

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE LILLE 2

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'UNIVERSITE LILLE 2

Inactivation virale par méthodes physiques

Présentée et soutenue par :

Swan FIRQUET

Le 17 décembre 2014

Devant le jury composé de :

Pr. Jean DUBUISSON

Président

Pr. Gilles DUVERLIE

Rapporteur

Pr. Frédéric MORINET

Rapporteur

Pr. Didier HOBER

Directeur de thèse



Université Lille 2
Droit et Santé




Centre Hospitalier Régional
Universitaire de Lille



REMERCIEMENTS

*Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent
du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers
par qui nos âmes sont fleuries.*

Marcel Proust

Je tiens à exprimer ici toute ma gratitude envers les personnes qui ont contribué de près comme de loin à la réalisation de cette thèse. Pour moi, ces trois années de doctorat ont été avant tout une aventure humaine et je profite de ce moment pour en remercier les acteurs.

Dans un premier temps, je tiens à remercier le Pr. Didier HOBER pour m'avoir accordé sa confiance, son temps et son énergie. J'ai eu, grâce à lui, un encadrement exemplaire, des conseils avisés et une vision réaliste de la recherche scientifique. Outre nos discussions scientifiques, j'ai apprécié nos différents débats.

Parce que la recherche scientifique commence par la recherche de fonds, à laquelle participe grandement le Pr. HOBER, je voudrais remercier les financeurs du projet de recherche. Parmi eux, nous avons le Fonds Européen de Développement Régional, la région Nord Pas-de-Calais, l'Université Lille 2 et le CHRU de Lille.

Que serait le nerf de la guerre sans ses soldats ? Dans cette partie, je souhaite remercier toute l'équipe de recherche du laboratoire de virologie EA3610. J'ai toujours eu

de l'enthousiasme à me lever le matin pour aller travailler et je dois cela en grande partie au climat serein et familial qui règne au sein de l'équipe.

Plus particulièrement, je remercie du fond du cœur Famara SANE. Je n'ai jamais rencontré un individu de cet acabit : chaleureux, intéressant, ouvert et j'en passe. J'ai partagé avec lui des moments inestimables d'échanges scientifiques, personnels, sur le monde, les idées ... Son aide m'a été d'un grand secours dans bien des situations. Alors, pour tout cela et plus encore, merci.

Je remercie aussi Delphine LOBERT pour son aide et notamment pour ses réponses à ces fameuses questions « Sais-tu où je peux trouver ceci ou cela ? ». Je sais que cela la fera sourire ; et je profite de ces quelques lignes pour faire l'éloge de sa personnalité, simple et enjouée, qui est un rayon de soleil dans ces terres du Nord.

Tout aussi simple, à penser qu'ils se sont bien trouvés, je remercie Pierre-Emmanuel LOBERT pour tout ce qu'il a fait pour moi. Un fournisseur de cellules hors pair et un expert dans la lecture de plaques, deux qualités qui ont sauvé plusieurs expériences.

Une étude a montré qu'au cours d'une thèse, un moment de doute est rencontré par le doctorant. Je remercie infiniment mon premier directeur de thèse, le Pr. Daniel IZARD d'avoir su trouver la phrase juste pour me remotiver.

Je remercie Mehdi pour son aide et son soutien qui m'ont permis de continuer sereinement l'écriture de mon mémoire.

Je remercie aussi toutes les autres personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire pendant ces trois années et qui ont laissé une empreinte positive dans ma mémoire ; en particulier : Kazali, Ilka, Pr. ROMOND, Angélo, Sophie, Céline, Amélie, Laura, Thomas,

Quentin, Rémi, Orianne, Firas, Alicia, Joëlle, Cindy, Noémie, Anaïs, Khalil, Juliano, Antoine, Cyrielle, Maxime, Aka, Roméo, Darline, Imad, Oussamatou, Pierre ...

J'adresse mes remerciements au Pr. Jean DUBUISSON pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury ainsi que le Pr. Gilles DUVERLIE et le Pr. Frédéric MORINET pour avoir accepté d'être mes rapporteurs.

Je remercie également mes amis qui m'ont apporté un soutien tout au long de ces trois années. Ils ont réussi les temps d'une heure, d'une soirée, d'un week-end à me changer les idées et me permettre de retourner au travail plus léger.

Une mention très spéciale à Kévin qui a su me soutenir jusqu'au bout en me donnant la force chaque matin. Tu as su être le jardinier de mon bonheur.

Enfin ... quel mot terriblement banal pour commencer à exprimer l'indescriptible reconnaissance que je voue à ma famille et mes parents. Vous m'avez tant donné et c'est avec émotion que je vous dis merci ! Merci du fond du cœur. Vous m'avez montré la voie, vous m'avez entouré d'amour et vous avez réussi à me rendre heureux. J'ai tant appris à vos côtés. Merci de m'avoir fait comme je suis. Je vous aime.

A mes parents,
à mon oncle Eric
et à tous ceux qui me sont chers.

RESUME

Les profils de viabilité sur surface, de virus non enveloppés : Murine Minute Virus (MVM), Coxsackievirus B4 (CVB4), Virus Simien 40 (SV40), et de virus enveloppés : virus de grippe A (H1N1), et virus Herpès Simplex de type 1 (HSV-1), ainsi que la résistance à la chaleur et aux ultraviolets C (UVC) de ces virus ont été étudiés.

Pour déterminer la viabilité de MVM, CVB4, H1N1 et HSV-1 sur surface, 50 μ L de suspension virale ont été déposés sur des couvercles de boîtes de Pétri et séchés sous un flux d'air avant d'être récupérés et titrés sur des lignées cellulaires appropriées. Les virus enveloppés ont persisté moins de 5 jours alors que CVB4 et MVM sont restés infectieux pendant plusieurs semaines. Cependant, les cycles répétés de séchage et de remise en suspension ont eu un effet plus virucide sur CVB4 que sur H1N1 et HSV-1. Aucun effet des répétitions de ces cycles n'a été observé sur le titre infectieux du MVM. Quant au séchage, les concentrations initiales d'albumine de sérum bovin, de sérum de veau fœtal et de chlorure de sodium, ont un impact sur la survie de CVB4. Dans un milieu riche en protéines, CVB4 a été plus facilement inactivé par le séchage, alors qu'en présence de chlorure de sodium, le pouvoir virucide du séchage a été réduit. Ces résultats montrent que la résistance des virus vis-à-vis du séchage, n'est pas due à une hétérogénéité de populations virales, mais peut être influencée par la composition du milieu et la concentration des composants.

Nous avons évalué la résistance thermique de MVM, CVB4, H1N1 et HSV-1 contenus dans des gouttelettes. Quatre microlitres de suspension virale ont été déposés sur une surface chauffée et exposés à des températures comprises entre 70 et 130°C pendant 0 à

90min, selon le virus, avant d'être titrés. Clairement, MVM a été plus résistant que H1N1, lui-même plus résistant que HSV-1 et CVB4. Pour la première fois, l'inactivation de particules virales contenues dans des gouttelettes exposées à des températures supérieures à 100°C a été étudiée. Il apparaît que le chauffage peut provoquer un effet plus rapidement virucide que décrit précédemment.

La résistance aux UVc (254nm) de MVM, CVB4, H1N1, HSV-1 et SV40 contenus dans des gouttelettes a été évaluée. Les virus à ADN double brins (HSV-1 et SV40) restaient infectieux après une exposition à 60mJ/cm² d'UVc, tandis que les virus à ARN (H1N1 et CVB4) et un virus à ADN simple brin (MVM) ont été totalement inactivés par une exposition inférieure ou égale à 35mJ/cm² d'UVc. De plus, l'effet des UVc combinés à la chaleur sur la viabilité de MVM a été déterminé. Le titre infectieux de MVM, contenu dans une gouttelette a été totalement inactivé après une exposition à 27mJ/cm² d'UVc. Le chauffage (20s à 100°C) a provoqué une réduction modérée du titre viral de MVM (-1.8 log₁₀TCID₅₀), alors que le chauffage, suivi par une exposition à 17mJ/cm² d'UVc, entraîne une inactivation complète.

