

## AOI ECCOREV 2013

**Projet EVASION : Emission de Virus entériques de l'homme dans l'Atmosphère à proximité des Sites de traitement ou de réutilisation des eaux usées.**

**Responsable du projet :** Dominique Courault, CR1 UMR 1114 EMMAH INRA Avignon,

[courault@avignon.inra.fr](mailto:courault@avignon.inra.fr)

soumis sous l'axe 4 : *Ecotechnologie et développement durable*,

### **Contexte de la recherche**

Dans le contexte des changements globaux, pour répondre aux besoins d'eau croissants en irrigation, la réutilisation des eaux usées est une solution intéressante. C'est une pratique importante dans de nombreux pays, mais encore très peu répandue en France (Lazarova et Brissaud, 2007). Différentes études ont en effet montré les risques associés à la présence de pathogènes que ces eaux peuvent contenir (virus généralement entériques (Symonds et al., 2009 ; Petrinca et al., 2009 ; Carducci et al., 2000), bactéries (AFSSA, 2008), protozoaires et œufs d'helminthes (Salgot et al., 2003)). Les virus sont incriminés dans diverses maladies dont des gastro-entérites (Le Guyader et al., 2010 ; Da Silva et al., 2007), les hépatites A (Villar et al., 2007) et E (Simonet et Gantzer, 2006b), et la poliomyélite (Simonet et Gantzer, 2006a). Les virus entériques sont généralement très stables dans l'environnement (Mattison and Bidawid, 2009). L'application d'eaux usées au champ peut aboutir à une contamination des cultures comme des eaux souterraines, voire à une aérosolisation des virus pour les irrigations par aspersion (Metcalf et al. 1995). Carducci et al. (2000) ont souligné également le risque non négligeable pour les personnes travaillant à proximité des stations d'épuration (STEP) d'inhaler des pathogènes. Quelques études portant sur le suivi sanitaire d'ouvriers travaillant dans des stations d'épuration (STEP) montrent que plus de 50% d'entre eux présentent des anti-corps à l'hépatite A (Brugha et al, 1998 ; Arvanitidou et al., 2004) et recommandent des vaccinations obligatoires. Les risques sont conditionnés par la présence ou non d'un traitement des eaux avant recyclage et par la nature et le degré du traitement (Simonet et Gantzer, 2006).

Des indicateurs de qualité ont été définis reposant principalement sur des analyses sur les matières en suspension, les concentrations en coliformes fécaux et nématodes intestinaux. Il est important de noter qu'il n'y pas d'analyses sur les virus entériques, et aucune estimation sur les bioaérosols qui peuvent être émis par aspersion. Il faut souligner que les virus peuvent être contaminants à très faible dose, 10 virus suffisent souvent à rendre malade une personne alors qu'il faut souvent au minimum 10000 voire 100000 bactéries pour provoquer une maladie. Si le devenir de ces virus dans l'environnement était difficile à suivre jusqu'à présent, les développements méthodologiques des 15 dernières années, notamment ceux en biologie moléculaire, ont ouvert de nouvelles perspectives

## Objectif :

Face à ce contexte, de nombreuses questions se posent parmi lesquelles :

1. Est-ce que les traitements réglementaires sont adaptés, insuffisants ou excessifs ?
2. Quelle est la pertinence des bio-indicateurs et le mode de suivi de la qualité de l'eau et de l'air environnant (sur la quantité de pathogènes? leur pouvoir infectieux ?)
3. Quels sont les risques de l'aspersion pour les professionnels et les populations proches ?
4. Quel est le devenir des agents pathogènes après apport *in situ* (leur survie en surface (sol, végétaux) et dans l'air ? et l'évolution du caractère infectieux de ces pathogènes ?
5. Quel est le devenir des pathogènes dans le sol et la probabilité d'arriver intact à un aquifère en restant infectieux ?

