et à l'erreur sur l'analyse en aérosol.

L'impaction de 10 min permet de contaminer un coupon d'acier avec $(1 \pm 0,5) \times 10^6$ unités génomiques/cm². La perte liée à l'impaction et à l'extraction est estimée à 1,5 log de la concentration théorique.

La quantité de virus infectieux déposée par une impaction de 10 min est de 5×10^2 PFU/cm² sur l'acier (Figure 45). La contamination et l'extraction sur l'acier n'entraînent pas de perte d'infectiosité supplémentaire que celle déjà observée en aérosol puisque le ratio de survie $R_{(I/T)}$ sur le support est égale au $R_{(I/T)}$ en aérosol $R_{(I/T) \text{ acier}} \approx R_{(I/T) \text{ aérosol}} \approx 10^{-4}$.

I.4.B Observation du dépôt

L'observation au microscope électronique à balayage du dépôt sur de l'acier après 10 min d'impaction montre une accumulation importante de cristaux de sels du substitut salivaire (Figure 46). Il est possible que cette accumulation de couches limite le contact des virus avec le support. Aussi afin de réduire ces amas, nous avons diminué la durée de la contamination (d'un facteur 10).

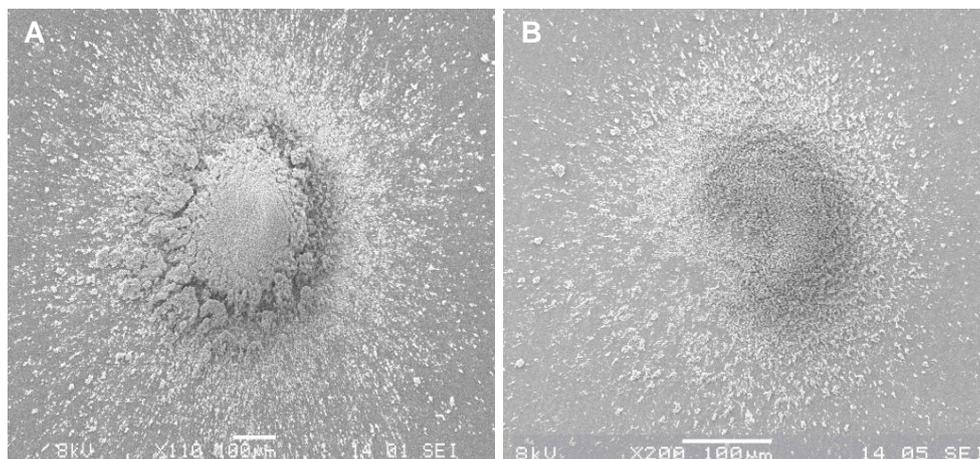


Figure 46 Photographies réalisées au MEB. Effet du temps d'impaction sur l'aspect du dépôt sur acier. (A) 10 min d'impaction et (B) 1 min d'impaction.

Ainsi, il apparaît préférable de réaliser des impactions plus courtes de 1 min afin d'obtenir un dépôt suffisamment dense tout en évitant une accumulation trop importante de sels. Un grossissement plus important montre que les résidus secs déposés par impaction sont de l'ordre du micromètre (Figure 47) ce qui correspond à la taille des particules portant le virus.

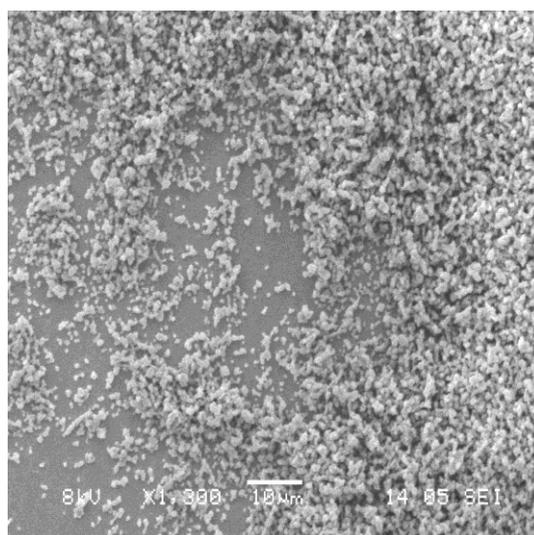


Figure 47 Photographies réalisées au MEB d'une impaction de 1 min sur acier.

L'étude de la quantité d'unités génomiques déposée estimée après extraction, montre qu'en faisant varier le temps d'impaction, il existe bien une relation entre le temps et la quantité déposée (Figure 48).

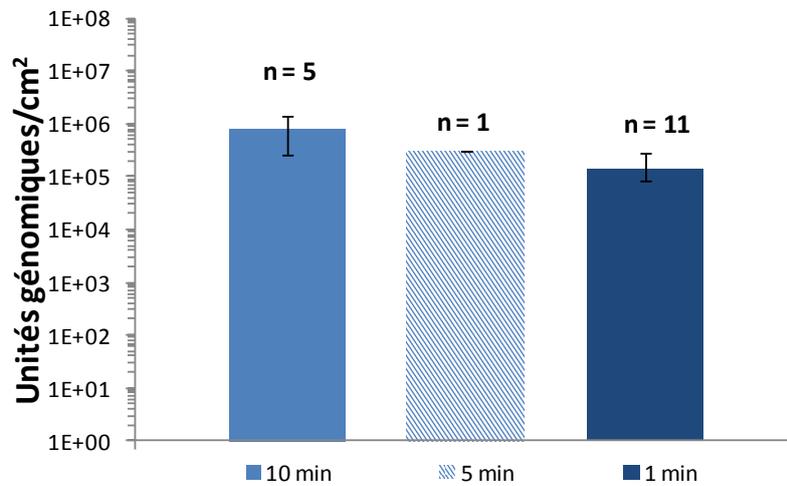


Figure 48 Impact du temps d'impaction sur la quantité d'unités génomiques extraite à t_0 . les barres d'erreur représentent des min max.

Cependant en réduisant le temps d'impaction à 1 minute, nous réduisons de 1 log la quantité d'unités génomiques à $(1,4 \pm 0,4) \times 10^5$ unités génomiques/cm² et la quantité de virus infectieux à 20 ± 10 PFU/cm². L'infectiosité du virus juste après dépôt ne semble pas être influencée par le temps d'impaction (Figure 49). En effet, le ratio $R_{(I/T) \text{ acier } 1 \text{ min}}$ est environ égale à $R_{(I/T) \text{ acier } 10 \text{ min}} \approx 10^{-4}$.

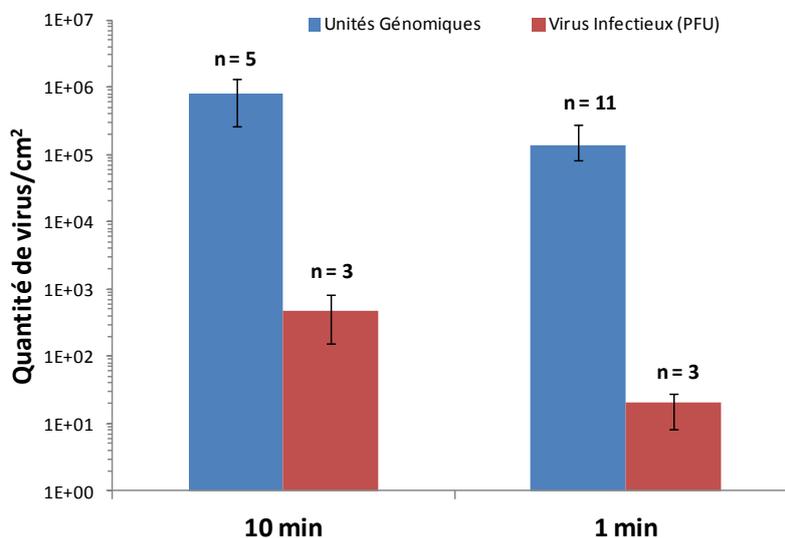
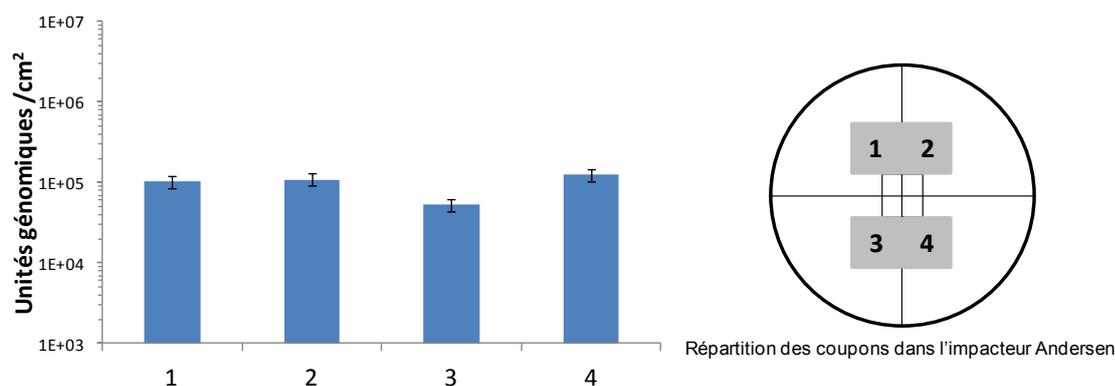


Figure 49 Impact du temps d'impaction sur la quantité de virus infectieux extrait à t_0 . Les incertitudes correspondent à des min max.

Dans les paragraphes et chapitres suivant ne sont présentés que des aérobiocontaminations de 1 min.

I.4.C Homogénéité de l'aérocontamination dans l'impacteur

La variation de l'aérocontamination en fonction de l'emplacement dans l'impacteur a été étudiée sur le matériau de référence, l'acier inoxydable. La variation a été évaluée sur une contamination simultanée de 4 coupons. Sur chaque coupon sont effectuées une extraction puis une quantification par PCRq du milieu d'extraction. (Figure 50).

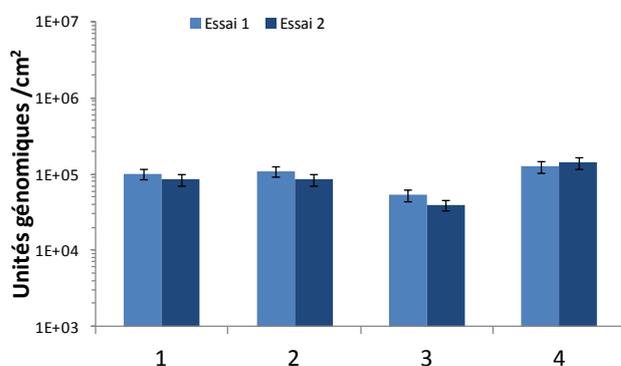


Essai	
Nombre d'échantillons	4
Moyenne	1E+05
Ecart-type	3E+04
Minimum	5E+04
Maximum	1E+05
CV (%)	31

Figure 50 Variation de l'aérobiocontamination en fonction de l'emplacement des coupons dans l'impacteur. Les incertitudes correspondent à l'incertitude sur l'analyse PCRq.

La variation de l'aérobiocontamination des coupons d'acier observée dans l'impacteur est de 31%. L'emplacement 3 semble présenter une contamination plus faible.

La variation de l'aérobiocontamination des coupons d'acier en fonction de leur position dans l'impacteur a été évaluée pour deux contaminations successives avec le même inoculum. Les résultats sont présentés par la Figure 51.



Essai 1 et 2	
Nombre d'échantillons	8
Moyenne	9E+04
Ecart-type	3E+04
Minimum	4E+04
Maximum	1E+05
CV (%)	37

Figure 51 Variation de l'aérobiocontamination après deux impacts successives avec le même inoculum. Les barres d'erreurs correspondent à l'incertitude sur l'analyse PCRq

La variation de la quantité de virus déposée après deux aérobiocontaminations successives est de 37%. L'emplacement 3 présente toujours une contamination plus faible.

Lors des essais, l'emplacement a toujours été utilisé avec un coupon pour ne pas perturber l'aéroulque de l'impacteur. Cependant, les coupons contaminés à cet emplacement ne feront pas l'objet d'analyses.

I.4.D Reproductibilité de l'aérocontamination virale

La reproductibilité de l'aérobiocontamination par impaction est évaluée sur le matériau de référence (acier inoxydable). Elle est estimée sur 9 aérobiocontaminations de 1 min réalisées à partir de 9 aliquotes du pool viral. La quantité de virus déposée à t_0 a été déterminée par PCRq après extraction (Figure 52).