En conclusion, nos études montrent que les virus peuvent persister pendant des jours, voire des semaines, sur une surface hydrophobe. Le profil de résistance des virus vis-à-vis du séchage, n'est pas dû à une hétérogénéité de populations virales, comme l'ont montré les résultats obtenus avec CVB4. De plus, dans la mesure où la composition du milieu joue un rôle dans la viabilité des virus exposés au séchage, la persistance des virus devrait être étudiée dans des milieux naturels plutôt que dans des milieux définis. L'impact de temps d'exposition courts à la chaleur sur les virus contenus dans de petits volumes de suspension a été déterminé. La résistance thermique de H1N1 jusqu'à 100°C, supérieure à celle d'HSV-1, un autre virus enveloppé, et à celle de CVB4, un virus non-enveloppé, a été

observée. Une inactivation virale efficace peut être obtenue en combinant une exposition aux UVc et à la chaleur comme le montrent les résultats obtenus avec MVM.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION.....	3
1) Les virus.....	3
a) Classification.....	3
b) Les virus modèles.....	6
c) Les virus enveloppés.....	7
i) L’Herpès Simplex Virus de type 1	
ii) Le virus de la grippe : H1N1	
d) Les virus non-enveloppés.....	9
i) Le Coxsakievirus B4	
ii) Le Virus Simien 40	
iii) Le Murine Minute Virus	
2) La persistance virale.....	13
3) L’inactivation virale	19
a) Moyens chimiques	19
b) Moyens physiques.....	20
i) La chaleur	
ii) Les ultraviolets	
4) Objectifs de l’étude	50

MATERIELS ET METHODES	52
RESULTATS	59
1) Persistance du pouvoir infectieux de virus enveloppés et non-enveloppés déposés sur une surface	59
2) Inactivation rapide de virus contenus dans des gouttelettes appliquées sur une surface chauffée	65
3) Résistance des virus aux UVc et effet de la combinaison UV-chaaleur sur MVM	72
DISCUSSION GENERALE	77
1) Persistance du pouvoir infectieux de virus, enveloppés et non-enveloppés, déposés sur une surface	77
2) Inactivation rapide de virus contenus dans des gouttelettes appliquées sur une surface chauffée	82
3) Résistance des virus aux UVc et effet de la combinaison UVc-chaaleur sur le MVM	87
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	90
BIBLIOGRAPHIE	92
ANNEXES	111

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
µm	micromètre
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
BSA	Albumine Sérique Bovin
Ct	Cycle threshold
CVB4	Coxsackievirus B4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECP	Effet Cytopathique
H1N1	Virus de la grippe A H1N1
HR	Humidité Relative
HSV-1	Herpès Simplex Virus type 1
J	Joule
kb	kilo base
log	logarithme
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney

MEM	Minimum Essential Medium
min	minute
MVM	Murine Minute Virus
NaCl	chlorure de sodium
nm	nanomètre
pb	paire de base
PBS	tampon phosphate salin
PEG	Polyéthylène Glycol
PSMII	Poste de Sécurité Microbiologique de classe II
RT-qPCR	rétrotranscription et réaction en chaîne par polymérase en temps réel
s	seconde
SV40	Virus Simien 40
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCID50	50% Tissue Culture Infective Dose
UV	Ultraviolets
UVc	Ultraviolets C
vs	versus
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire

INTRODUCTION

1) Les virus

a) Classification

Les maladies sont connues depuis plusieurs millénaires, mais ce n'est qu'à partir du milieu du XVI^e siècle, avec Girolamo FRACASTORO (1478-1553), que commencent les premières hypothèses sur des agents infectieux et contagieux invisibles à l'œil nu. A partir de ce moment, plusieurs dates ont marqué l'histoire de la découverte des virus (**figure 1**).

De nos jours, on distingue le virus du virion, comme l'a suggéré Bândae en 1983. Le virion est la forme de transition du virus pour la propagation de ce dernier.

Les virions peuvent être différenciés selon :

- ☉ leurs hôtes, ce qui était la première méthode de classification utilisée.
- ☉ la nature de leur acide nucléique (ADN ou ARN) et son mode d'expression. A noter que les virus ont un génome compris entre 200 (virus satellite du virus de la panachure jaune du riz) et plusieurs centaines de milliers de nucléotides. Par exemple, le bactériophage G (*Bacillus Megaterium* phage G) possède un génome de 670 kpb (Donelli et al., 1975).
- ☉ leur capsid qui répond à une symétrie soit hélicoïdale, soit icosaédrique. Certains virus d'archées se distinguent par leur forme très différente (ovoïdes ou en filaments) (Prangishvili et al., 2006).
- ☉ la présence ou non d'une enveloppe.
- ☉ leur taille qui se situe entre 10 et 400 nanomètres. Le plus petit virus connu est le virus Delta, qui parasite lui-même celui de l'Hépatite B (Gish, 2013). Il ne comporte qu'un

seul gène. L'un des plus gros virus connu est le Mimivirus, avec un diamètre qui atteint 750 nanomètres (Mutsafi et al., 2013). Le plus grand virus connu, le virus Ebola, est une particule filamenteuse pouvant atteindre une longueur de 14µm (Geisbert and Jahrling, 1995).