Notre projet se focalise ici sur la question 3 en s'intéressant plus spécifiquement à la quantification des virus entériques (type hépatite A, rotavirus et Norovirus) qui sont émis dans l'atmosphère, à proximité de sites de traitements des eaux ou de réutilisation des eaux usées. On imagine que les quantités de virus dans l'air seront très faibles, et il est difficile de dire aujourd'hui quel sera le seuil au niveau des concentrations pour pouvoir les détecter, c'est pourquoi une étude préliminaire est nécessaire pour étudier plus particulièrement ce point. Au-delà des aspects méthodologiques, les questions de recherche auxquelles ce projet cherchera à répondre sont les suivantes :

- **Comment se fait le processus d'aérosolisation de virus présents dans les eaux usées à partir de l'aspersion de parcelles agricoles pour différentes surfaces, types d'irrigation et de configurations atmosphériques?**
- **Y-a-t-il des virus qui partent par arrachement à la surface après irrigation et suivant quelle condition de surface et de climat ?**

**L'objectif plus détaillé est donc de mettre au point une méthode de prélèvement de virus dans l'atmosphère** qui permette de dénombrer ces pathogènes dans l'atmosphère et d'évaluer aussi les limites de sensibilité des outils de quantification par biologie moléculaire. Il s'agit donc d'un travail ici essentiellement méthodologique, qui repose sur des expérimentations menées à la fois au champ mais aussi en laboratoire. C'est un projet innovant. Il faut souligner toutefois que notre équipe a déjà participé à des expérimentations portant sur l'estimation des flux bactériens dans l'atmosphère en collaboration avec l'équipe de pathologie de C Morris (INRA Avignon) et EPHYSE Bordeaux (Y Brunet). Nous reprendrons ici certains dispositifs de mesures que nous adapterons pour l'analyse des virus qui sont beaucoup plus petits que les bactéries (de l'ordre de 20-30nm pour les virus entériques contre 1-3µm pour les bactéries).

### Suite prévue pour le projet

Ces travaux permettront de mettre au point une méthode d'échantillonnage et de dénombrement des virus dans l'atmosphère que nous pourrons utiliser sur des parcelles agricoles, et dans l'environnement de STEP, dans un projet de plus grande envergure s'appuyant sur des collaborations établies.

Ce projet s'insère en effet dans un projet plus global s'intéressant à l'ensemble de la problématique de réutilisation d'eaux usées, focalisé sur les pathogènes de l'homme, comprenant une partie portant sur le transfert de l'eau dans le sol jusque dans la nappe, et une partie sur l'évaluation des risques sur la santé, (projet qui sera présenté à l'ANR ECO-TS en 2013 et pour un FUI avec le soutien du pôle risques, en collaboration avec le CEA LETI de Grenoble, AIRPACA, Suez Environnement, l'UMR d'agro-écologie de Dijon, et le LCE AMU).

### **Réalisations prévues - Méthodologie**

Les méthodologies relatives à la caractérisation des aérosols se sont fortement développées ces dernières années (Georgakopoulos et al., 2009). Toutefois la quantification et la caractérisation des bioaérosols restent toujours complexes (Arnold et al. 2006 ; Seinfeld 2004). La difficulté de ces mesures vient aussi du fait qu'il faut garder le caractère viable et potentiellement contaminant au cours des traitements si l'on veut pouvoir définir un indicateur fiable du risque encouru au contact de ces bioaérosols. On distingue classiquement les mesures de concentration ou de densité dans l'air et les mesures de flux qui permettent d'estimer les émissions de micro-organismes dans l'atmosphère (Lighthart et Shaffer, 1994). Ces dernières sont généralement plus difficiles à suivre en continu dans le temps, car elles nécessitent un échantillonnage plus important dans la journée et toujours des mesures indirectes (en différé en laboratoire) pour caractériser les types de micro-organismes présents dans l'atmosphère. Nous avons choisi de travailler dans ce projet en **conditions contrôlées** avec le **Mengovirus murin**, qui est similaire au virus de l'hépatite A, mais inoffensif pour l'homme. Il présente la même structure que les virus entériques les plus communs à savoir, un seul brin d'ARN et pas d'enveloppe. Les dénombrements seront faits par des techniques de biologie moléculaire (RT-q-PCR, mesures à la plateforme de biologie moléculaire de l'INRA d'Avignon) et l'infectiosité dans le laboratoire de virologie de Dijon (en collaboration avec Fabienne Bon).