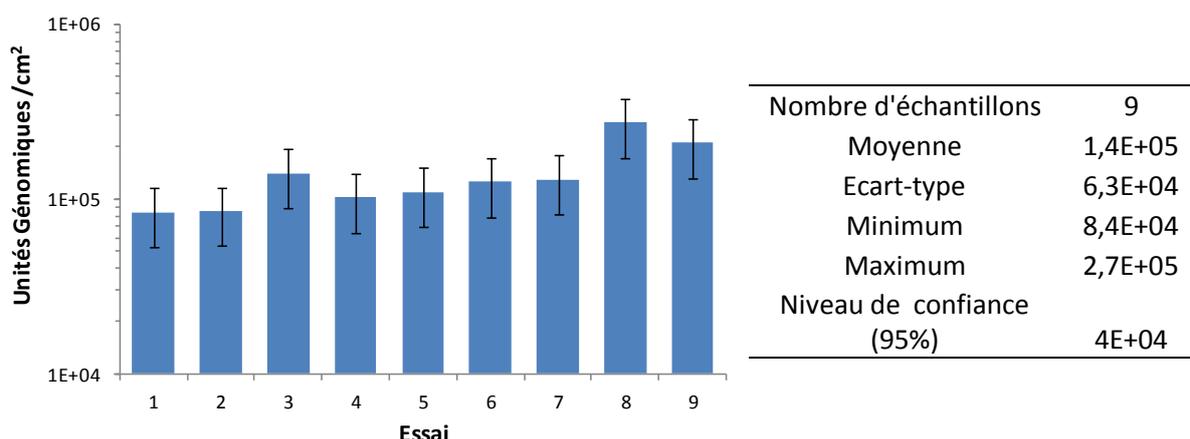


Figure 52 Estimation de la reproductibilité de la contamination par impaction. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur l'extraction.

La quantité moyenne de virus impactés et extrait de l'acier est de $(1,4 \pm 0,4) \times 10^5$ unités génomiques ($n=9$, IC 95%) pour une dispersion de 45%.

Ainsi, nous savons que notre dispositif permet de contaminer des matériaux. Nous allons pouvoir étudier le rôle des supports en réalisant des aérobiocontaminations de différents matériaux.

II CONTAMINATION VIRALE PAR DEPOT

Cette partie traite de la mise en œuvre de la contamination par dépôt de gouttelettes. La contamination est réalisée à partir de la suspension virale en substitut salivaire. Nous avons étudié sur l'acier inoxydable la quantité de virus et l'infectiosité après dépôt.

II.1 EVALUATION DE LA QUANTITE DE VIRUS DEPOSE

La contamination par voie liquide du matériau de référence, l'acier inoxydable, avec une suspension à 3×10^9 unités génomiques/mL, est présentée par la Figure 53.

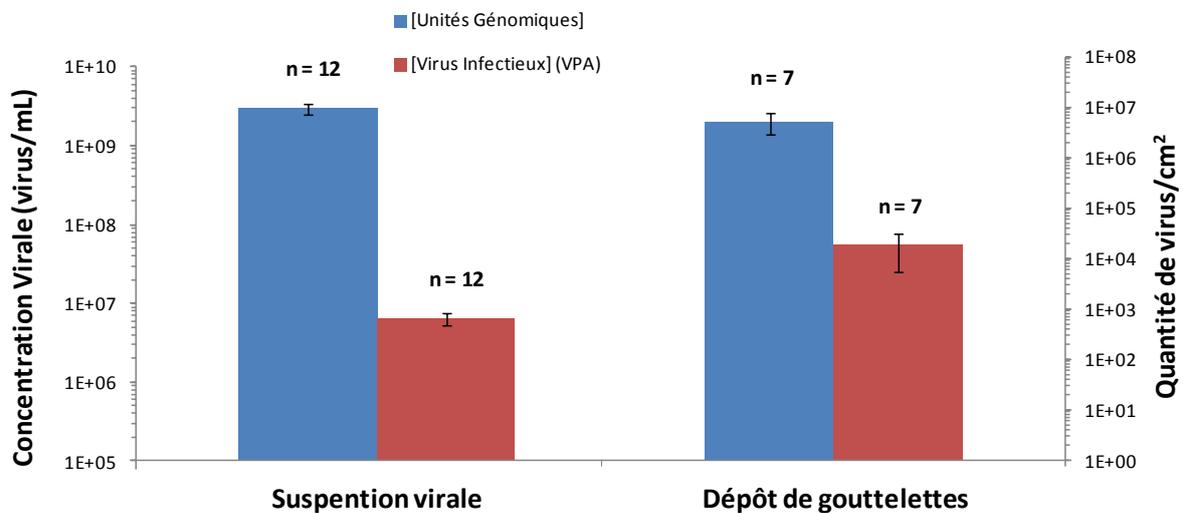


Figure 53 Quantité de virus infectieux après dépôt de gouttelette sur acier. Les barres d'erreur représentent un min-max

Le dépôt par voie liquide permet de contaminer un coupon d'acier avec $5,2 \times 10^6$ unités génomiques/cm². La perte liée au dépôt et à l'extraction est estimée à 0,5 log.

La quantité déposée de virus infectieux par le dépôt liquide est de 2×10^4 PFU/cm². Le dépôt et l'extraction sur l'acier n'entraînent pas de perte d'infectiosité puisque $R_{(I/T) \text{ inoculum}} \approx R_{(I/T) \text{ acier gouttelette}} \approx 10^{-3}$.

II.2 INCERTITUDE LIEE A LA CONTAMINATION PAR DEPOT DE GOUTTELETES

L'incertitude liée à la contamination par voie liquide a été estimée sur le matériau de référence, l'acier inoxydable. L'incertitude est évaluée sur 5 contaminations successives, à partir d'un même inoculum viral, selon la procédure de contamination par gouttelette. Sur chaque coupon sont réalisées une extraction puis une quantification par Q-PCR du milieu

d'extraction. La dispersion sur le dépôt sur 5 coupons d'acier et l'extraction des virus a été estimée à 31% (n=5) (Figure 54).

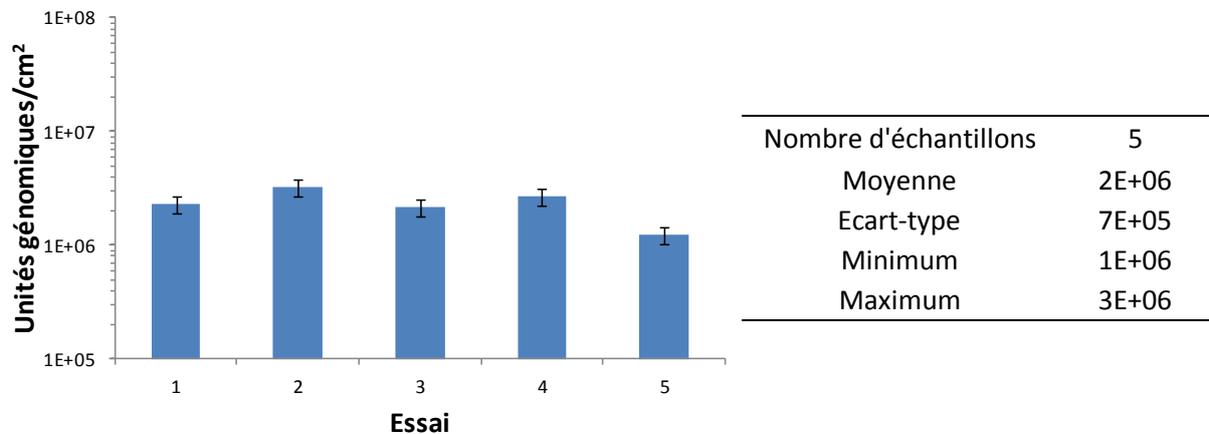


Figure 54 Estimation de la dispersion sur la quantité de virus infectieux déposée par voie liquide sur acier. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur la méthode d'analyse par PCRq.

II.3 REPRODUCTIBILITE DE LA CONTAMINATION PAR DEPOT DE GOUTTELETES

La reproductibilité de la contamination par gouttelette est évaluée sur le matériau de référence. La reproductibilité est estimée sur 7 contaminations réalisées à partir de 7 aliquotes du pool viral. La quantité de virus déposée a été déterminée par PCRq après extraction (Figure 55).

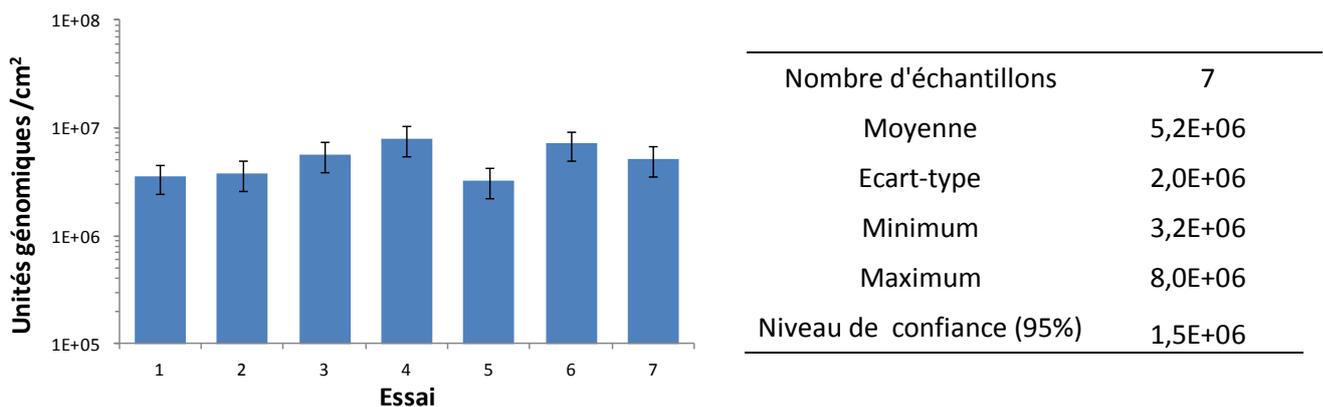


Figure 55 Estimation de la reproductibilité de la contamination par dépôt de gouttelettes. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur sur l'extraction.

La quantité moyenne de virus déposée après extraction est estimée à $(5,2 \pm 1,5) \times 10^6$ unités génomiques/cm² (n=7, IC 95%), avec 39% de variation.

II.4 ASPECT DE LA CONTAMINATION PAR DEPOT DE GOUTTELETTES

Les observations réalisées au microscope électronique à balayage d'un dépôt par voie liquide sur de l'acier sont présentées par la Figure 56. La contamination par dépôt de gouttelettes (CHAPITRE II :I.4.A) consiste à déposer une gouttelette de 2 μL de la suspension virale à la surface du support. La gouttelette représente idéalement une sphère en suspension dans l'air d'environ 1,5 mm de diamètre. Après dépôt et séchage sur le matériau de référence en acier inoxydable, la contamination sur la surface est d'environ 2,5 mm de diamètre. La gouttelette de 2 μL met environ 30 min pour sécher à 21°C et 50% d'humidité relative.

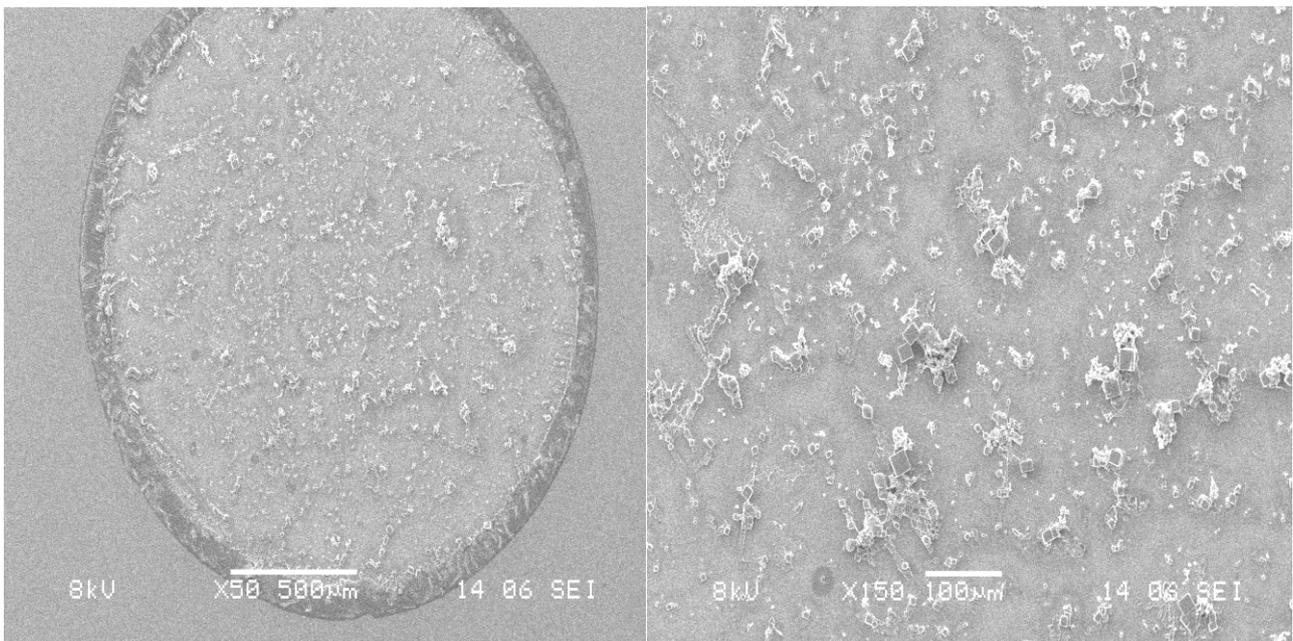


Figure 56 Photographies réalisées au MEB d'un dépôt sur acier, après séchage, de gouttelettes du substitut salivaire sans virus. La marque noire est un repère pour localiser le dépôt à la surface du matériau.