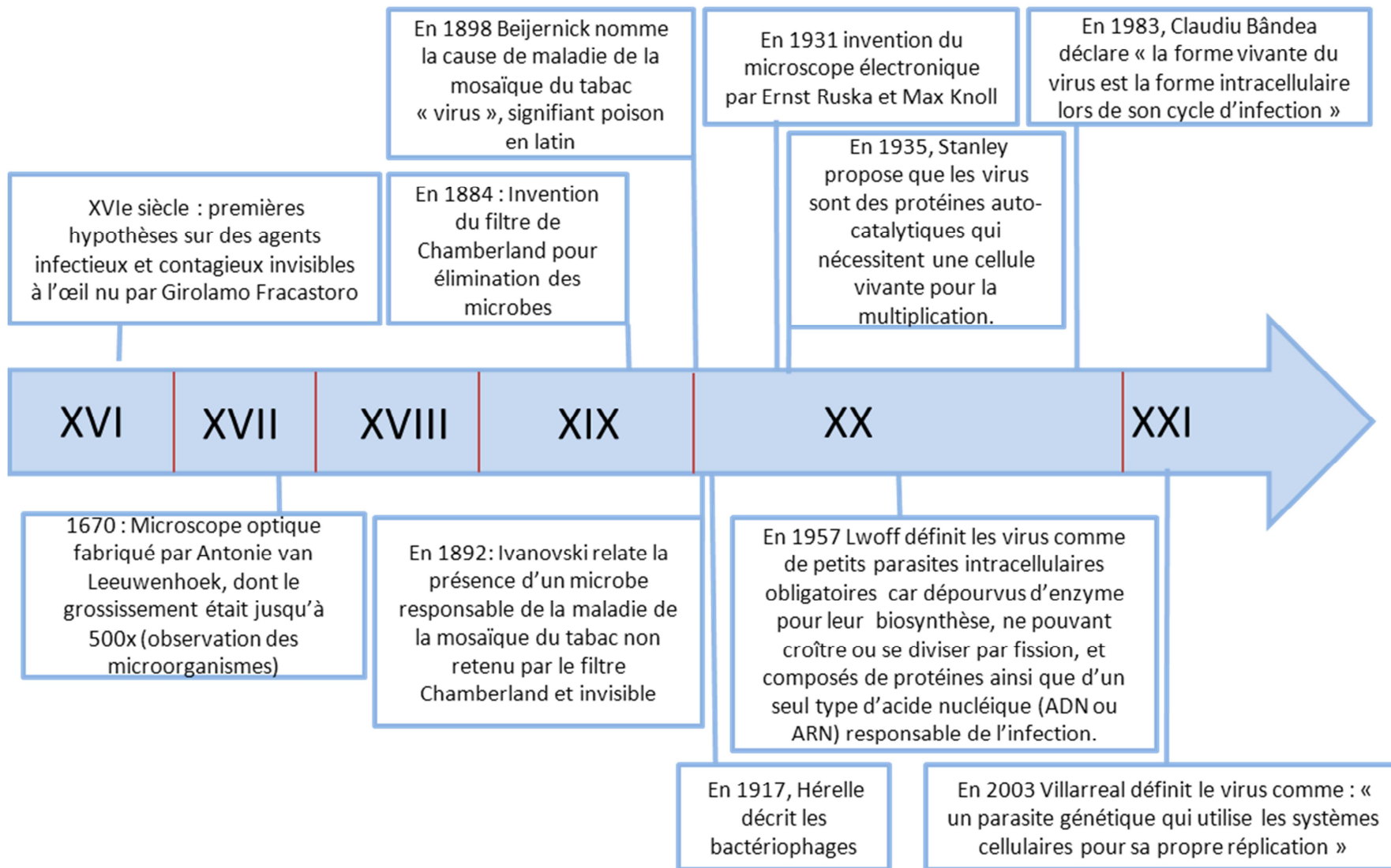


Figure 1 : Chronologie de la découverte des virus

b) Les virus modèles

Dans le but d'étudier l'inactivation virale, plusieurs modèles de virus ont été utilisés au cours de la thèse. Plusieurs critères ont été pris en compte pour le choix des virus : facilité de culture, titre élevé, virus possédé par le laboratoire et/ou virus responsable d'infections nosocomiales. Nous avons ainsi sélectionné les virus enveloppés, l'Herpès Simplex Virus de type 1, le virus de la grippe H1N1, et les virus non-enveloppés, Virus Simien 40, Coxsackievirus B4, Murine Minute Virus.

c) Les virus enveloppés

i) L'Herpès Simplex Virus de type 1

Le HSV-1 (**Figure 2**) est un virus à ADN double brins de la famille des *Herpesviridae* (Huraux JM et al., 2003). HSV-1 est responsable d'infections buccales, ophtalmiques et encéphaliques (Whitley and Roizman, 2001).

<p style="text-align: center;">L'HSV-1</p> <p>Famille : <i>Herpesviridae</i></p> <p>Sous-famille : <i>Alphaherpevirinae</i></p> <p>Genre : <i>Simplex Virus</i></p> <p>Taille : 120 à 200 nm</p> <p>Génome :</p> <p style="padding-left: 20px;">ADN bicaténaire, linéaire</p> <p style="padding-left: 20px;">152kb, 84 gènes</p> <p>Nucléocapside :</p> <p style="padding-left: 20px;">Icosaédrique (162 capsomères)</p> <p>Enveloppe dérivée de la membrane nucléaire interne</p> <p>Réplication dans le noyau</p>
--

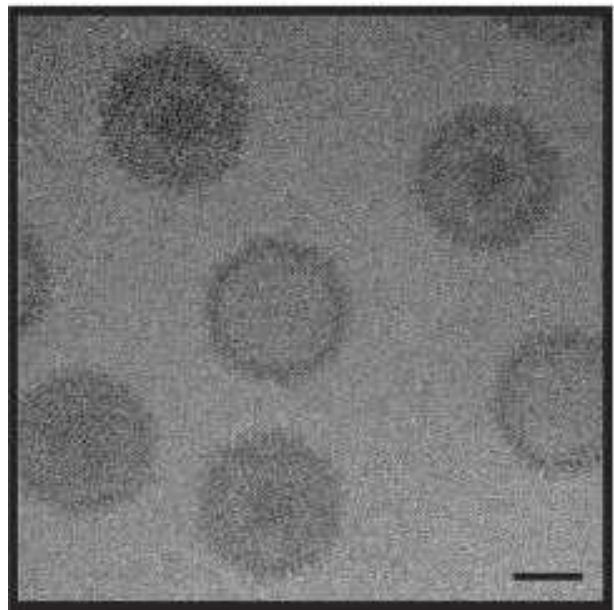


Figure 2 : Image d'HSV-1 piégé dans la glace. Barre = 50 nm. (Rochat et al., 2011)

L'HSV-1 est cultivé dans plusieurs lignées cellulaires humaines ou animales (Fibroblastes, Vero, RK13, Hep-2, HeLa ...), (Huraux JM et al., 2003). Il est responsable d'un ECP caractéristique en grappe de raisin (cellules rondes et réfringentes) qui apparaît après 2-3 jours (Huraux JM et al., 2003).

ii) Le virus de la grippe : H1N1

Les virus de la grippe (Influenzaviruses) sont des virus enveloppés à ARN simple brin segmenté de polarité négative qui appartiennent à la famille des Orthomyxoviridae (Fauquet et al., 2005). Cette famille comprend cinq genres: Trois d'entre eux formant le groupe des virus de la grippe : Influenzavirus A (grippe A), Influenzavirus B (grippe B) et Influenzavirus C (grippe C) ; et deux autres : Thogotovirus et Isavirus.

La classification en sous-types des virus grippaux ne s'applique qu'aux virus de type A. Elle est basée sur les propriétés antigéniques des deux principales glycoprotéines de surface des virus : l'Hémagglutinine (HA ou H) et la Neuraminidase (NA ou N). Il existe : 16 sous-types HA, 9 sous-types NA, ce qui fait théoriquement 144 (16x9) sous-types possibles. Seuls les virus H1N1 (**Figure 3**), H2N2 et H3N2 causent la grippe saisonnière et les pandémies du XXème et XXIème siècle.

Le H1N1

Famille : *Orthomyxoviridae*

Genre : *Influenzavirus A*

Taille : 80 à 120 nm

Génome :

ARN simple brin segmenté de polarité négative

152kb, 84 gènes

Nucléocapside :

Icosaédrique (162 capsomères)

Enveloppe dérivée de la membrane plasmatique

Réplication dans le noyau

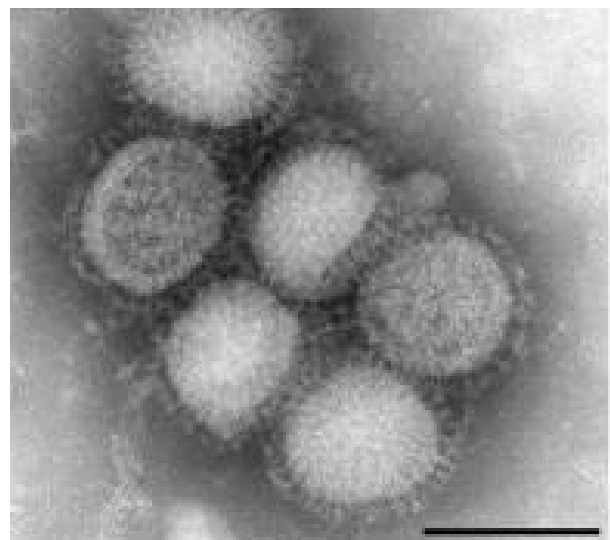


Figure 3 : H1N1 observé on microscope électronique. Barre = 100 nm (Goldsmith et al., 2011)

Le virus H1N1 est cultivé sur des MDCK. Il crée un ECP visible en 2 à 4 jours.

d) Les virus non-enveloppés

i) Le Coxsackievirus B4

Le Coxsackievirus B4 (**figure 4**) est un virus à ARN simple brin à polarité positive de la famille des *Picornaviridae* et du genre *Enterovirus* (Huraux JM et al., 2003). Le rôle du Coxsackievirus B4 dans le diabète de type 1 est fortement suspecté (Hober and Sauter, 2010). Le CVB4 est transmis selon un mode fécal-oral, mais la voie respiratoire est également évoquée (Fields et al., 2007) (Oberste, 2008).