Divers types de biocollecteurs existent sur le marché (Impacteur liquide, Impacteur solide, échantillonneur basé sur la précipitation électrostatique, Filtre). Une revue de ceux utilisés pour le suivi de virus a été réalisée par Verrault et al, (2008). Très peu d'études reportent des comparaisons de mesures in situ aux alentours de STEP ou de zones irriguées. Il y a donc un véritable challenge à évaluer ces méthodes sur nos sites d'intérêt. **Notre projet évaluera différentes techniques pour estimer les teneurs en virus dans l'atmosphère et caractériser leur infectiosité sur des parcelles expérimentales sur le domaine de l'INRA d'Avignon.**

L'intérêt de travailler sur les parcelles expérimentales de l'INRA, est que celles-ci sont déjà équipées de mesures météorologiques et de flux de surface permettant de suivre les conditions environnementales avec précision et que l'on peut travailler les surfaces librement suivant les facteurs que nous voulons étudier. Nous analyserons ainsi plus spécifiquement le processus de remise en suspension des virus dans l'air suite à l'irrigation. L'irrigation par aspersion d'eaux usées étant soumises à des demandes préfectorales assez strictes, nous travaillerons avec le Mengo virus Murin, sur des mini placettes qui seront couvertes par un dispositif de tunnels, permettant de contrôler tout ce qui entre et sort du système. Ces tunnels ont déjà été utilisés à l'INRA de Grignon, pour suivre la volatilisation de pesticides (Bedos et al, 2002). Le dispositif a été évalué également pour l'étude de la volatilisation d'ammoniac par Loubet et al. (1999). Nous l'utiliserons sur des surfaces se différenciant par leur rugosité, couverture végétale, texture de sol. Nous analyserons le processus d'arrachement à la surface suivant des conditions de vent variable, et pour les techniques d'irrigation les plus couramment rencontrées en région PACA. Nous comparerons différents biocollecteurs (impacteur liquide type impinger, utilisé déjà par l'équipe EMMAH en collaboration avec l'INRA de Bordeaux EPHYSE et la pathologie végétale pour le suivi de flux bactériens (P Amato en postdoc en 2009), et impacteur solide. Il est important de souligner ici la participation dans ce projet de l'équipe CEA du LETI qui mène des recherches sur le développement de balises opérationnelles de contrôle de la qualité de l'air (<http://www.leti.fr/fr/Decouvrez-le-Leti/La-Recherche-au-Leti/Domains-applicatifs/Surveillance-de-l-environnement>), et testera un prototype pas encore évalué avec les virus. Ce prototype est basé sur un système de précipitation électrostatique, et présente l'avantage d'aspirer un grand volume d'air, en injectant en même temps de la vapeur d'eau dans le dispositif de captage pour encapsuler et donc protéger les micro-organismes. Il permet ainsi de collecter tous les pathogènes présents dans l'air et de les récupérer dans un milieu qui les préserve.

Il est important d'associer aux mesures de caractérisation des virus, l'estimation des distributions de taille de particules, car les virus peuvent partir dans l'atmosphère sous différentes forme (isolée, ou en « agrégat », attaché à divers composants, qui peuvent être du sol, des matières organiques ou végétales...) Il y a peu de bibliographie qui a analysé ce point. Nous proposons d'analyser également cette distribution granulométrique grâce aux dispositifs de mesures disponibles au laboratoire LCE, partenaire dans ce projet (Henri Wortham).

Ces mesures doivent conduire à une **hiérarchisation des facteurs importants à prendre en compte pour modéliser le processus d'aérosolisation des virus** et de mettre au point une méthodologie d'échantillonnage de virus dans l'air.