L'observation montre que la gouttelette après séchage offre une surface hétérogène présentant des espaces entre des amas. Parmi ces amas, il semblerait que les sels du substitut salivaire s'arrangent en cristaux.

CHAPITRE IV : PERSISTANCE DU VIRUS INFLUENZA SUR LES SUPPORTS

I ÉTUDE DE LA CHARGE VIRALE DEPOSEE SUR LES MATERIAUX

Cette partie présente les résultats de persistance du virus Influenza sur les différents supports après contamination par gouttelettes ou par aérobiocontamination de 1 min. Dans un premier temps, la persistance après contamination (t_0) est évaluée par mesure du génome viral. Dans un second temps l'évolution de la charge virale totale au cours du temps est étudiée.

I.1 ÉTUDE DE LA CHARGE VIRALE TOTALE INITIALE SUR LES MATERIAUX

I.1.A Aérobiocontamination des matériaux

Les matériaux sont contaminés selon la procédure d'aérobiocontamination décrite dans CHAPITRE II :I.4.B. La Figure 57 présente les résultats de persistance après 1 min d'aérobiocontamination. L'extraction et l'analyse par PCRq immédiatement après contamination (t_0) permet de déterminer la charge virale en unités génomiques déposée sur les matériaux par l'aérobiocontamination.

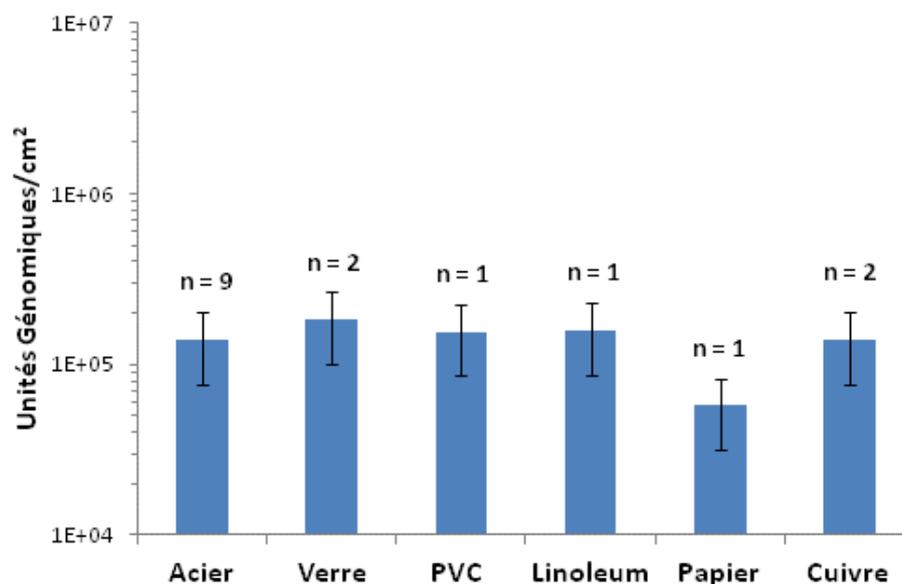


Figure 57 Quantité d'unités génomiques après dépôt d'aérosols sur les matériaux. Les barres représentent l'incertitude sur la reproductibilité de l'aérobiocontamination décrite dans CHAPITRE III :I.4.D.

Les quantités de virus mesurées après extraction sont semblables pour l'ensemble des matériaux excepté pour le papier. De par sa nature fibreuse, le papier pose des difficultés d'extraction. Cependant en tenant compte de l'incertitude liée à l'aérobiocontamination les

quantités déposées de sont pas significativement différentes. La quantité d'unités génomiques moyenne extraite des matériaux est donc de $(1,4 \pm 0,4) \times 10^5$ unités génomiques/cm² (IC 95%).

I.1.B Contamination des matériaux par dépôt de gouttelettes

Les matériaux sont contaminés selon la procédure d'aérobiocontamination décrite au CHAPITRE II :I.4.A. La Figure 58 présente les résultats de persistance après une contamination par gouttelettes sur les matériaux. L'extraction et l'analyse par PCRq immédiatement après contamination (t_0) permet de déterminer la charge virale en unités génomiques déposée sur les matériaux.

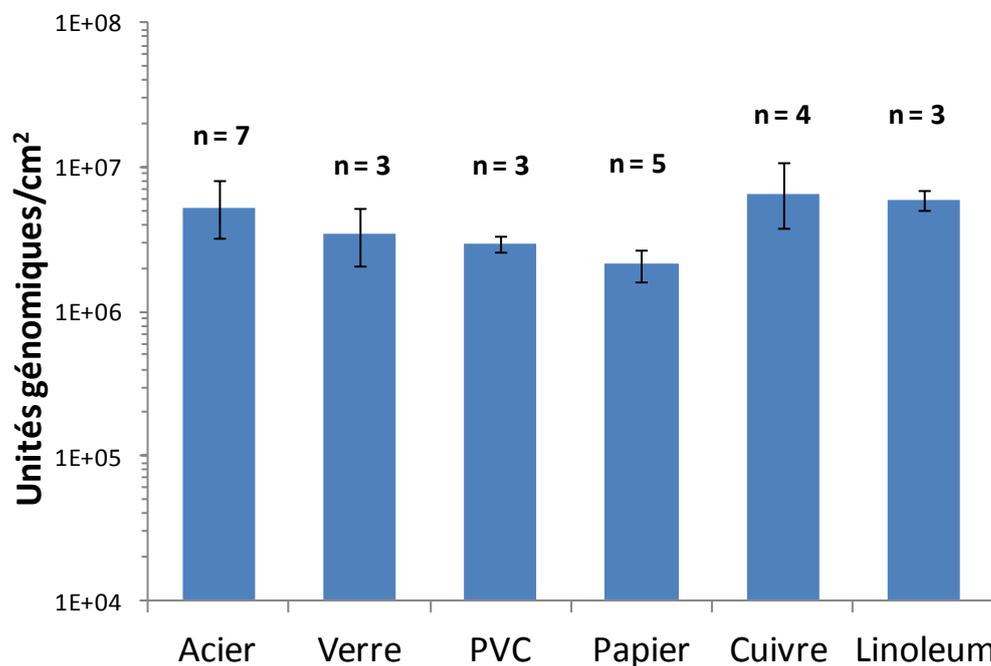


Figure 58 Quantité d'unités génomiques après dépôt de gouttelettes sur les matériaux. Les barres d'incertitudes représentent des min-max.

En tenant compte des barres d'erreur, les quantités de virus déposées sur les matériaux semblent équivalentes mais pour le papier la tendance liée à sa nature fibreuse est toujours observée. Ainsi, la quantité d'unités génomique moyenne extraite des matériaux est donc de $(4,4 \pm 1,4) \times 10^6$ unités génomiques/cm² (IC 95%).

I.2 ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA CHARGE TOTALE SURFACIQUE

Au travers les quantités d'unités génomiques extraites, nous avons évalué au cours du temps l'extraction des virus et leur intégrité (génome).

I.2.A Aérobiocontamination des matériaux

La charge virale totale déposée sur les matériaux, contaminés selon le protocole d'aérobiocontamination pendant 1 min, est suivie sur 2h. Pour cela, 3 coupons d'un matériau (t_{0h} , t_{1h} et t_{2h}) sont contaminés par une seule aérobiocontamination. Les coupons sont conservés de 1h à 2h à 50% d'humidité relative et à 21°C (CHAPITRE II :I.1.B). Les résultats sont présentés par la Figure 59.

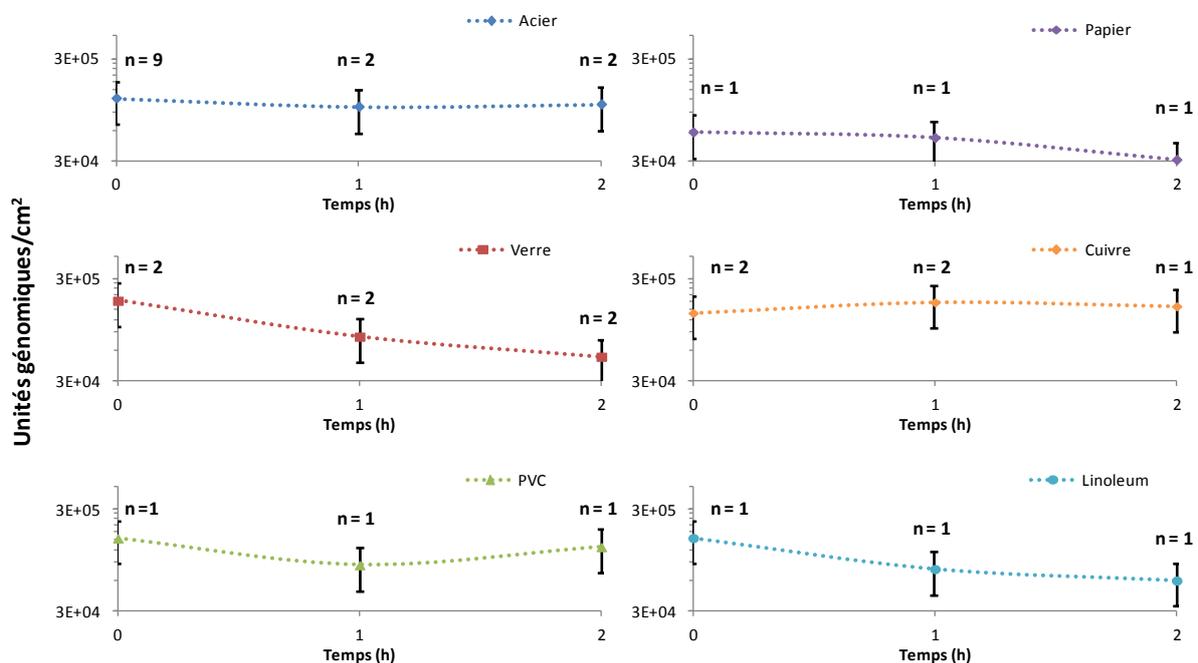


Figure 59 Evolution de la charge virale totale déposée sur les matériaux par aérobiocontamination à 50% d'HR et 21°C. Les barres représentent l'incertitude sur la reproductibilité de l'aérobiocontamination

L'extraction des virus au cours du temps ne semble pas varier significativement. La quantité moyenne extraite des matériaux après une heure est de $(9,6 \pm 3,5) \times 10^4$ unités génomiques/cm² (IC 95%) et après 2 heures de $(9,0 \pm 4,1) \times 10^4$ unités génomiques/cm² (IC 95%). Ces résultats semblent montrer que la quantité de virus extraite ne varie pas même après 2 heures. Il est également possible de dire que le génome viral n'est pas dégradé.

I.2.B Contamination des matériaux par dépôt de gouttelettes

La charge virale totale déposée sur les matériaux, contaminés selon le protocole de contamination par dépôt de gouttelettes, est suivie sur 24h. Pour cela, 5 coupons d'un matériau (t_{0h} , t_{2h} , t_{4h} , t_{8h} et t_{24h}) sont contaminés avec un seul aliquote. Les coupons sont conservés de 2h à 24h à 50% d'humidité relative et à 21°C. Les résultats sont présentés par la Figure 60 et Figure 61.