Le Coxsackievirus B4

Famille : *Picornaviridae*

Genre : *Enterovirus*

Taille : 28 à 30 nm

Génome :

ARN monocaténaire linéaire, positif

7,5kb

Capside :

Icosaédrique (60 protoomères)

Virus non-enveloppé

Réplication dans le cytoplasme

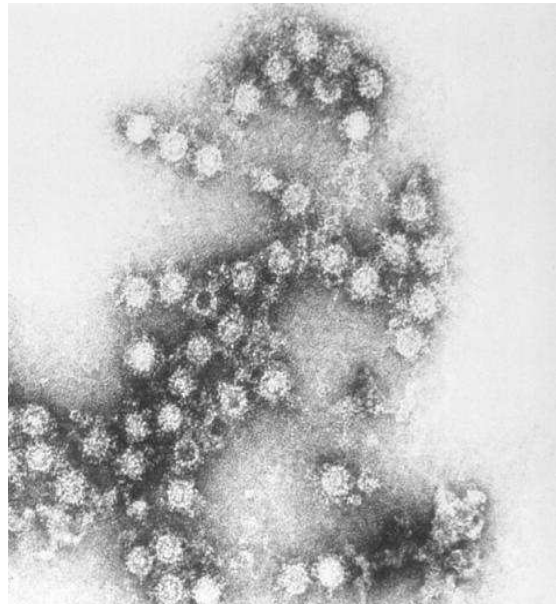


Figure 4 : CVB4 vu en microscopie électronique (centers for disease control and prevention)

Le CVB4 est cultivé sur de nombreuses lignées humaines (Hep-2, HeLa, RD ...) ou animales (Vero, BGM), (Huraux JM et al., 2003). L'ECP est visible en 3-5 jours.

ii) Le Virus Simien 40

Le Virus Simien 40 (SV40) (**Figure 5**) est un polyomavirus isolé chez un macaque rhésus (Cole, 1996), (Butel and Lednicky, 1999), (Butel, 1994). Il était présent mais introuvable dans des cultures de cellules de rein de singe utilisées pour préparer les vaccins poliovirus inactivés ou atténués, ainsi que d'autres vaccins viraux (Sweet and Hilleman, 1960). Par conséquent, entre 1955 et 1963, des millions de personnes ont été exposées au SV40 quand des vaccins contaminés par le SV40 leur ont été administrés (Fraumeni et al., 1963), (Lewis, 1973), (Shah and Nathanson, 1976), (Geissler, 1990). Les sources majeures de l'exposition à SV40 étaient les vaccins à poliovirus. Malgré les moyens d'inactivations utilisés pour la production de vaccins, le SV40 peut conserver son pouvoir infectieux.

Carte d'identité du virus simien 40

Famille : *Polyomaviridae*

Genre : *Polyomavirus*

Taille : 28 à 30 nm

Génome :

ADN monocaténaire linéaire

7,5kb

Capside :

Icosaédrique (60 protomères)

Virus non-enveloppé

Réplication dans le cytoplasme



Figure 5 : particules de SV40 accrochées à la membrane cytoplasmique 10 min après inoculation à une culture de BSC-1 (x73 500) (Brown and Lewis, 1998)

Le SV40 se cultive dans des lignées cellulaires issues de reins de singe vert africain tel que BSC-1 et CV1. Dans ces cellules, l'effet cytopathique prend 3-4 jours et produit environ 300 virions infectieux par cellule infectée (Pipas, 2009).

iii) Le Murine Minute Virus

Le Murine Minute Virus (MVM) (**Figure 6**) appartient à la famille des *Parvoviridae* (Willwand et al., 1997). Le MVM est un virus murin communément utilisé en laboratoire à cause de sa nature hautement infectieuse et sa facilité de culture (Baker, 1998). Ce virus peut être transmis via les fèces et les urines mais aussi via les fomites et les sécrétions nasales (Baker, 1998). Typiquement, il n'y a pas de signe clinique d'infection à l'âge adulte, cependant, des infections expérimentales ont causé de multiples dommages pendant le développement fœtal ou rapidement après la naissance (Baker, 1998)

<p>Le murine minute virus</p> <p>Famille : <i>Parvoviridae</i></p> <p>Genre : <i>Protoparvovirus</i></p> <p>Taille : 18–28 nm</p> <p>Génome :</p> <p>ADN simple brin</p> <p>5 kb</p> <p>Capside :</p> <p>Icosaédrique (60 protoomères)</p> <p>Virus non enveloppé</p> <p>Réplication dans le noyau</p>

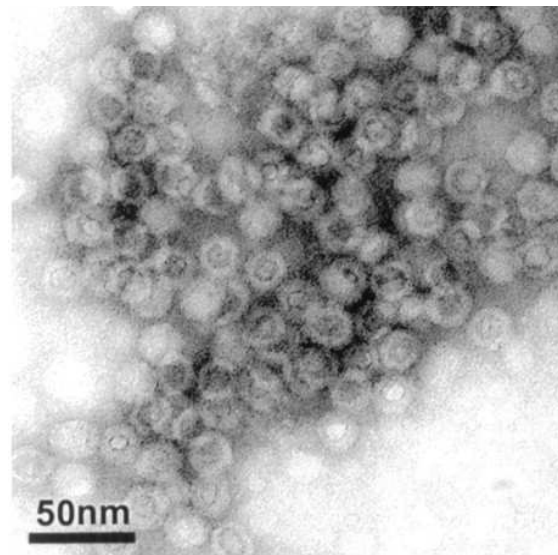


Figure 6 : MVM vu en microscopie électronique (Livingston et al., 2002)

Le MVM se cultive sur des cellules A9 et donne un ECP en 15-20 jours.

Les effets cytopathiques de HSV-1, H1N1, CVB4, SV40 et MVM sur, respectivement les cellules Vero, MDCK, HEP-2, BSC1 et A9, sont illustrés dans la **figure 7**.