## Description du consortium

### Equipe 1: UMR1114 EMMAH INRA AVIGNON

Nom	fonction	tâches	% dans le projet
<b>Dominique Courault</b>	CR1(HDR)	Coordinatrice projet, mesures micrométéo, modélisation	20
Pierre Renault	DR2	Co-coordonateur projet (mesures inactivation virus, modèle)	15
Line Capowiez	AI	Analyses biologie moléculaire (RT-qPCR), mesures expérim.	25
Guillaume Girardin	Doctorant	Expérimentation labo, mesures extérieures, modélisation	100
Etudiant M2	Master2	Expérimentation parcelles /tunnels,	100
Eric Michel	CR1	Avis expert (transfert nanoparticules)	15
Franck Tison	AI	Mesures physiques, prototypage micrométéo	15
Bruno Jouaud	ITA	Construction prototype dispositif mesures labo	10
François Lafolie	CR1	Expert Analyses labo (zétamètre...)	10

### Equipe 2: UMR1347 Agroécologie, pôle MERS Dijon

Nom	fonction	Tâches	% dans le projet
<b>Fabienne Bon</b>	MC	Virologie, analyses biomol, infectiosité virus	20

### Equipe 3: LCE Université Marseille

Nom	fonction	Tâches	% dans le projet
<b>Henri Wortham</b>	Pr	Instrumentation mesures aérosols	10
Anne Monod	MC	Instrumentation et Réactivité Atmosphérique (labo)	10

### Equipe 4: CEA-LETI Grenoble

Nom	fonction	Tâches	% dans le projet
<b>Jean-Maxime Roux</b>	IR	Construction du bio collecteur d'air, adaptation aux virus et évaluations (mesures extérieur sur sites)	15
Guillaume Delapierre	IR	Avis expert sur les systèmes de collecte et d'analyses pour l'environnement	10

### Equipe 5: AIRPACA Marseille

Nom	fonction	Tâches	% dans le projet
<b>Alexandre Armengault</b>	IR	Coordination scientifique AIRPACA	5
Grégory Gilles	IR	Instrumentation aérosols, qualité de l'air	<10

Signalons de plus la participation de **Suez Environnement** et de **la région PACA** qui soutiennent ce sujet par le financement de la thèse de Guillaume Girardin (participant à 100% à ce projet). **L'entreprise AIRPACA** (<http://www.atmopaca.org/>) est partenaire socio-économique de la thèse région. AIRPACA assure la surveillance de la qualité de l'air de près de 90% de la Région Provence Alpes Côte d'Azur. Jusqu'à présent AIRPACA s'est intéressé essentiellement aux polluants majeurs

(composés chimiques, particules fines...), et ne couvre pas les bioaérosols. Les méthodes développées et évaluées ici en collaboration avec le LETI devraient déboucher sur des capteurs pour des applications opérationnelles qui pourront compléter le réseau d'AIRPACA pour le suivi de la qualité de l'air (projet FUI visé).

## Plan financier

### EMMAH

Analyses en biologie moléculaire (Kits MengoVirus murin)	3000
Frais déplacements tunnels (URM Grignon-Avignon)	1000
Frais de fonctionnement	500
Total EMMAH :	4500€

### LCE

Déplacements instruments de mesures sur Avignon	500€
---	------

### UMR Agroécologie

Analyses microbiologiques (milieu, matériel labo) mise en culture	1000€
---	-------

Total demandé :	6000€
-----------------	-------

## Références citées

- AFSSA 2008. Réutilisation des eaux usées traitées pour l'arrosage ou l'irrigation. Saisine de l'AFSSA n°2001-SA-0075.
- Arnold, D., A. Vargas, G. Cortes, and X. Ortega, 2006: Analysis of the natural radon progeny contribution to radioactive aerosol monitoring in the automatic Spanish surveillance network. *Air Pollution XIV*, 86, 535-544.
- Arvanitidou M., Mamassi P., Vayona A. 2004. Epidemiological evidence for vaccinating wastewater treatment plant workers against hepatitis A and hepatitis B virus. *European Journal of Epidemiology* 19, 259-262.
- Bedos, C., M. F. Rousseau-Djabri, et al. 2002. "Rate of pesticide volatilization from soil: an experimental approach with a wind tunnel system applied to trifluralin." *Atmospheric Environment*, 36(39-40): 5917-5925.
- Brugha R., Heptonstall J., Farrington P., Andren S., Perry K., Parry J., 1998., Risk of Hepatitis A Infection in Sewage Workers. *Occup Environ Med*, vol. 55, n°. 8, 567-569.
- Carducci, A., E. Tozzi, et al. 2000. "Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment." *Water Research* 34(4): 1173-1178.
- Da Silva A.K., Le Saux J.C., Parnaudeau S., Pommepuy M., Elimelech M., Le Guyader F.S. 2007. Evaluation of Removal of Noroviruses during Wastewater Treatment, Using Real-Time Reverse Transcription-PCR: Different Behaviors of Genogroups I and II. *Applied and Environmental Microbiology* 73(24), 7891-7897.
- Georgakopoulos, D.G. et al., 2009. Microbiology and atmospheric processes: biological, physical and chemical characterization of aerosol particles. *Biogeosciences*, 6(4): 721-737.
- Lazarova, V., Brissaud, F., 2007. Intérêt, bénéfices et contraintes de la réutilisation des eaux usées en