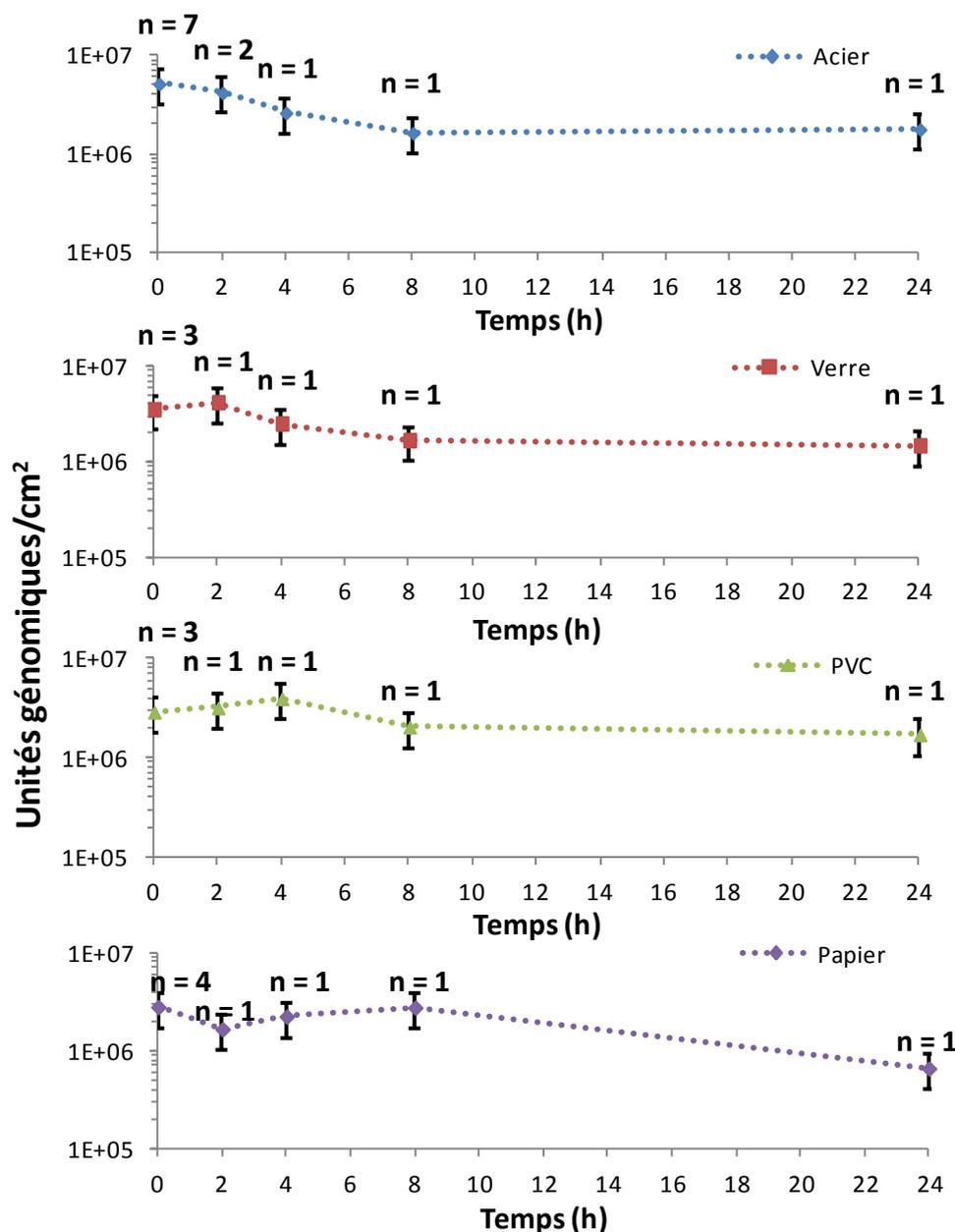


Figure 60 Evolution de la charge virale totale déposée sur l'acier, le verre, le PVC et le papier par dépôt de gouttelettes. Ambiance à 50% d'HR et 21°C. Les barres représentent l'incertitude sur la reproductibilité de la contamination

La quantité de virus extraite au cours du temps sur l'acier, le verre, le PVC et le papier ne diminue pas de façon significative au cours du temps. Pour ces matériaux la concentration moyenne est de $(1,4 \pm 0,5) \times 10^6$ unités génomiques/cm² (n=4, IC 95%) à 24h (Figure 60).

A l'inverse sur le cuivre et le linoléum une décroissance significative de la charge virale totale mesurée est observée dès 2 heures avec 9×10^5 et 3×10^5 unités génomiques/cm² pour le cuivre et le linoléum (Figure 61).

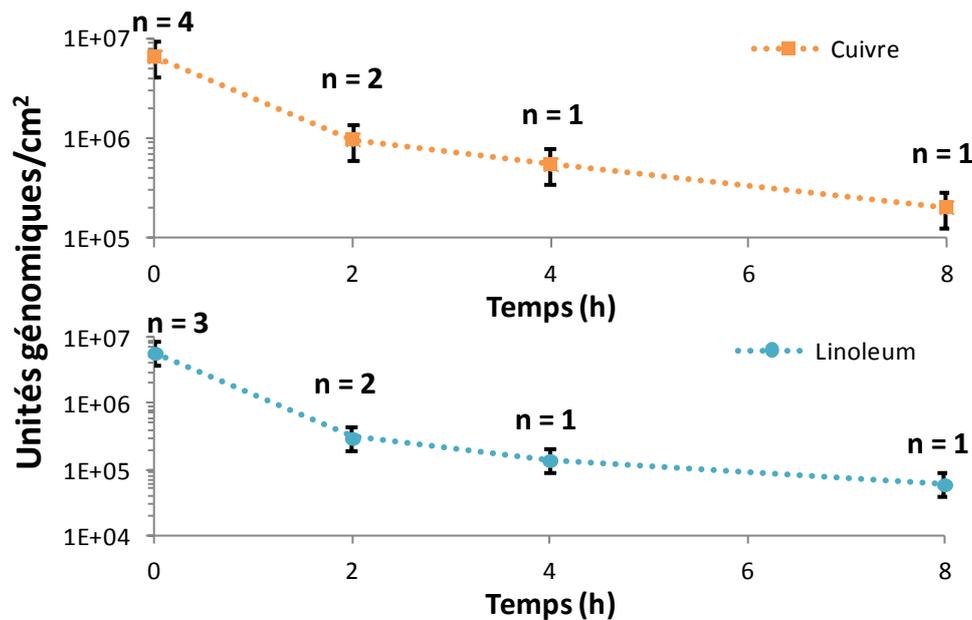


Figure 61 Evolution de la charge virale totale déposée sur le cuivre et le linoléum par dépôt de gouttelettes. Ambiance à 50% d'HR et 21°C. Les barres représentent l'incertitude sur la reproductibilité de la contamination

Le Tableau 10 présente les décroissances en unités génomiques en Log₁₀ après un temps de contact. La perte de Log₁₀ a été calculée selon la formule suivante:

$$\text{Réduction de Log}_{10} = \log \frac{C_0}{C_N}$$

La valeur C₀ correspond à la quantité d'unités génomiques/cm² extraite de chaque matériau à t₀ décrite précédemment pour les deux techniques (Chapitre IV : I.1). Cela permet d'évaluer la perte de génome lié uniquement au contact avec le support.

Tableau 10 Réduction du génome viral en Log₁₀ après un temps de contact

	Surface	t_{1h}	t_{2h}	t_{4h}	t_{8h}	t_{24h}
Contamination par dépôt de gouttelettes	Acier	-	0,1	0,3	0,5	0,5
	Verre	-	-0,1	0,1	0,3	0,4
	PVC	-	0,0	-0,1	0,2	0,2
	Papier	-	0,2	0,1	0,0	0,6
	Cuivre	-	0,8	1,1	1,5	-
	Linoleum	-	1,3	1,6	2,0	-
Aérobiocontamination	Acier	0,1	0,1	-	-	-
	Verre	0,4	0,5	-	-	-
	PVC	0,3	0,1	-	-	-
	Papier	0,1	0,3	-	-	-
	Cuivre	-0,1	-0,1	-	-	-
	Linoleum	0,3	0,4	-	-	-

Dans nos conditions expérimentales pour la contamination par aérosol, la perte de génome initiale est importante (> à 1 log) par rapport à la contamination théorique. Cependant, une fois sur le support contaminé, la décroissance n'excède pas 0,6 log en 2 heures.

Dans le cas de la contamination par dépôt de gouttelettes, la perte initiale ne dépasse pas 1 log quelque soit le matériau. Cependant, après deux heures de contact une perte supérieure à 1 log est observée pour le linoléum et le cuivre. En revanche sur les autres supports, la perte reste inférieure ou égale à 1 log (Tableau 10).

Le phénomène observé sur le cuivre et le linoleum dans le cas d'un dépôt liquide ne s'observe pas après un dépôt aérosol.

II SURVIE DU VIRUS A LA SURFACE DES MATERIAUX

Les résultats précédents montrent que la nature de la surface semble capable d'influencer la persistance du virus. L'intégrité du génome viral paraît affecté par le contact de certaines surfaces dans le cas d'un dépôt de gouttelettes. Au-delà de la persistance du génome viral, il est nécessaire d'évaluer la capacité du virus à conserver son pouvoir infectieux sur les supports. Pour cela, le pouvoir infectieux des virus est quantifié immédiatement après contamination par dépôt de gouttelettes et aérobiocontamination (t_0). La quantification à t_0 permet de mesurer l'impact du mode de contamination en fonction de la nature du support, et le suivi de l'infectiosité d'évaluer le rôle des supports sur la conservation du pouvoir infectieux.

II.1 ETUDE DE LA CHARGE VIRALE INFECTIEUSE INITIALE SUR LES MATERIAUX

II.1.A Aérobiocontamination

La Figure 62 présente les résultats d'infectiosité du virus sur le matériau après 1 min d'aérobiocontamination. L'extraction et l'analyse par VPA immédiatement après contamination (t_0) permet de déterminer la charge virale infectieuse en PFU déposée sur les matériaux par l'aérobiocontamination.

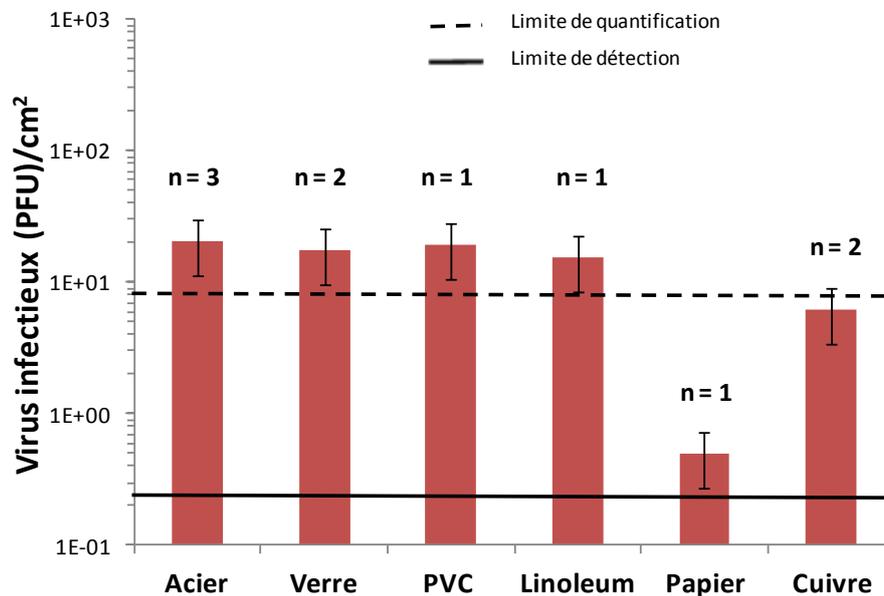


Figure 62 Quantité de virus infectieux après aérobiocontamination sur les matériaux. Les barres d'incertitudes représentent la reproductibilité de l'aérobiocontamination.

Les quantités extraites de virus infectieux sont proches de la limite de quantification de la technique par VPA. Celle-ci est estimée à 8 PFU/cm².

Les quantités de virus infectieux sur les matériaux sont similaires pour l'acier, le verre, le PVC et le linoleum (Figure 62). L'infectiosité sur le cuivre semble plus faible et sous la limite de quantification. Le papier présente également une quantité en dessous de la limite de quantification et proche de la limite de détection.

Pour l'acier, le verre, le PVC et le linoleum, la quantité moyenne de virus infectieux déposée est de (18 ± 2) PFU/cm² (IC 95%). Sur le cuivre et le papier les quantités en dessous de la limite de quantification sont respectivement de 6 et 1 PFU/cm².

Les résultats montrent que le dépôt par aérobiocontamination sur le papier et le cuivre affecte davantage la survie des virus. Les ratio $R_{(I/T)}$ sont calculé en utilisant les données de quantification sur les virus infectieux (en utilisant les valeurs sous la limite de quantification) et le génome total. Les calculs montrent pour le cuivre et le papier des ratio $R_{(I/T)}$ inférieurs ou égaux à 1 log à celui du support de référence l'acier (Tableau 11).

Tableau 11 Ratio de survie du virus Influenza à t_0 après aérobiocontamination

à t_0	Acier	Verre	PVC	Linoleum	Papier	Cuivre
$R_{(virus\ infectieux/virus\ total)}$	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	$<10^{-6}$	$<10^{-5}$

II.1.B Contamination par dépôt de gouttelettes

Les matériaux sont contaminés selon la procédure d'aérobiocontamination décrite I.4.A. La quantité de virus infectieux sur les matériaux après contamination par dépôt de gouttelettes est présentée par la Figure 63.