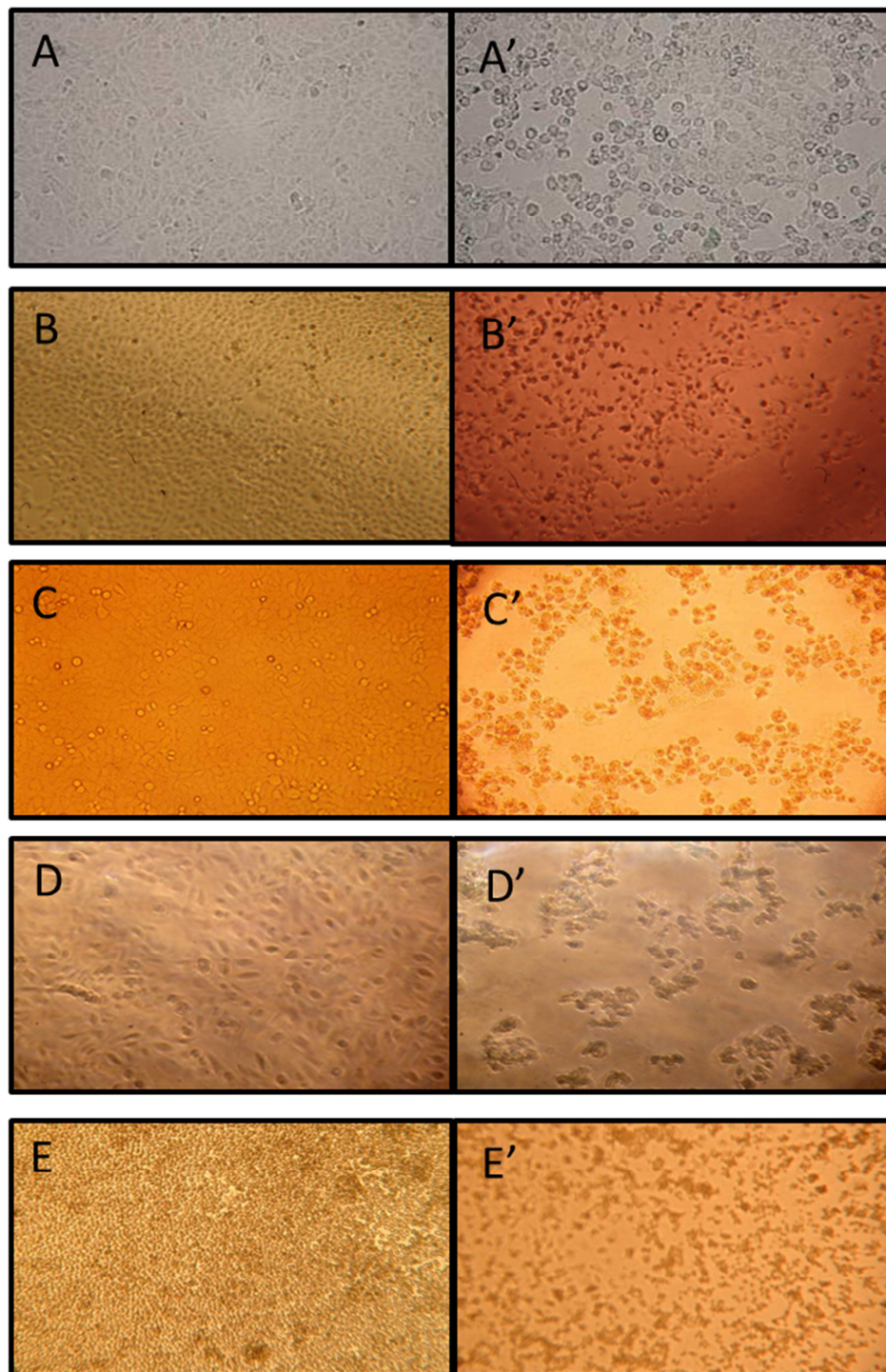


Figure 7 : Photographies de cultures de Vero (A), MDCK (B), Hep-2 (C), BSC1 (D) et A9 (E) et des ECP sur ces cellules, respectivement provoqués par HSV-1 (A'), H1N1 (B'), CVB4 (C'), SV40 (D') et MVM (E'). Grossissement X160.

2) La persistance virale

Le Rhinovirus 2, un petit entérovirus (30nm), non enveloppé, persiste de 2 heures à 7 jours selon les articles (Reed, 1975), (Sattar et al., 1987). Poliovirus de type 2, un autre entérovirus, résiste entre 1 jour et 8 semaines selon les articles (Mahl and Sadler, 1975), (Abad et al., 2001). Du côté des virus enveloppés, le Coronavirus, un virus de 80-90 nm, persiste 3 heures (Sizun et al., 2000), (Gagneur et al., 2002) et le virus de la Vaccine, dont l'enveloppe est néoformée (Smith et al., 2002), est un grand virus ($360 \times 270 \times 250$ nm) qui persiste de 3 à plus de 20 semaines, selon les travaux (Mahnel, 1987), (Mahl and Sadler, 1975).

De nombreux paramètres peuvent influencer la persistance des virus dans leur environnement :

- ☉ la température : assez logiquement, il a été montré que plus la température augmente plus la résistance à la dessiccation des virus diminue (Mbithi et al., 1991)
- ☉ le type de support : selon que le support est poreux ou non, la résistance des virus est différente. Par exemple, le virus de l'Hépatite A est plus sensible sur les matériaux poreux, comme le papier, que sur les matériaux non poreux, comme la porcelaine (Abad et al., 1994). Au contraire, le Poliovirus 1 et l'Adénovirus type 40 sont plus résistants sur les matériaux poreux (Abad et al., 1994). Certains métaux comme l'argent, le cuivre et le fer inactivent les virus (Lara et al., 2010), (Chen et al., 2013), (Kim et al., 2011)
- ☉ l'humidité relative : la relation entre l'humidité relative et la viabilité virale a été reportée par Sobsey et Meschke (Sobsey and Meschke, 2003). En général, les virus enveloppés qui contiennent une membrane lipidique survivent mieux à faible humidité relative (<50%), tandis que les virus non-enveloppés sont plus stables lorsque l'humidité relative

est plus élevée (>70%) (Sobsey and Meschke, 2003). Cependant, il y a de nombreuses exceptions qui demeurent inexpliquées (**tableau 1**). Le virus du Sarcome de Rous (famille : *Retroviridae*) et de la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (famille : *Herpesviridae*), deux virus enveloppés, sont plus stables lorsque l'humidité relative est élevée, et, la persistance du Poxvirus du Pigeon (famille : *Poxviridae*), lui aussi enveloppé, n'est pas influencé par le taux d'humidité relative (Songer, 1967)(Webb et al., 1963). Il y a aussi des exceptions parmi les virus non enveloppés, par exemple, le Calicivirus Félin et le virus de l'Exanthème Vésiculeux type E (famille : *Caliciviridae*) sont tous les deux stables à faible humidité relative (Donaldson and Ferris, 1976)

- ☉ la vitesse du flux d'air : il a été montré qu'un flux d'air au-dessus du liquide permet un brassage des virus augmentant ainsi leur exposition à l'interface air liquide. (Ward and Ashley, 1979)
- ☉ la composition en sels : lors du séchage, la concentration en sels augmente ce qui peut être toxique pour les virus. Cet effet peut être diminué quand la solution cristallise. Ainsi dans un liquide l'effet toxique des sels se situe juste avant le point de cristallisation. L'effet toxique des sels a été observé sur plusieurs virus comme le virus de la grippe A (Yang et al., 2012). Un effet protecteur des sels, lors de la réhydratation, a été observé sur des virus non-enveloppés, comme les entérovirus. Dans ce cas, les sels ralentissent le processus de réhydratation évitant ainsi un brutal changement d'environnement (Benbough, 1971).
- ☉ la taille de l'inoculum : plus la taille de l'inoculum augmente, plus le rapport surface sur volume diminue, ce qui réduit l'effet de l'interface air liquide.

Famille	Virus	Survie aux HR* :			Notes	Milieu	Références
		faible	moyenne	forte			
<i>Caliciviridae</i>	Calicivirus Félin	+	-	-	Survie plus élevée <30% d'HR et plus faible entre 40-80% d'HR	milieu MEM	(Donaldson and Ferris, 1976)
	Virus de l'Exanthème Césiculeux	+	-	+	Survie plus élevée à 20%, diminue avec l'augmentation de l'HR, la plus faible à 60% et augmente aux HR >60%	milieu d'Eagle	(Donaldson and Ferris, 1976)
<i>Coronaviridae</i>	SARS Coronavirus	++	-	-	Inactivation sur gouttelettes; stable entre 40-50% d'HR et plus rapidement inactivé à de plus forte HR	milieu de culture	(Chan et al., 2011)
<i>Flaviviridae</i>	Langat	++	-	+	Survie la plus élevée à env. 20% HR, la plus faible entre 40-60% HR et moyenne >70% HR	milieu de culture	(Benbough, 1971)
		++	-	++	Survie la plus élevée à env. 20% HR, la plus faible à 50% HR et moyenne >70% HR	Solution salée (NaCl, KCl, LiCl)	(Benbough, 1971)
		++	++	+	La survie diminue avec l'augmentation de l'HR	Milieu dessalé (avec protéines)	(Benbough, 1971)
		++	++	++	Survie élevée entre env. 20-95% d'HR	Dessalé et sans protéine	(Benbough, 1971)
		++	++	-	Survie la plus élevée entre 20-70% d'HR et plus faible >70% d'HR	Dessalé et sans protéine plus 0,1% BSA	(Benbough, 1971)