- France. *L'eau, l'industrie, les nuisances*, (299), .23–39.
- Le Guyader F.S., Krol J., Ambert-Balay K., Ruvoen-Clouet N., Desaubliaux B., Parnaudeau S., Le Saux J.C., Ponge A., Pothier P., Atmar R.L., Le Pendu J., 2010. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *Journal of Clinical Microbiology* 48(3), 915-920. (doi:10.1128/JCM.01664-09).
- Lighthart, B., and B. T. Shaffer, 1994: Bacterial Flux from Chaparral into the Atmosphere in Midsummer at a High Desert Location. *Atmospheric Environment*, 28, 1267-1274.
- Loubet, B., Cellier, P., Flura, D. and Genermont, S., 1999. An evaluation of the wind-tunnel technique for estimating ammonia volatilization from land: Part 1. Analysis and improvement of accuracy. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 72(1): 71-81.
- Mattison K., Bidawid S., 2009. Analytical Methods for Food and Environmental Viruses. *Food and Environmental Virology*, 107-122.
- Metcalfe T.G., Melnick J.L., Estes M.K., 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology*, 49, 461-87.
- Petrinca A.R., Donia D., Pierangeli A., Gabrieli R., Degener A.M., Bonanni E., Diaco L., Cecchini G., Anastasi P., Divizia M. 2009. Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1608-1617.
- Salgot M., Vergés C., Angelakis A.N., 2003. Risk assessment in wastewater recycling and reuse. *Water Science and Technology: Water Supply* 3(4), 301-309
- Seinfeld, J. H., 2004: Air pollution: A half century of progress. *Aiche Journal*, 50, 1096-1108.
- Simonet J., Gantzer C., 2006a. Inactivation of Poliovirus 1 and F-Specific RNA Phages and Degradation of Their Genomes by UV Irradiation at 254 Nanometers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 7671-7677.
- Simonet J., Gantzer C., 2006b. Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 862-870.
- Verreault D., Moineau S., Duchaine, C., 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(3): 413-444.
- Villar L.M., de Paula V.S., Diniz-Mendes L., Guimaraes F.R., Ferreira F.F.M., Shubo T.C., Miagostovich M.P., Lampe1 E., Gaspar A.M.C. 2007. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Letters in Applied Microbiology* 45, 168-173.

-----  
 CV du porteur

**COURAULT Dominique**  
 (Fr) ; 49 ans

née le 19 Mars 1963 à Auxerre (89)  
 nationalité: française  
 2 enfants

**DIPLOMES**

---

2008	Habilitation à diriger des recherches, spé Sciences, Université Avignon
1994	Mutation à l'INRA d'Avignon en Bioclimatologie, passage CR1
1992-1993	Prise de fonction à l'INRA de Rennes, Evapotranspiration sur bassin versant
Oct 1990	Admission Chargée de Recherches 2 <sup>ème</sup> classe en Bioclimatologie INRA
1990	Post doc CNES projet HAPEX Sahel ORSTOM Bondy /Niger
1989	Thèse Sciences du Sol, Université Paris 6 INAPG Grignon, Télédétection/sols
1986 :	DEA Sciences du Sol Université de Paris 6, INAPG Paris-Grignon.