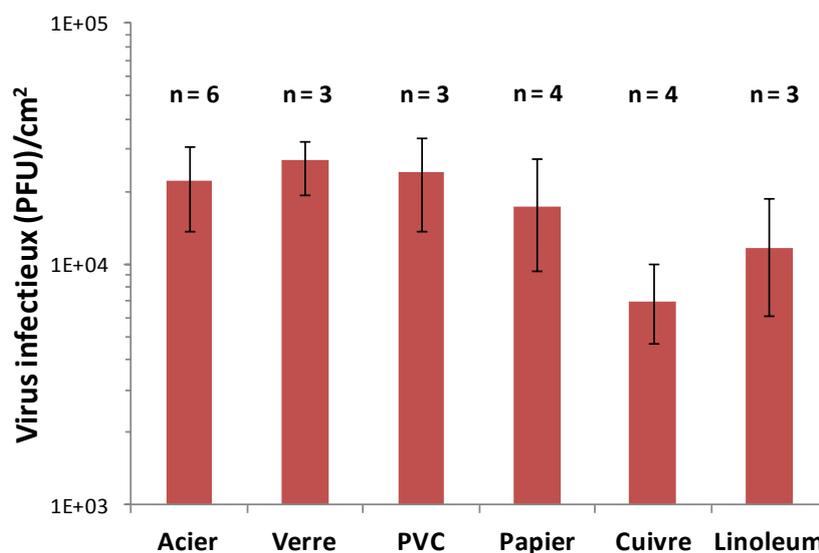


Figure 63 Quantité de virus infectieux après contamination par dépôt de gouttelettes sur les matériaux. Les barres d'incertitudes représentent des min-max.

Les résultats montrent que l'infectiosité sur les 6 matériaux est similaire. Cependant, sur le cuivre la viabilité du virus semble tendre vers une perte d'infectiosité mais elle reste non significative au vu de l'erreur liée à la contamination. La contamination en virus infectieux sur les matériaux est estimée à $(1,8 \pm 0,6) \times 10^4$ PFU/cm² (IC 95%).

Le calcul des ratio $R_{(I/T)}$ pour chaque matériau montre également des ratio dans le même log (10^{-3}). Les barres d'incertitudes montrent également qu'il n'existe pas de différence significative entre les matériaux, ce qui implique pas de différence de survie significative (Figure 64).

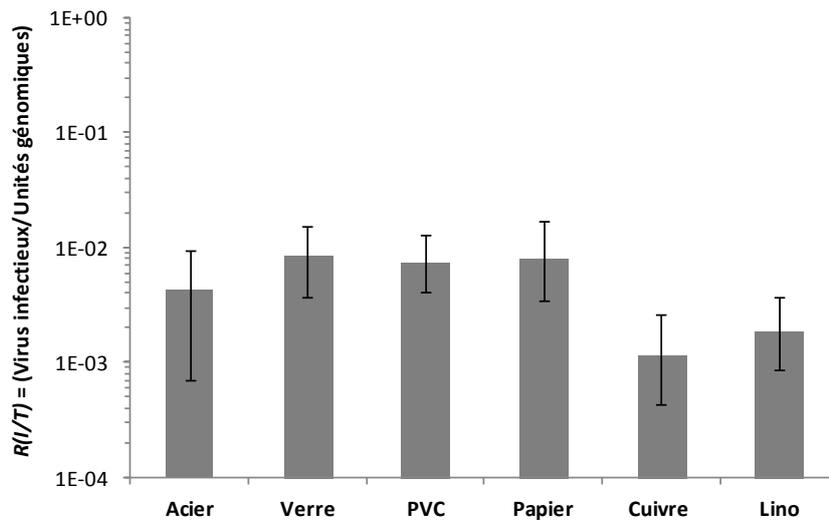


Figure 64 $R_{(I/T)}$ à après contamination par dépôt de gouttelettes sur les matériaux. Les barres d'incertitudes correspondent à des min-max.

II.2 ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA CHARGE TOTALE SURFACIQUE

II.2.A Aérobiocontamination

L'évolution de l'infectiosité après aérobiocontamination a été réalisée sur 2 heures. Un suivi qualitatif de la survie du virus sur les supports a été effectué compte tenu des limites de quantifications. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 Evolution de la survie du virus Influenza sur les supports après aérobiocontamination à 21°C et HR à 50%

	t_{0h}	t_{1h}	t_{2h}
	PFU/cm ²		
Acier	20	6	0,6
Verre	18	3	2
PVC	19	3	0,6
Papier	1	0,25	-
Cuivre	6	0,6	-
Linoleum	16	3	3

XX Quantité au-dessus de la limite de quantification à 8 PFU/cm², **XX** Quantité en dessous de la limite de quantification à 8 PFU/cm², - Quantité en dessous de la limite de détection

Après deux heures de contact avec les supports le virus influenza reste détectable sur les 4 matériaux qui présentent à t_0 la charge infectieuse la plus importante. En revanche, sur le papier et le cuivre aucune infectiosité n'est plus observée.

Parmi les matériaux testés, le papier et le cuivre semblent capables de réduire l'infectiosité du virus Influenza immédiatement après contact.

II.2.B Contamination par dépôt de gouttelettes

L'évolution de l'infectiosité après une contamination par voie liquide a été suivie pendant 24h pour les matériaux suivant: acier, verre, PVC et papier et jusqu'à 8 heures pour le cuivre et le linoléum (Figure 65).

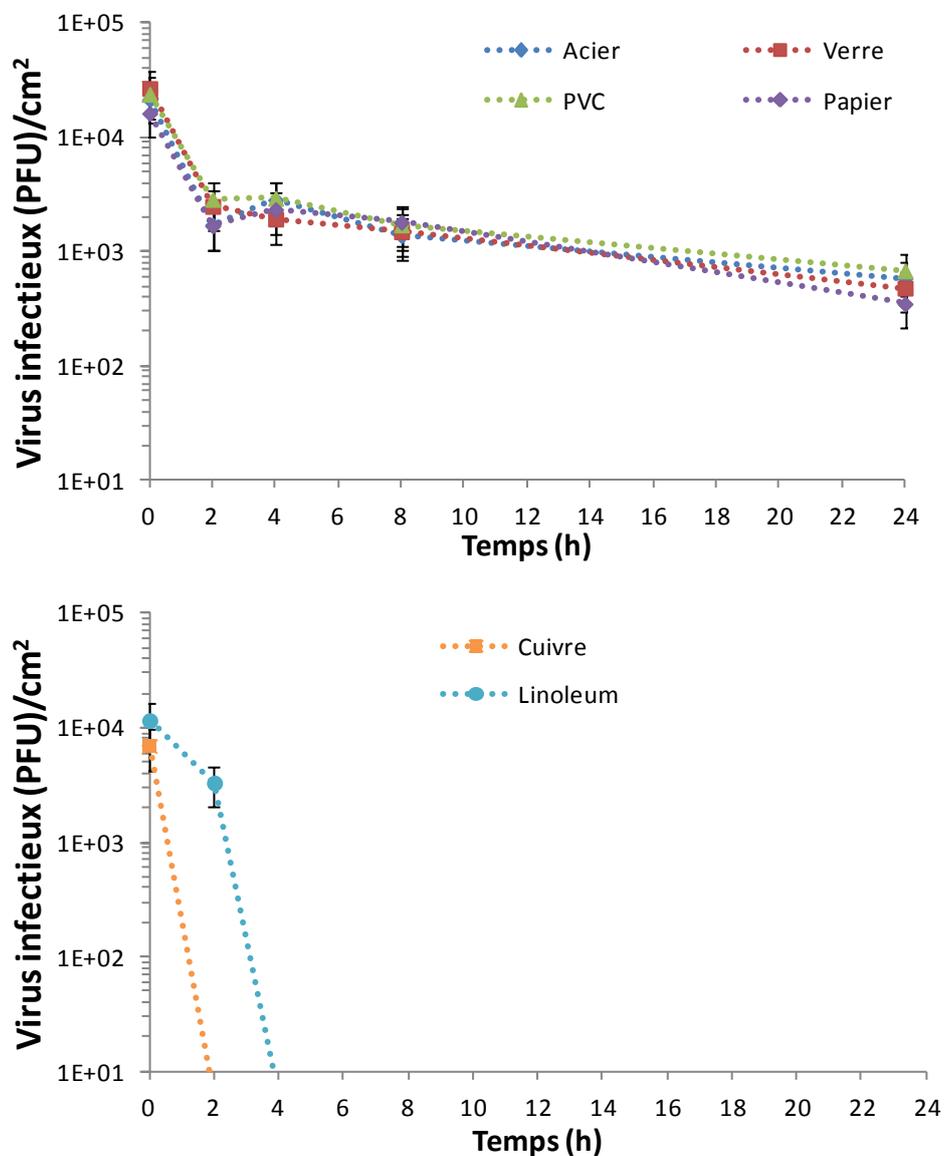


Figure 65 Evolution de la survie du virus Influenza sur les supports après une contamination par voie liquide à 21°C et HR à 50%. Les barres d'erreurs représentent l'incertitude sur la reproductibilité de la contamination.

Les résultats de survie présentent deux catégories de matériaux. Les matériaux qui après 24h présentent toujours une infectiosité et les matériaux qui après 4h ne présentent plus d'infectiosité détectable.

L'acier, le verre, le PVC et le papier sont les matériaux sur lesquels le virus conserve en partie son infectiosité après 24h de contact. Sur ces matériaux l'infectiosité décroît dans les premières heures de contact d'environ un log et atteint $(5\pm 1)\times 10^2$ PFU/cm² (n=4, IC 95%) en 24h soit 10% des virus infectieux présents initialement.

Sur le cuivre et le linoléum la survie du virus décroît beaucoup plus rapidement. Après 2h sur le cuivre et après 4h sur le linoléum 99% de virus infectieux présent initialement ne sont plus infectieux.

CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE

Le virus Influenza, responsable d'un grand nombre d'infections respiratoires chaque année, est le modèle viral retenu dans le cadre de cette étude. La récurrence, le taux d'incidence élevé et la mortalité liée aux épidémies de grippe, représentent des enjeux majeurs de santé publique et un impact économique non négligeable. En dépit de ces aspects, les mécanismes ainsi que les modes de transmission restent à ce jour peu étudiés. Si la contamination des surfaces par un individu malade est désormais prouvée, en dehors de rares études expérimentales, la propension des supports à inhiber la transmission des virus reste très peu documentée. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'évaluer les matériaux et produits de construction sur cette problématique.

Dans le but de reproduire une contamination de support, ce travail s'est appuyé sur une démarche expérimentale. Afin d'être le plus proche possible de la réalité, une suspension virale a été produite dans un substitut salivaire se rapprochant de la composition saline de la salive (Gal *et al.*, 2001). La suspension virale est constituée sous la forme d'un "pool", et est conservée congelée pour garantir la reproductibilité du matériel biologique durant l'étude.

La composition du substitut salivaire peut affecter l'infectiosité du virus sur les matériaux et présenter des résultats différents de ceux de la littérature. En effet, les travaux recensés dans la partie bibliographique montrent presque exclusivement des essais de persistance sur les matériaux avec un milieu de culture comme solution.

Les émissions oropharyngées qui véhiculent les virus Influenza s'inscrivent dans un domaine de taille étendu, allant de l'aérosol inférieur au micromètre jusqu'aux gouttelettes millimétriques. Ainsi, nous avons utilisé deux modes de contamination permettant de reproduire une émission oropharyngée proche de la réalité : une contamination par dépôt de gouttelettes et une aérobiocontamination.

La contamination par dépôt de gouttelettes simule le dépôt de particules suffisamment grosses pour atteindre une surface sous l'effet de la pesanteur. Cette catégorie de particules a été mise en évidence par des observations expérimentales lors d'émissions oropharyngées (Duguid, 1946; Loudon et Roberts, 1967; Chao *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009). Afin de reproduire ces particules, des gouttelettes de suspension virale ont été déposées directement à la surface des matériaux. Le dépôt direct est communément employé dans la littérature. Cependant les volumes déposés sont souvent beaucoup plus importants et peuvent être dans certaines études, étalés sur la surface. Ces conditions sont peu représentatives d'une contamination réelle. Bean *et al.* en 1982 ont déposé et étalé 0,1 mL de virus dans du milieu de culture (Bean *et al.*, 1982). Afin de se rapprocher au plus près de la réalité dans les essais de la thèse, le volume déposé correspondait à une particule sphérique dont le diamètre est retrouvé dans les émissions oropharyngées (CHAPITRE I :II.1).

Les gouttelettes ainsi déposées étaient mises à sécher directement sur le support. La présence de sels dans la composition du substitut salivaire a pu augmenter le temps de séchage des gouttelettes (Wang *et al.*, 2013). Le temps pendant lequel les gouttelettes sur le support restent liquide peut éventuellement favoriser les échanges par diffusion avec le matériau.

L'aérobiocontamination permet de simuler la contamination d'une surface par un aérosol viral. La littérature fait mention d'aérosols inférieurs au micromètre émis par les activités respiratoires (Gerone *et al.*, 1966; Fairchild et Stampfer, 1987; Papineni et Rosenthal, 1997; Morawska *et al.*, 2009). Ce dernier mode de contamination a nécessité la mise au point d'un outil spécifique d'aérobiocontamination. A notre connaissance, il n'existe aucun dispositif expérimental ayant pour objectif la contamination de surfaces par un aérosol viral dans le but d'évaluer des matériaux de construction. La plupart du temps, les études de contamination de surfaces sont réalisées en milieu liquide : une suspension virale calibrée dans son milieu de culture est mise en contact avec la surface (Bean *et al.*, 1982; Dublineau *et al.*, 2011; Greatorex *et al.*, 2011).