<i>Herpesviridae</i>	Virus de la Rhinotrachéite Bovine	-	-	+	Survie plus faible à 10% et 35% qu'à 90% d'HR	milieu de culture	(Songer, 1967)
<i>Orthomyxoviridae</i>	Virus de la grippe A	+	-	-	Survie la plus élevée entre 15-40% d'HR et 10 fois plus faible entre 50-95% d'HR	Allantoïd et 2% peptone	(Hemmes et al., 1960) (Hemmes et al., 1962)
		+	-	-	La survie diminue avec l'augmentation d'HR	Allantoïd dilué au 1:8 ou 1:10 dans du tampon caséine McIlvaine (pH7,2)	(Harper, 1961)
		+	-	+	Survie la plus élevée entre 30-34% HR, la plus faible entre 58-60% HR et moyenne entre 66-70%HR	Allantoïd avec 0,1M de tampon phosphate Sorensen (pH7,1)	(Shechmeister, 1950)
		+	-	+	Survie la plus élevée <40% HR, la plus faible entre 40-60% HR et moyenne >60%HR	MEM; MEM plus 0,1% BSA; allantoïd	(Schaffer et al., 1976)
<i>Picornaviridae</i>	Poliovirus (type 1)	+	-	++	pas de survie à 20% et 50%, élevée à 80% d'HR	Milieu de Earle	(Harper, 1963) (Harper, 1961)
		-	-	++	pas de survie à 20% et 50%, élevée à 80% d'HR	eau	(Harper, 1963)
		-	-	++	pas de survie à 20% et 50%, élevée à 80% d'HR	0,5% de gélatine	(Harper, 1963)

		-	-	++	pas de survie à 20% et 50%, élevée à 80% d'HR	tampon phosphate	(Harper, 1963)
		-	-	++	pas de survie à 20% et 50%, élevée à 80% d'HR	0,1% cystéine	(Harper, 1963)
		-	-	+	pas de survie à 20% et 50%, élevée à 80% d'HR	0,5% Na ₂ SO ₄	(Harper, 1963)
		+	+	+	survie moyenne à toutes les HR	0,65% KCl	(Harper, 1963)
		+	-	++	Survie moyenne <40%, la plus faible entre 45-60% et la plus élevée >60% d'HR	milieu de culture clarifié	(Benbough, 1971)
		+	+	++	Survie moyenne <60%, la plus faible à environ 70% et la plus élevée >80% d'HR	milieu dessalé et sans protéines	(Benbough, 1971)
<i>Poxviridae</i>	Virus de la Vaccine	+	+	+	Survie similaire entre 20-84% d'HR est un peu plus faible à environ 80% d'HR	Tampon de McIlaine (acide citrique/ disodium de phosphate) plus 1% de sérum de cheval	(Harper, 1961) (Harper, 1963)
	Poxvirus du Pigeon	++	++	++	Survie élevée à toutes les HR	Eau	(Webb et al., 1963)
<i>Retroviridae</i>	<i>Retroviridae</i> Virus du Sarcome de Rous	+	-	++	La survie diminue entre 10-30%, minimum à 30% d'HR et augmente entre 30-100% d'HR	Eau	(Webb et al., 1963)

		++	++	++	Survie élevée à toutes les HR	6% i-inositol	(Webb et al., 1963)
		++	-	-	La survie diminue avec l'augmentation de l'HR	0,005M de tampon de citrate	(Webb et al., 1963)
<i>Togaviridae</i>	Virus de la Forêt de Semlik	++	++	-	Survie la plus élevée entre 20-60% d'HR et plus faible à env. 85% d'HR	Dessalé	(Benbough, 1971)
		++	-	-	Survie la plus élevée entre 20-40% d'HR et plus faible entre 50-85% d'HR	Milieu dessalé plus 5% NaCl	(Benbough, 1971)

*Cette colonne indique le « niveau » de survie en Humidité Relative faible (<50%), moyenne (entre 50 et 70%) et forte (>70). « ++ » signifie une survie élevée (en général >10% de survie). « + » indique une survie environ 10 fois plus faible que « ++ ». « - » indique une survie plus faible que les deux autres cas.

Tableau 1 : relation entre l'humidité relative (HR) et la survie de plusieurs virus

3) L'inactivation virale

a) Moyens chimiques

L'inactivation virale par méthodes chimiques regroupe de nombreux agents :

- ☞ les alcools qui ont une meilleure efficacité sur les virus enveloppés que les virus nus (McDonnell, 2007). L'explication la plus plausible de l'action des alcools est la dénaturation des protéines. L'alcool détruit les structures des surfaces lipidiques des virus enveloppés (McDonnell 2007).
- ☞ les ions chlorures que l'on retrouve dans l'eau de javel. L'action des ions chlorures n'est pas encore élucidée, mais l'oxydation des acides aminés et des nucléotides est supposée (Gerba and Rusin, 2001).
- ☞ les formaldéhydes et glutaraldéhydes sont très efficaces contre les virus. Ils agissent sur les protéines et les acides nucléiques par un procédé d'alkylation (Block, 2001)
- ☞ le peroxyde d'hydrogène inactive les virus en produisant des radicaux libres qui modifient les lipides, les acides nucléiques et les protéines des virus (Sattar et al., 1998)
- ☞ l'iode agirait sur la dénaturation des protéines et des acides nucléiques.
- ☞ l'ortho-phthalaldéhyde a un mode d'action similaire au glutaraldéhyde et au formaldéhyde (Simons et al., 2000), (Cabrera-Martinez et al., 2002).
- ☞ l'acide péracétique, dont l'action est peu connue, semblerait agir comme les autres agents oxydants qui dénaturent les protéines (Block, 2001).
- ☞ les ammoniums quaternaires, de par leurs propriétés tensioactives, vont cibler les lipides des virus, ce qui en fait un élément préférentiellement efficace contre les virus enveloppés (Block, 2001).
- ☞ les métaux, comme l'argent, le cuivre et le fer ont montré une activité virucide (Chen et al., 2013)(Kim et al., 2011)(Lara et al., 2010).

- ☞ l'ozone, un gaz, crée des radicaux libres.
- ☞ le gaz d'oxyde éthylène est utilisé à une température comprise entre 37 et 63°C, à une humidité relative de 40 à 80% et à une durée d'exposition de 1 à 6 heures. Il agit sur les protéines et les acides nucléiques par un procédé d'alkylation (Block, 2001).

b) Moyens physiques

Les procédés d'inactivation virale par méthodes physiques ont une similarité d'action. Ils apportent de l'énergie qui inactive le virus. Ces méthodes sont :

- ☞ le plasma de peroxyde d'hydrogène, qui crée des radicaux libre, modifie les lipides, les acides nucléiques et les protéines des virus (Kyi et al., 1995)(Roberts and Antonoplos, 1998).
- ☞ les micro-ondes produisent une friction des molécules d'eau par un changement de champ électrique. Cette friction permet de générer de la chaleur qui inactive les virus (Sanborn et al., 1982), bien que certain auteurs pensent qu'il y a un effet létal non thermique (Najdovski et al., 1991), (Rosaspina et al., 1994), (Welt et al., 1994).
- ☞ les bains à ultrason permettent d'inactiver les virus par un phénomène de cavitation qui créé des turbulences à l'échelle microscopique entraînant une destruction virale. (Wichelhaus et al., 2006).

La chaleur et les UVc sont deux autres moyens physiques d'inactivation présentés ci-après.

i) La chaleur

La notion de chaleur, au sens scientifique du terme, est définie comme un transfert thermique qui ne doit pas être confondu avec la température. C'est un transfert d'énergie désordonnée à l'échelle microscopique qui se traduit par des chocs aléatoires entre particules.