Distinction: Prix du DEA de Pédologie décerné par l'Association Française pour l'Etude du Sol (1986)

**Activités scientifiques – Evaluation - Encadrements –**

**Thème de Recherche depuis 1993** : Spatialisation des flux d'énergie à l'aide de données de télédétection et de modèles de transferts (SVAT, modèles 1D et 3D). Estimation du microclimat, impact des pratiques agricoles à l'échelle du paysage sur les transferts hydriques. Depuis 2009 : Etude des interactions –paysage-microclimat-flux de micro-organismes dans l'atmosphère.

**Publications** de 1988-2013: 35 dont 17 en 1<sup>er</sup> auteur dans revues à comité de lecture, 83 comm. dans des colloques, 6 chapitres d'ouvrages pédagogiques.

**Expertise** : reviewer pour diverses revues : Int J of Remote Sensing, Remote Sensing of Environment, IEEE, Sensors, Journal of climatology (~8-10/an) expertise scientifique de projets INSU ECCO PNBC, participation à 2 jurys de thèse, 3 comités de thèse

**Encadrement** : 2 thèses (2000-2002, 2012-), 3 post docs (2007-2010), 22 étudiants de 1993-2009 (dont 18, niveaux DEA-DESS- MASTER 2),

**Responsabilités scientifiques** : élue au conseil scientifique du centre INRA d'Avignon de 2004-2007 (suppléante fin 2007-2011)

**Responsable\*** ou Participation à divers projets Hapex Sahel (89-90), ISPRA (91), ECLAT\* (CNRM 95-96), actions COST 79 (96-2000), AIP ECOSPACE \*(96-98), PNTS (92\*-94\*-99-2000-2005\*-2006-2007), PROCOPE\* (2000-2002), PFI (INRA 2001-2002), région PACA-MIP\* (2004-2006), ECCO\_PNBC (2004-2006), TOSCA\*(2007-2008), EC2CO (2007-). FUI Astuce &Tic (2009-2011),FP7 SIRRIMED (2011-2013)[*Responsable du projet Inter région MIP-PACA* 2005-2006, en collaboration avec l'ESAP Toulouse, et les sociétés NOVELTIS Toulouse et le CIRAME Carpentras]

Coordination des mesures micrométéorologiques, aéroportées et biologiques faites de mars à octobre sur 2 années (5 personnes niveau IE, AI, TR+ étudiants), sur le Sud-Ouest (2005), et en Crau Camargue (2006).

Participation à la création du site web de l'UMR EMMAH (co-responsable avec A Bérard des pages scientifique)

Participation au groupe SIG centre Avignon, et au groupe gestions de données de l'URM EMMAH

## PUBLICATIONS

---

**Courault D**, Drobinski P., Brunet Y., Lacarrère P., Talbot C' 2007, Impact of surface heterogeneity on buoyancy driven convective boundary layer in the presence of light winds, *Boundary layer Meteorology.*, 124, 383-403.

Amato P., Leyronas C., **Courault D.**, Morris C. 2010. Plants as sources of micro-organismes for clouds-mechanisms and processes. *Phyllosphère* 2010, 9th Int. Symposium on the Microbiology of Aerial Plant Surfaces, August 14-18, 2010, LaSells Stewart Center, State University, Corvallis, Oregon.

**Courault D**, Seguin B, Olioso A, 2005. Review about estimation of evapotranspiration from remote sensing data: from empirical to numerical modeling approach. *Irrigation and Drainage system*, 19, 223-249.

**Courault**, D., Hadria, R., Ruget, F., Olioso, A., Duchemin, B., Hagolle, O., and Dedieu, G.: Combined use of FORMOSAT-2 images with a crop model for biomass and water monitoring of permanent grassland in Mediterranean region, *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 14, 1731-1744, doi:10.5194/hess-14-1731-2010, 2010.

Ben Sassi, M., J. Dollinger, **P. Renault**, A. Tlili, and A. Berard, 2012: The FungiResp method: An application of the MicroResp (TM) method to assess fungi in microbial communities as soil biological indicators. *Ecological Indicators*, **23**, 482-490.

Tlili, S., E. G. Alvarez, S. Gligorovski, and **H. Wortham**, 2012: Adsorption behavior of two model airborne organic contaminants on wafer surfaces. *Chemical Engineering Journal*, **187**, 239-247.