L'étude de la distribution en taille des aérosols produits a été réalisée à l'aide d'un impacteur basse pression à détection électrique (ELPI). Cet appareil a permis de mesurer aussi bien des particules ultrafines que des particules de l'ordre du micromètre. Les profils granulométriques en nombre montraient qu'une étude particulière de l'aérosol ne permettait pas de déterminer la gamme de taille du virus en aérosol. Ces observations concordent avec celles de (Hogan *et al.*, 2005) qui ont montré pour deux phages bactériens, MS2 et T3, que les granulométries obtenues après aérosolisation de la suspension virale sont les mêmes en présence ou non du virus.

La granulométrie du virus Influenza en aérosol a été mise en évidence par des mesures complémentaires. La présence de génome viral et de virus infectieux a été détectée par PCRq et VPA pour des granulométries allant de 0,04 à 5 μm , avec deux modes à 0,25 et 0,75 μm .

A l'issue de la caractérisation granulométrique de l'aérosol viral nous avons quantifié l'infectiosité du virus après passage en aérosol. L'infectiosité de l'aérosol viral a été définie par des prélèvements en milieu liquide à l'aide d'un bio-collecteur SKC. Le virus reste infectieux en aérosol, cependant une perte a été observée par rapport à la suspension virale. Nous avons recherché la cause de la perte d'infectiosité. Un essai a permis de mettre en évidence que le fonctionnement du nébuliseur n'était pas responsable de la perte d'infectiosité. La perte d'infectiosité n'est pas à imputer à la collecte. En effet des travaux ont montré que le bio-collecteur SKC n'induisait pas de perte d'infectiosité du virus Influenza, lorsqu'il était collecté pendant 5 min en PBS additionné de calcium et magnésium (Fabian *et al.*, 2009). Enfin, les conditions appliquées au volume d'homogénéisation (humidité relative inférieures à 50%, et température de 20°C) étaient favorables à la conservation du pouvoir infectieux du virus Influenza (Edward *et al.*, 1943; Loosli *et al.*, 1943; Hemmes *et al.*, 1960; Harper, 1961; Hood, 1963). Ces conditions sont d'ailleurs favorables à la plupart des virus enveloppés (Verreault *et al.*, 2008).

Ces résultats ont montré que la perte d'infectiosité n'a pas été causée par le fonctionnement du nébuliseur, ni par la collecte et les conditions environnementales. Ainsi, il est possible de supposer que la perte d'infectiosité a été causée par le passage en aérosol.

En effet, lors du passage en aérosol, les virus peuvent faire l'objet de dommages liés à :

- des tensions de surfaces lorsqu'ils se trouvent à la surface des particules (Yang et Marr, 2012);
- des contraintes de cisaillement (Yang et Marr, 2012);
- un réarrangement de conformation causé par l'hydrophobicité (Yang et Marr, 2012).

De plus, l'évaporation d'une particule liquide en aérosol jusqu'à obtention d'un résidu sec concentre les composés non évaporables tels que les sels (Verreault *et al.*, 2008). Ce phénomène est décrit par (Israeli *et al.*, 1994) sur des cellules lyophilisées. Ils attribuent ainsi l'effet létal à la concentration des constituants liquidiens entourant la particule lors de l'évaporation. Par analogie avec un virus, la présence des sels dans la suspension de nébulisation entraîne une perte d'infectiosité par une altération fonctionnelle de l'enveloppe lipidique du virus (Yang et Marr, 2012).

Aérobiocontamination des matériaux

A partir de l'aérosol infectieux, des contaminations d'un matériau de référence (l'acier inoxydable A 304) ont été réalisées à l'aide d'un impacteur Andersen mono-étage. Les résultats ont montré que le temps (1 à 10 min) et le mode de contamination par impaction ne semblaient pas entraîner de perte d'infectiosité sur le matériau de référence. Par comparaison avec une souche bactérienne, le virus Influenza semble mieux résister au phénomène d'impaction que *Pseudomonas fluorescens*. En effet, la souche bactérienne après 2 min d'impaction perdait en cultivabilité (Robine, 1999).

Au travers d'observations au microscope électronique à balayage des matériaux préalablement contaminés, il est apparu qu'un temps d'impaction trop long entraînait la formation d'importants monticules de sels. Les virus déposés dans les couches supérieures de ces monticules n'étant probablement pas en contact avec le support, nous avons limité ce biais en réalisant des contaminations plus courtes. Cependant, une réduction du temps d'impaction a entraîné également une diminution de la quantité de virus déposés sur le support. Ainsi, les quantités de virus infectieux déposés se rapprochaient des limites de quantification (8 PFU/cm²).

La mise au point de la procédure d'aérobiocontamination a permis de réaliser des essais sur des matériaux de construction choisis pour leurs usages et leur capacité à être un vecteur de contamination dans les environnements intérieurs.

Cette procédure d'aérobiocontamination par impaction a permis de contaminer de façon homogène et reproductible les matériaux, en termes d'unités génomiques déposées. Nous avons constaté que la nature des matériaux ne semblait pas influencer l'extraction des virus. De plus, aucun accroissement des forces d'adhésion spécifiques avec les supports n'a été observé après un temps de contact plus long. Aucune décroissance de la charge virale totale n'a été constatée après 2 heures de contact.

A l'inverse, le type et la nature des matériaux ont semblé influencer l'infectiosité du virus après contamination. Le cuivre et le papier ont affecté l'infectiosité du virus immédiatement après dépôts. Ces résultats ne peuvent être confrontés à la littérature en raison de l'absence de travaux sur la contamination d'une surface par un aérosol.

Contamination des matériaux par dépôt de gouttelettes

Des contaminations par dépôt goutte ont été réalisées avec une suspension virale semblable à celle utilisée pour l'aérobiocontamination. Sur le matériau de référence, le dépôt de gouttelettes a permis également de réaliser des contaminations homogènes et reproductibles en terme d'unités génomiques déposées. Le protocole d'extraction a permis une collecte régulière. Aucune variation significative de la quantité génomique n'a été observée après dépôt et extraction. En 2011, des travaux ont étudié l'évolution du génome du virus H1N1 (PR8) sur les supports (Greatorex *et al.*, 2011). Les auteurs ont pu observer des variations entre les différents matériaux. En effet, des pertes de génomes supérieures à 1 log ont été observées sur certains polymères plastiques et surfaces en bois. A l'inverse certaines surfaces comme le verre ou l'acier inoxydable n'ont pas entraîné de perte de génomes. Les résultats des travaux de thèse sont donc concordants. Cependant, il est important de noter que le protocole expérimental de notre étude et celui de Greatorex *et al.* sont extrêmement différents en termes de technique d'extraction, de milieu de dépôt et de temps d'analyse. Le suivi de l'évolution du génome viral a montré que, dans nos conditions expérimentales, le génome du virus est détérioré lorsqu'il est en contact avec une surface en cuivre ou avec le linoléum. Les travaux de Greatorex *et al.* ont également mis en évidence une dégradation du génome viral sur une surface en bois de pin.

Les propriétés physico-chimiques des matériaux peuvent être responsables de la décroissance du génome observée sur le cuivre et le linoléum. Le cuivre est connu pour ces propriétés bactéricides mais également virucides (Noyce *et al.*, 2007). Les ions cuivriques sont capables de désorganiser le génome en formant des liaisons au sein et entre les brins d'ARN (Noyce *et al.*, 2007).

Le linoléum possède également des propriétés spécifiques (Yli-Pirilä *et al.*, 2009). L'oxydation de l'huile de lin qui entre dans sa composition, lui confère des propriétés abiotiques grâce aux Composés Organiques Volatils (COV) dégagés. Le revêtement utilisé pour ces essais a été identifié par le laboratoire Pollem du CSTB comme émissif en COV. Ainsi, les deux matériaux via les ions Cu^{2+} et les COV semblent capables d'agir directement sur le génome du virus mais uniquement dans une matrice liquide (dépôt par voie liquide).

Nos travaux sur le suivi de l'infectiosité du virus ont donc montré que le cuivre et le linoléum entraînaient une décroissance rapide de l'infectiosité.

Sur le linoléum, la diminution d'infectiosité est cohérente avec les pertes en génomes observées par mesure PCRq. Après 4h, près de 99% des unités génomiques ne sont plus détectables. Le mécanisme en lien avec la perte d'infectiosité semble toucher directement le génome viral.

Dans le cas du cuivre, la perte en unités génomiques ($\approx 90\%$) après 2h est inférieure à la décroissance de l'infectiosité. Ainsi, il existe probablement deux mécanismes d'inactivation du virus. Le premier qui affecte la structure (enveloppe et paroi) du virus et un second qui agirait sur le génome.

Sur les matériaux acier, verre, PVC et papier, nous avons une perte d'infectiosité dans les premières heures de contact. Nous pouvons supposer que cette perte est liée à la phase de séchage de la gouttelette. En effet, le même phénomène a été observé lors du passage en aérosol.

Nous n'avons pas observé d'influence de la porosité des matériaux. Après 24h, l'infectiosité est la même sur le papier et sur l'acier inoxydable. Pourtant, les premiers travaux sur la persistance du virus Influenza ont décrit l'importance de la rugosité sur la persistance du virus (Bean *et al.*, en 1982). Les supports de type fibreux comme le tissu et le papier ont limité la survie du virus influenza à quelques heures. Cependant lors de cette étude, aucun aspect de l'extraction des virus n'a été abordé. En effet, la quantification plus faible de l'infectiosité a pu être liée à des difficultés d'extraction du virus.

A l'inverse en 2013, les travaux de Coulliette *et al.* ont montré que l'infectiosité du virus Influenza sur des coupons de masque N95 diminuait de seulement 0,97 log après 6 jours. Les auteurs ont également souligné l'importance des souches utilisées en expliquant que la souche la plus récente utilisée dans leur étude avait subi des réarrangements génétiques au fil des épidémies et avait donc acquis une plus grande résistance (Coulliette *et al.*, 2013).

Etude complémentaire

Une étude complémentaire de l'hydrophobicité des matériaux a montré que l'hydrophobicité influençait la survie des virus déposés en aérosol sur les matériaux (Figure 66).

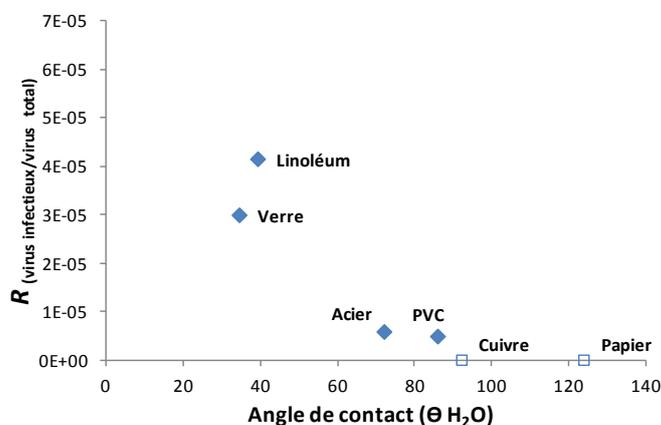


Figure 66 Ratio de survie du virus Influenza à t_2 après aérobiocontamination en fonction de l'hydrophobicité des matériaux, Aucune survie détectée

Il semblerait que plus le matériau est hydrophobe plus la survie diminue. Cependant, si nous observons le cas du cuivre, son hydrophobicité n'est pas très différente de l'acier et du PVC, pourtant aucune survie n'est plus détectable sur ce matériau. Ce résultat confirme l'importance du mécanisme en lien avec les caractéristiques physico-chimiques du cuivre.

Dans le cas d'une contamination par voie liquide, la survie du virus sur les matériaux ne semble pas liée à l'hydrophobicité du support. Le papier, qui possède l'hydrophobicité la plus importante, présente une survie élevée avec un ratio proche de 10^{-3} .

En conclusion, nos travaux ont montré que le virus Influenza conservait son infectiosité sur les surfaces testées à l'exception des surfaces de cuivre et de linoléum qui possèdent des propriétés physico-chimiques particulières.

Les résultats tendent à prouver que, passé le temps de séchage, l'infectiosité du virus est conservée. Le Tableau 13 ci-dessous permet de résumer les effets des matériaux après 2h de contact.

Tableau 13 Influence des matériaux à 2h, (++) effet important, (+) effet, (-) pas d'effet; R(I/T): (+) dégradation structure membranaire, (?) dégradation membranaire et/ou génomique

A t=2h matériaux	Unités génomiques		Infectieux		R _(I/T)	
	Aérosol	Liquide	Aérosol	Liquide	Aérosol	Liquide
Acier	-	-	-	+	-	+
Verre	-	-	-	+	-	+
PVC	-	-	-	+	-	+
Papier	-	-	+	+	+	+
Linoléum	-	+	-	++	-	?
Cuivre	-	+	+	++	+	?