Trois modes de transfert existent (Chéron, 1999) :

- ☉ la conduction thermique : un phénomène de diffusion propage l'énergie de proche en proche sans transfert de matière sous l'effet d'un gradient de température.
- ☉ la convection : les différences de températures dans un liquide ou un gaz créent des différences de masse volumique qui induisent un mouvement naturel des particules en fonction de la gravité.
- ☉ le rayonnement : tout corps ayant une température supérieure au zéro absolu émet un rayonnement électromagnétique appelé «rayonnement thermique».

Ces trois modes de transfert sont utilisés par différents procédés pour la lutte contre les micro-organismes. Parmi eux, on distingue la stérilisation par chaleur humide, par chaleur sèche et par infrarouge.

De toutes les méthodes disponibles pour la stérilisation, la chaleur humide sous la forme de vapeur saturante sous pression est la plus largement utilisée et la plus fiable. La stérilisation par vapeur saturante est non toxique et peu coûteuse (Adler et al., 1998). Elle est effectuée dans un autoclave où quatre facteurs sont déterminants : la température, la vapeur, la pression et le temps. Les deux cycles classiques de stérilisation par autoclaves sont 121°C,

pendant 30 minutes, et 132°C, pendant 4 minutes. La chaleur humide détruit les virus par une coagulation irréversible et une dénaturation des protéines.

La stérilisation par chaleur sèche est utilisée pour les matériaux qui ne peuvent subir de stérilisation par chaleur humide. La stérilisation par chaleur sèche est une méthode non toxique relativement peu coûteuse. Les inconvénients de cette technique sont le temps nécessaire à la stérilisation et l'incompatibilité des hautes températures associées avec les matériaux thermosensibles. Les cycles communs d'utilisation sont 60 minutes à 170°C, 120 minutes à 160°C et 150 minutes à 150°C. Le mode d'action principale de ce processus est l'oxydation irréversible des protéines.

La stérilisation par infrarouge est une méthode plus récemment développée. Les infrarouges permettent de chauffer uniquement le matériel à stériliser. Ils ont l'avantage de permettre une rapide élévation de la température avec une consommation énergétique réduite. Le mode d'action étant identique à celui de la chaleur sèche.

On remarque facilement que les cycles recommandés pour la chaleur sèche sont plus longs et à des températures plus élevées que pour la chaleur humide. Cela est expliqué dans le cas des virus par le fait qu'un virus séché est plus résistant qu'un virus en milieu liquide (Sauerbrei and Wutzler, 2009). Un exemple parlant est l'inactivation du Parvovirus Bovin lyophilisé avec une humidité résiduelle <1% ou égale à 8%. Dans le premier cas, 7h30 sont nécessaires pour avoir 4 log de réduction du titre viral alors que, dans le second cas, 15 minutes sont nécessaires (Bräuniger et al., 2000).

La réduction du titre viral dû à la température, est classiquement représentée à l'aide d'un modèle exponentiel de premier ordre développé par Stumbo et al. (Stumbo, 1973). Ce modèle considère que l'inactivation virale est due à la destruction de composants viraux essentiels. L'équation retenue étant la suivante :

$$\ln N = \ln N_0 - kt$$

où N est le nombre de virus, N₀ est le nombre initial de virus et k est le coefficient d'inactivation en s⁻¹. Cette équation a été réarrangée en :

$$\log \frac{N}{N_0} = \log S(t) = -\frac{t}{D}$$

où D est le facteur de réduction décimale (égale à 2.303/k) exprimé en s ou min. Il correspond au temps nécessaire pour avoir une réduction de 90% de la population virale initiale (**figure 8**)

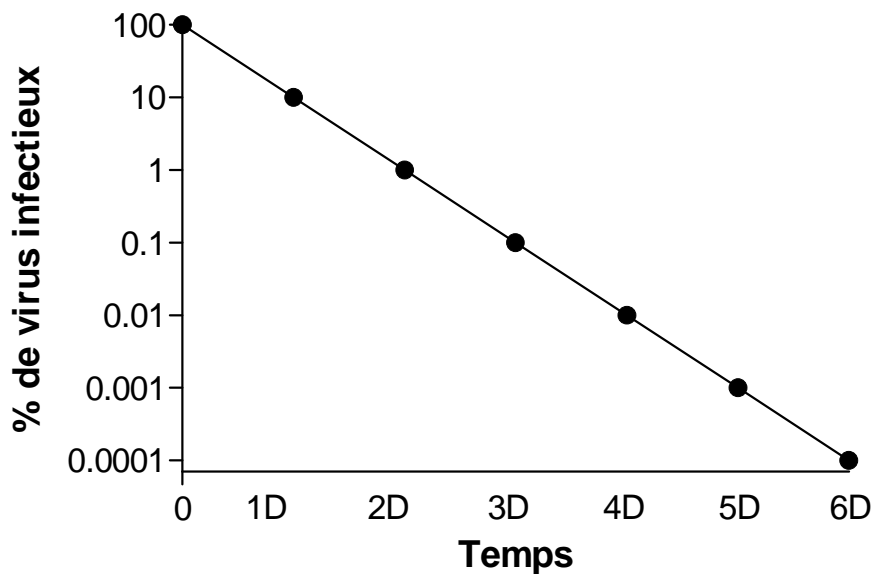


Figure 8 : Illustration de l'évolution du pourcentage de virus infectieux suivant un modèle exponentiel de premier ordre.

Pour la stérilisation par la température, un temps correspondant à 12 fois le facteur de réduction décimale est recommandé (Van Boekel, 2002). En échelle logarithmique, ce modèle est linéaire.

Cependant même si le modèle exponentiel de premier ordre est largement utilisé, de nombreuses courbes d'inactivation ne semblent pas obéir à ce modèle. En effet, certaines courbes d'inactivation présentent des épaulements ou des formes concaves (Cerf, 1977).

L'explication la plus probable étant que dans la population d'un même virus, plusieurs sous-populations existent avec leurs propres modèles d'inactivation donnant ainsi des courbes non linéaires en échelle logarithmique.

Pour modéliser ces courbes le modèle de Weibull a été développé dont l'équation de survie est la suivante :

$$\log S(t) = -\frac{1}{2.303} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta$$

où α et β sont deux constantes déterminées expérimentalement. On remarque que l'on obtient de nouveau le modèle de premier ordre quand $\beta=1$

Le tableau 2 regroupe les données de la littérature et met en évidence une grande disparité de résistance entre les virus, ceux qui appartiennent à la famille des *Parvoviridae* étant les plus résistants (Boschetti et al., 2003), (Eterpi et al., 2009), (Harris et al., 1987), (Blümel et al., 2008), (Sauerbrei and Wutzler, 2009). Pour un même virus, des résistances différentes sont rapportées. Par exemple, Seo et al. (Seo et al., 2012) observent une réduction d'un facteur 10 du norovirus murin à 60°C en 2,86 min alors que Bozkurt et al. obtiennent une réduction d'un facteur 10 en 0,57 min (Bozkurt et al., 2013).

Plusieurs facteurs peuvent faire varier l'efficacité de l'inactivation thermique comme la composition du milieu et pour la chaleur sèche le taux d'humidité (Blümel et al., 2008), (Bräuniger et al., 2000), (McDevitt et al., 2010).