L'ensemble de ces résultats constitue des éléments pour la compréhension des mécanismes de la transmission des viroses respiratoires. Ils permettent de mieux appréhender le poids que pourrait avoir les fomites dans la diffusion des maladies.

Le fait que les virus soient capables de rester infectieux sur certains matériaux pendant au moins 24h dans nos conditions expérimentales montre que les surfaces jouent un rôle non négligeable dans la diffusion de la grippe.

CONCLUSION

L'objectif de ce travail de thèse consistait à étudier la propension des matériaux et produits de construction à inhiber la transmission des virus.

Dans ce contexte, ce travail visait à reproduire un aérosol viral pour simuler une contamination par des émissions aéropharyngées. Dans ce but, un aérosol de virus Influenza a été produit à partir d'un substitut salivaire. La granulométrie de cet aérosol a été étudiée. Cette étude a permis la mise en évidence d'un décalage entre la distribution granulométrique de l'aérosol salin et celle des particules virales.

Ces résultats ont aidé à la définition des différents paramètres d'impaction. En outre, il a été possible de définir dans nos conditions expérimentales, que le virus aérosolisé s'inscrivait dans le domaine de taille des émissions respiratoires (inférieur à 2 μm).

Les travaux d'aérobiocontamination sur les supports ont montré les difficultés à reproduire la contamination d'une surface par un aérosol. En effet, des compromis entre la quantité de matériel viral essentiel à la détection et l'approche réaliste de l'étude, ont été nécessaires à la réalisation de la contamination des supports. En parallèle, une méthodologie de contamination décrite dans la littérature a été mise en œuvre. Cependant, il a été indispensable d'adapter la taille des gouttelettes afin de s'inscrire dans le domaine de taille de particules sédimentables.

Une approche analytique complémentaire a permis le suivi de la charge virale totale, ainsi que celui de la charge infectieuse. L'originalité de ce travail réside dans ces approches expérimentales, qui n'avaient jamais été appliquées auparavant.

Au travers des différentes analyses, un certain nombre de constatations et d'observations ont pu être mis en évidence :

- Le virus était capable de conserver une part de son infectiosité après une aérosolisation artificielle.
- Le suivi des charges virales a mis en évidence la capacité de certains matériaux, tels que le cuivre et le linoléum à affecter le génome viral. Ce phénomène semble dépendre du mode de contamination. En effet, sur ces mêmes matériaux, et après une aérobiocontamination aucune décroissance n'a été observée.
- La dégradation du génome impacte logiquement l'infectiosité. Néanmoins, certains matériaux affecteraient uniquement le pouvoir infectieux du virus.
- Dans le cas de l'aérocontamination, le cuivre et le papier ont montré leur influence sur l'infectiosité. La littérature mentionne les propriétés du cuivre et l'influence de la porosité du papier. Ce travail a permis d'enrichir ces connaissances dans le cadre d'une contamination par un aérosol. Certains matériaux permettent de préserver l'infectiosité pendant au moins 24h.

Ces travaux de thèse ont enrichi les connaissances sur le rôle des surfaces comme vecteur de la contamination virale. En effet, les propriétés de certains matériaux semblent limiter la

transmission du virus en réduisant son infectiosité. Il a également été constaté un phénomène nouveau lié au mode de contamination et à l'état d'hydratation du virus sur le support. Ces informations apportent des informations complémentaires pour la gestion sanitaire du virus de la grippe.

Dans la continuité de ce travail il serait intéressant de tester de nouveaux matériaux, et en parallèle d'approfondir les connaissances sur les interactions entre les virus et les matériaux afin d'identifier quels sont les mécanismes spécifiques mis en œuvre lors de la perte d'infectiosité.

Une étude avec d'autres modèles viraux pourrait être également envisagée pour déterminer un comportement spécifique des virus enveloppés et le comparer aux virus non enveloppés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abad, F. X., R. M. Pinto, et al.** (1994). "Survival of enteric viruses on environmental fomites." Appl. Environ. Microbiol. **60**(10): 3704-3710.
- Abed, Y. and G. Boivin** (2006). "Treatment of respiratory virus infections." Antiviral Research **70**(2): 1.
- Abrahi, S.** (2011). Surfaces à mouillabilité modulable. Thèse. Cergy Pontoise, Cergy Pontoise.
- Ansari, A., V. S. Springthorpe, et al.** (1991). "Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14." J Clin Microbio **29**(10): 2115-2119.
- Baron, P. A. and K. Willeke** (1993). "Aerosol measurement, principles techniques and applications." Ed. by Willeke K. and Baron P.A.
- Bean, B., B. M. Moor, et al.** (1982). "Survival of Influenza Viruses on Environmental Surfaces." The Journal of Infectious Diseases **146**(1): 47-51.
- Beby-Defaux, A., G. Giraudeau, et al.** (2003). "La grippe humaine : aspects virologiques, épidémiologie et diagnostic virologique." Influenza: virological aspects, epidemiology and virological diagnosis. Médecine et Maladies Infectieuses **33**(3): 134.
- Bitton, G.** (1975). "Adsorption of viruses onto surfaces in soil and water." Water Research **9**(5-6): 473.
- Boone, S. and C. Gerba** (2010). "The Prevalence of Human Parainfluenza Virus 1 on Indoor Office Fomites." Food and Environmental Virology **2**(1): 41-46.
- Boone, S. A. and C. P. Gerba** (2005). "The occurrence of influenza A virus on household and day care center fomites." Journal of Infection **51**(2): 103-109.
- Boone, S. A. and C. P. Gerba** (2007). "Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease." Appl. Environ. Microbiol. **73**(6): 1687-1696.
- Brady, M. T., J. Evans, et al.** (1990). "Survival and disinfection of parainfluenza viruses on environmental surfaces." American Journal of Infection Control **18**(1): 18.
- Brankston, G., L. Gitterman, et al.** (2007). "Transmission of influenza A in human beings." The Lancet Infectious Diseases **7**(4): 257-265.
- Brown, J. C.** (2001). "Virology." Encyclopedia of Life Sciences.
- Büchen-Osmond, C.** (2003). "Taxonomy and Classification of Viruses." Manual of Clinical Microbiology **2**: 1217-1226.
- Buckland, F. E. and D. A. J. Tyrrell** (1962). "Loss of Infectivity on Drying Various Viruses." Nature **195**(4846): 1063.
- Casanova, L. M., S. Jeon, et al.** (2010). "Effects of Air Temperature and Relative Humidity on Coronavirus Survival on Surfaces." Appl. Environ. Microbiol. **76**(9): 2712-2717.
- CDC** (1996). "Guideline for isolation precautions in hospitals Part II. Recommendations for isolation precautions in hospitals." American Journal of Infection Control **24**(1): 32.
- CDC** (2007). "Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings."

- Chao, C. Y. H., M. P. Wan, et al.** (2009). "Characterization of expiration air jets and droplet size distributions immediately at the mouth opening." Journal of Aerosol Science **40**(2): 122.
- Chattopadhyay, S. and R. W. Puls** (1999). "Adsorption of Bacteriophages on Clay Minerals." Environmental Science & Technology **33**(20): 3609.
- Coulliette, A. D., K. A. Perry, et al.** (2013). "Persistence of the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus on N95 Respirators." Applied and Environmental Microbiology **79**(7): 2148-2155.
- Dublineau, A., C. Batéjat, et al.** (2011). "Persistence of the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus in Water and on Non-Porous Surface." PLoS ONE **6**(11): e28043.
- Duguid, J. P.** (1946). "The size and duration of air-carriage of respiratory droplets and droplet-nuclei." The Journal of Hygiene **4**: 471-480.
- Edward, D., W. Elford, et al.** (1943). "Studies on air-borne virus infections I. Experimental technique and preliminary observations on influenza and infectious ectromelia." The Journal of Hygiene **43**(1): 1-10.
- Edward, D. F.** (1941). "RESISTANCE OF INFLUENZA VIRUS TO DRYING AND ITS DEMONSTRATION ON DUST." The Lancet **238**(6170): 664.
- Edwards, D. A., Jonathan C. Man, et al.** (2004). "Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols." Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 17383-17388.
- Fabian, P., J. J. McDevitt, et al.** (2008). "Influenza virus in human exhaled breath: an observational study." PLoS One **3**(7): e2691.
- Fabian, P., J. J. McDevitt, et al.** (2009). "Airborne influenza virus detection with four aerosol samplers using molecular and infectivity assays: considerations for a new infectious virus aerosol sampler." Indoor Air **19**(5): 433-441.
- Fairchild, C. I. and J. F. Stampfer** (1987). "Particle Concentration in Exhaled Breath." American Industrial Hygiene Association Journal **48**(11): 948-949.
- Fiegel, J., R. Clarke, et al.** (2006). "Airborne infectious disease and the suppression of pulmonary bioaerosols." Drug Discovery Today **11**(1-2): 51.
- Fleury, H. J. A.** (2002). Virologie Humaine, MASSON.
- Fodor, E., G. G. Brownlee, et al.** (2002). Influenza virus replication. Perspectives in Medical Virology, Elsevier. **Volume 7**: 1.
- Freytmuth, F.** (2001). Grippe et Infection virales des voies aériennes supérieures, ELSEVIER.
- Gal, J.-Y., Y. Fovet, et al.** (2001). "About a synthetic saliva for in vitro studies." Talanta **53**(6): 1103.
- Gerba, C.** (1984). "Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces." Adv Appl Microbiol. **30**: 133-168.
- Gerba, C. P., S. M. Goyal, et al.** (1980). "Type and strain dependence of enterovirus adsorption to activated sludge, soils and estuarine sediments." Water Research **14**(9): 1197.
- Gerone, P. J., R. B. Couch, et al.** (1966). "Assessment of experimental and natural viral aerosols." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **30**(3): 576-588.
- Greatorex, J. S., P. Digard, et al.** (2011). "Survival of Influenza A(H1N1) on Materials Found in Households: Implications for Infection Control." PLoS ONE **6**(11): e27932.

- Hall, C. B., R. G. Douglas, et al.** (1980). "Possible Transmission by Fomites of Respiratory Syncytial Virus." Journal of Infectious Diseases **141**(1): 98-102.
- Harper, G. J.** (1961). "Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses." Journal of Hygiene **59**(4): 479-486.
- Hemmes, J. H., K. C. Winkler, et al.** (1960). "Virus Survival as a Seasonal Factor in Influenza and Poliomyelitis." Nature **188**(4748): 430.
- Hersen, G., S. Moularat, et al.** (2008). "Impact of Health on Particle Size of Exhaled Respiratory Aerosols: Case-control Study." CLEAN - Soil, Air, Water **36**(7): 572-577.
- Hogan, C. J., E. M. Kettleson, et al.** (2005). "Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles." Journal of Applied Microbiology **99**(6): 1422-1434.
- Holmgren, H., E. Ljungström, et al.** (2010). "Size distribution of exhaled particles in the range from 0.01 to 2.0 [µ]m." Journal of Aerosol Science **41**(5): 439-446.
- Hood, A. M.** (1963). "Infectivity of influenza virus aerosols." Journal of Hygiene **61**(3): 331-335.
- Howie, R., M. J. Alfa, et al.** (2008). "Survival of enveloped and non-enveloped viruses on surfaces compared with other micro-organisms and impact of suboptimal disinfectant exposure." Journal of Hospital Infection **69**(4): 368.
- Hudson, J. B., M. Sharma, et al.** (2007). "Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare." Journal of Hospital Infection **66**(1): 40-45.
- Huynh, Kerriane N., Brian G. Oliver, et al.** (2008). "A New Method for Sampling and Detection of Exhaled Respiratory Virus Aerosols." Clinical Infectious Diseases **46**(1): 93-95.
- Israeli, E., J. Gitelman, et al.** (1994). Death Mechanisms in Microbial Bioaerosols with Special Reference to the Freeze-Dried Analog. Atmospheric Microbial Aerosols. B. Lighthart and A. Mohr, Springer US: 166-191.
- Jin, Y. and M. Flury** (2002). Fate and transport of viruses in porous media. Advances in Agronomy, Academic Press. **77**: 39.
- Julian, T. R., J. O. Leckie, et al.** (2010). "Virus transfer between fingerpads and fomites." Journal of Applied Microbiology. **109**(6):1868-74.
- Kuiken, T. and J. K. Taubenberger** (2008). "Pathology of human influenza revisited." Vaccine **26**(Supplement 4): D59.
- Lin, X., T. A. Reponen, et al.** (1999). "Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating liquid." Atmospheric Environment **33**(26): 4291-4298.
- Lindsley, W. G., F. M. Blachere, et al.** (2010). "Measurements of Airborne Influenza Virus in Aerosol Particles from Human Coughs." PLoS ONE **5**(11): e15100.
- Loosli, C. G., H. M. Lemon, et al.** (1943). "Experimental Airborne Influenza Infection. I. Influence of Humidity on Survival of Virus in Air." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **531**: 205-206.
- Loudon, R. G. and R. M. Roberts** (1967). "Droplet Expulsion From The Respiratory Tract." The American review of respiratory disease **95**(3): 435-442.
- Macias, A. E., A. de la Torre, et al.** (2009). "Controlling the novel A (H1N1) influenza virus: don't touch your face!" Journal of Hospital Infection **73**(3): 280.

- Mahl, M. C. and C. Sadler** (1975). "Virus survival on inanimate surfaces." Can J Microbiol **21**(6): 819-823.
- Manugerra, J.-C. and C. Hannoun** (1999). Grippe et Autres Viroses Respiratoires, Institut Pasteur.
- Mc Kenna, R. and L. Faulkner** (2001). "Virus Structure." Encyclopedia of Life Sciences.
- Meyer-Lueckel, H. and A. M. Kielbassa** (2002). "Utilisation de succédanés salivaires chez les patients souffrant de xérostomie." Rev Mens Suisse Odontostomatol **112**(10): 1048-1059.
- Milton, D. K., M. P. Fabian, et al.** (2013). "Influenza Virus Aerosols in Human Exhaled Breath: Particle Size, Culturability, and Effect of Surgical Masks." PLoS Pathog **9**(3): e1003205.
- Minor, P. D.** (2007). "Viruses." Encyclopedia of Life Sciences.
- Moletta, M.** (2005). Caractérisation de la diversité microbienne aéroportée des biogaz. Montpellier, Université des sciences et techniques de Montpellier 2.
- Morawska, L., G. R. Johnson, et al.** (2009). "Size distribution and sites of origin of droplets expelled from the human respiratory tract during expiratory activities." Journal of Aerosol Science **40**(3): 256.
- Mukherjee, D. V., B. Cohen, et al.** (2012). "Survival of influenza virus on hands and fomites in community and laboratory settings." American Journal of Infection Control(0).
- Nayak, D. P., R. A. Balogun, et al.** (2009). "Influenza virus morphogenesis and budding." Virus Research **143**(2): 147.
- Neumann, G. and Y. Kawaoka** (2007). "Influenza Viruses." Encyclopedia of Life Sciences.
- Nicholson, K. G., J. M. Wood, et al.** (2003). "Influenza." The Lancet **362**(9397): 1733.
- Noyce, J. O., H. Michels, et al.** (2007). "Inactivation of Influenza A Virus on Copper versus Stainless Steel Surfaces." Appl. Environ. Microbiol. **73**(8): 2748-2750.
- Pancic, F., D. C. Carpentier, et al.** (1980). "Role of Infectious Secretions in the Transmission of Rhinovirus." J. Clin. Microbiol. **12**(4): 567-571.
- Papineni, R. S. and F. S. Rosenthal** (1997). "The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects." Journal of Aerosol Medicine **10**(2): 105-116.
- Pappas, D. E., J. O. Hendley, et al.** (2010). "Respiratory Viral RNA on Toys in Pediatric Office Waiting Rooms." The Pediatric Infectious Disease Journal **29**(2): 102-104
110.1097/INF.1090b1013e3181b1096e1482.
- Reed, S. E.** (1975). "An investigation of the possible transmission of rhinovirus colds through indirect contact." Journal of Hygiene **75**(2): 249-258.
- Robine, E.** (1999). Fixation et survie des aérosols bactériens sur les surfaces., University of Paris XII. **PhD-Thesis**.
- Sattar, S., Y. Karim, et al.** (1987). "Survival of human rhinovirus type 14 dried onto nonporous inanimate surfaces: effect of relative humidity and suspending medium." Can J Microbiol. **33**(9): 802-806.
- Sharma, P. K. and K. Hanumantha Rao** (2002). "Analysis of different approaches for evaluation of surface energy of microbial cells by contact angle goniometry." Advances in Colloid and Interface Science **98**(3): 341-463.

- Sizun, J., M. W. N. Yu, et al.** (2000). "Survival of human coronaviruses 229E and OC43 in suspension and after drying on surfaces: a possible source of hospital-acquired infections." Journal of Hospital Infection **46**(1): 55-60.
- Stelzer-Braid, S., B. G. Oliver, et al.** (2009). "Exhalation of respiratory viruses by breathing, coughing, and talking." Journal of Medical Virology **81**(9): 1674-1679.
- Tanaka, H., M. Sakurai, et al.** (2009). "Inactivation of Influenza Virus by Ozone Gas." IHI Engineering Review **42**(2): 108-111.
- Tang, J. W., Y. Li, et al.** (2006). "Factors involved in the aerosol transmission of infection and control of ventilation in healthcare premises." Journal of Hospital Infection **64**(2): 100.
- Tiwari, A., D. P. Patnayak, et al.** (2006). "Survival of Two Avian Respiratory Viruses on Porous and Nonporous Surfaces." Avian diseases **50**(2): 284-287.
- Tseng, C.-C. and C.-S. Li** (2007). "Inactivation of Viruses on Surfaces by Ultraviolet Germicidal Irradiation." Journal of Occupational and Environmental Hygiene **4**(6): 400-405.
- Tseng, C. and C. Li** (2008). "Inactivation of surface viruses by gaseous ozone." Journal of environmental health **70**(10): 56-62.
- Vasickova, P., I. Pavlik, et al.** (2010). "Issues Concerning Survival of Viruses on Surfaces." Food and Environmental Virology.
- Verreault, D., S. Moineau, et al.** (2008). "Methods for Sampling of Airborne Viruses." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **72**(3): 413-444.
- Wang, B.-B., X.-D. Wang, et al.** (2013). "Molecular Dynamics Simulations on Evaporation of Droplets with Dissolved Salts." Entropy **15**(4): 1232-1246.
- Weber, T. P. and N. I. Stilianakis** (2008). "Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: A critical review." Journal of Infection **57**(5): 1-13.
- Weber, T. P. and N. I. Stilianakis** (2008 B). "A Note on the Inactivation of Influenza A Viruses By Solar Radiation, Relative Humidity and Temperature." Photochemistry and Photobiology **84**(6): 1601-1602.
- Wei, Z., M. McEvoy, et al.** (2007). "Biophysical characterization of influenza virus subpopulations using field flow fractionation and multiangle light scattering: Correlation of particle counts, size distribution and infectivity." Journal of Virological Methods **144**(1-2): 122-132.
- Xie, X., Y. Li, et al.** (2007). "How far droplets can move in indoor environments – revisiting the Wells evaporation–falling curve." Indoor Air **17**(3): 211-225.
- Xie, X., Y. Li, et al.** (2009). "Exhaled droplets due to talking and coughing." Journal of The Royal Society Interface **6**(Suppl 6): S703-S714.
- Yang, S., G. W. Lee, et al.** (2007). "The size and concentration of droplets generated by coughing in human subjects." Journal of aerosol medicine **20**(4): 484-494.
- Yang, W. and L. C. Marr** (2012). "Mechanisms by Which Ambient Humidity May Affect Viruses in Aerosols." Applied and Environmental Microbiology **78**(19): 6781-6788.
- Yli-Pirilä, T., J. Kusnetsov, et al.** (2009). "Survival of amoebae on building materials." Indoor Air **19**(2): 113-121.

Zhuang, J. and Y. Jin (2003). "Virus retention and transport through Al-oxide coated sand columns: effects of ionic strength and composition." Journal of Contaminant Hydrology **60**(3-4): 193.

ETUDE DE L'ETAT DE SURFACES DES MATERIAUX : MESURE DE L'ANGLE DE CONTACT

Une goutte de liquide déposée sur une surface plane s'étale plus ou moins en fonction de la mouillabilité. L'angle formé entre la tangente au point de contact et la surface est appelé angle solide et est noté θ . Il rend compte de l'aptitude du liquide à s'étaler sur la surface. La relation de Young permet de décrire les interactions entre les forces de cohésion et d'adhésion des trois phases en présence (solvant, air, surface) et mesure l'énergie de surface.

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta \quad (1)$$

θ = angle de contact

γ_{sl} = Energie interfaciale solide/liquide

γ_{sv} = Energie surface du liquide

γ_{lv} = Energie interfaciale liquide/surface

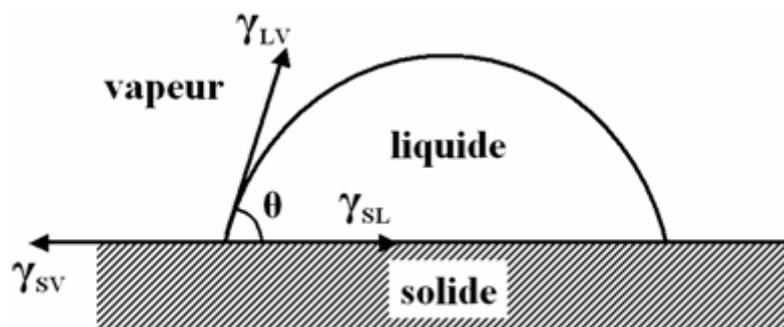


Figure 67 Goutte d'un liquide en équilibre

L'équation (1) considère une surface homogène chimiquement et lisse. Toutefois les surfaces réelles ne sont jamais parfaitement homogènes et planes. Sur ces surfaces présentant une rugosité et/ ou des hétérogénéités chimiques, il est nécessaire de mesurer un angle de contact apparent qui diffère de celui obtenu sur la surface idéale. Cet angle varie entre deux extrêmes un angle d'avancée θ_a et un angle dit de reculée θ_r . Pour un matériau rugueux et/ou présentant des hétérogénéités chimiques, les angles d'avancée et de reculée sont considérés comme les seuls paramètres de mouillage intrinsèque de la surface (Abrakhi, 2011). Pour cela la méthode de l'inclinaison est utilisée. Elle consiste à incliner à vitesse constante la surface sur laquelle est déposée la goutte.

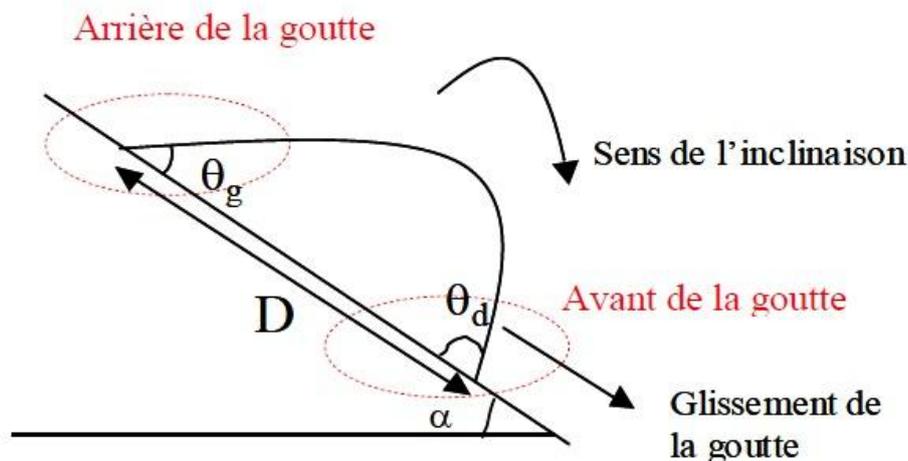


Figure 68 Schéma d'une goutte de liquide lors de l'inclinaison du plateau.(Abrakhi, 2011)

Les angles d'avancée θ_a et de reculée θ_r sont alors mesurés respectivement à l'angle avant et à l'arrière de la goutte dans le sens du glissement, juste avant que la goutte glisse. Cette caractérisation a été effectuée avec trois liquides (un liquide polaire, l'eau, un liquide apolaire, le diiodométhane, un liquide de polarité intermédiaire, le formamide) pour les matériaux présentés précédemment. Ces liquides présentent des tensions superficielles différentes référencées dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Valeurs des tensions superficielles des liquides utilisées ainsi que leurs composantes

liquide	γ_L (mN.m ⁻¹)	γ_L^{LW} (mN.m ⁻¹)	γ_L^{AB} (mN.m ⁻¹)	γ_L^+ (mN.m ⁻¹)	γ_L^- (mN.m ⁻¹)
Eau	72,8	21,8	51	25,5	25,5
Formamide	58	39	19	2,28	39,6
Diiodométhane	50,8	50,8	0	0	0

Le modèle utilisé avec ces liquides est celui de : von OSS *et al.*. Il permet de décomposer les énergies interfaciales en différentes composantes liées aux interactions de Lifshitz van der Waals ainsi qu'aux interactions acides-bases de Lewis (Sharma et Hanumantha Rao, 2002).

L'appareil utilisé pour obtenir les propriétés de mouillage des supports est un DSA10 Mk2. Celui-ci est composé d'un système d'éclairage, d'un plateau de taille 10 cm × 10 cm sur lequel est fixé l'échantillon, d'une caméra vidéo enregistrant l'image de la goutte en fonction d'une seringue motorisée permettant de déposer des gouttes calibrées. Le logiciel Drope Shape Analysis Profil permet d'acquérir et de traiter des séquences vidéo et des images.