Famille	Virus	Chaleur	Température (°C)	D (min)	Temps	Réduction (log)	Notes	Références
<i>Adenoviridae</i>	Adénovirus type 5	sèche	75		1h	0,7		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	75		2h	1,9		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	80		10min	3,8		(Eterpi et al., 2009)
		sèche	85		1h	1,2		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	85		2h	>5,5		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		1h	3,7		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		Adénovirus type 6	sèche	90		1min	3,9	
Adénovirus type 7	humide	70		10 min	>4,1		(Eterpi et al., 2009)	
Adénovirus type 8	humide	90		1 min	>4,1		(Eterpi et al., 2009)	
<i>Birnaviridae</i>	Virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse	humide	60	288				(Nygaard et al., 2012)
		humide	70	16				(Nygaard et al., 2012)

		humide	80	2,7				(Nygaard et al., 2012)
		humide	90	0,48				(Nygaard et al., 2012)
	Capsicum Chlorosis Virus	humide	71,3		1min	3		(Duizer et al., 2004)
<i>Caliciviridae</i>	Calicivirus Félin-F10	humide	65	0,32				(Bozkurt et al., 2013)
	Calicivirus Félin-F11	humide	72	0,11				(Bozkurt et al., 2013)
	Calicivirus Félin-F9	humide	60		de 0 à 3 min	de 0 à 5		(Bozkurt et al., 2013)
	Norovirus Murin	humide	60	2,86				(Seo et al., 2012)
		humide	60	0,57	de 0 à 3 min	de 0 à 4		(Bozkurt et al., 2013)
		humide	65	0,30				(Bozkurt et al., 2013)
		humide	70	1,19				(Seo et al., 2012)
		humide	72	0,15				(Bozkurt et al., 2013)
		humide	85	1,06				(Seo et al., 2012)
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus Félin	humide	71,3		1min	3		(Duizer et al., 2004)
<i>Flaviviridae</i>	Diarrhée Virale Bovine	sèche	80		8h	1,6		(Roberts and Antonoplos, 1998)

		sèche	80		24h	2,3		(Roberts and Antonoplos, 1998)
		sèche	80		72h	2,9		(Roberts and Antonoplos, 1998)
		sèche	100		30 min	>6,6		(Dichtelmüller et al., 1996)
		sèche	75		1h	0,9		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	75		2h	1		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	85		1h	1,5		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	85		2h	1,7		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		1h	2,8		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		2h	>4		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
<i>Herpesviridae</i>	Virus Pseudorabique	humide	47		2h	3		(Mpandi et al., 2007)
		humide	55		3h	4		(Mpandi et al., 2007)

	Virus de l'Herpès Porcin	sèche	100		30 min	5,7		(Dichtelmüller et al., 1996)
<i>Leviviridae</i>	Phage MS2	humide	60	7,14				(Seo et al., 2012)
		humide	70	0,93				(Seo et al., 2012)
		humide	85	0,48				(Seo et al., 2012)
<i>Orthomyxoviridae</i>	Virus de la grippe A H1N1	sèche	60		15min	1,2	25% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	60		30min	1,5	25% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	60		60min	1,8	25% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	60		15min	4,1	50% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	60		30min	>5	50% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	60		15min	>5,2	75% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	65		15min	1,8	25% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)

		sèche	65		30min	2,2	25% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	65		60min	3,1	25% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	65		15min	>5,1	50% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		sèche	65		15min	>5,1	75% humidité dans l'air	(McDevitt et al., 2010)
		humide	70		1min	0,55		(Jeong et al., 2010)
	Virus de la grippe A H1N2	humide	70		2,5min	3,06		(Jeong et al., 2010)
	Virus de la grippe A H1N3	humide	70		5min	>6,2		(Jeong et al., 2010)
	Virus de la grippe A H1N4	humide	80		1min	1,37		(Jeong et al., 2010)
	Virus de la grippe A H1N5	humide	80		2,5min	>6,14		(Jeong et al., 2010)
	Virus de la grippe A H1N6	humide	90		1min	>8,04		(Jeong et al., 2010)

	Virus de la grippe A H5N2	humide	59	0,4				(Chmielewski et al., 2011)
	Virus de la grippe A H7N2	humide	60	0,5				(Chmielewski et al., 2011)
<i>Papillomaviridae</i>	Papillomavirus Bovin	sèche	100		30 min	1,4		(Dichtelmüller et al., 1996)
<i>Paramyxoviridae</i>	Paramyxovirus Aviaire sérotype 1	humide	59	1,7				(Chmielewski et al., 2011)
	Virus de la Maladie de Newcastle	humide	61	0,19				(Chmielewski et al., 2011)
		humide	63	0,17				(Chmielewski et al., 2011)
<i>Parvoviridae</i>	Murine Minute Virus	humide	60	15,4	de 0 à 60 min	de 0 à 4		(Harris et al., 1987)
		humide	70		10min	0,3		(Boschetti et al., 2003)
		humide	70		10min	0,6		(Eterpi et al., 2009)
		humide	80		10min	0,4		(Boschetti et al., 2003)
		humide	80		10min	4		(Eterpi et al., 2009)
		humide	90		10 min	>5		(Boschetti et al., 2003)

		humide	90		10min	>4,4		(Eterpi et al., 2009)
		humide	90		1 min	3,7		(Eterpi et al., 2009)
		humide	100	1,62	de 0 à 10 min	de 0 à 6,2		(Harris et al., 1987)
		sèche	80		10 min	0,3		(Eterpi et al., 2009)
		sèche	90		1min	0,4		(Eterpi et al., 2009)
	Parvovirus B19	sèche	80		24h	2,3		(Roberts and Antonoplos, 1998)
		sèche	80		72h	>4,7		(Roberts and Antonoplos, 1998)
		sèche	80		24h	3,5	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	80		48h	>5,5	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	80		24h	>5,3	0,85-1,19% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		10min	2,5	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)

		sèche	100		20min	2,5	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		30min	3,2	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		10min	3,2	0,85-1,19% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		20min	3,8	0,85-1,19% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		30min	>5,3	0,85-1,19% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
	Parvovirus Bovin	humide	60		de 0 à 27 min	de 0 à 7	eau	(Bräuniger et al., 2000)
		humide	60		de 0 à 47 min	de 0 à 7	plasma	(Bräuniger et al., 2000)
		sèche	75		1h	0		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	75		2h	0,1		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	85		1h	0,1		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)

		sèche	85		2h	0,6		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		1h	0,8		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		2h	0,9		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	100		de 0 à 8h	de 0 à 5	lyophilisat avec <1% d'humidité	(Bräuniger et al., 2000)
		sèche	100		de 0 à 3h	de 0 à 5	lyophilisat avec 2% d'humidité	(Bräuniger et al., 2000)
		sèche	100		de 0 à 15 min	de 0 à 5	lyophilisat avec 8% d'humidité	(Bräuniger et al., 2000)
	Parvovirus Porcin	humide	70		10min	0,7		(Eterpi et al., 2009)
		humide	80		10min	5,9		(Eterpi et al., 2009)
		humide	90		10min	>6,1		(Eterpi et al., 2009)
		humide	90		1 min	6		(Eterpi et al., 2009)
		sèche	80		10min	0,5		(Eterpi et al., 2009)
		sèche	80		8h	0,4		(Roberts and Antonoplos, 1998)

		sèche	80		24h	1,1		(Roberts and Antonoplos, 1998)
		sèche	80		72h	2		(Roberts and Antonoplos, 1998)
		sèche	80		24h	2,2	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	80		48h	3,9	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	80		24h	3,7	0,85-1,19% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	90		1min	0,4		(Eterpi et al., 2009)
		sèche	100		10min	2	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		20min	2,2	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		30min	3	0,3-0,35% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		10min	1,3	0,85-1,19% d'humidité	(Blümel et al., 2008)

		sèche	100		20min	1,6	0,85-1,19% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
		sèche	100		30min	2,2	0,85-1,19% d'humidité	(Blümel et al., 2008)
<i>Picornaviridae</i>	Virus de l'Hépatite A	sèche	80		8h	>2,8		(Roberts and Antonoplos, 1998)
		sèche	100		30 min	>5,3		(Dichtelmüller et al., 1996)
	Virus de la Fièvre Aphteuse	humide	60	0,27- 0,7				(Kamolsiripichaiporn et al., 2007)
		humide	70	0,10- 0,18				(Kamolsiripichaiporn et al., 2007)
	Poliovirus 1	sèche	75		1h	4,3		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	75		2h	>4,3		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	80		8h	5,1		(Roberts and Antonoplos, 1998)
		sèche	85		1h	>4,8		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)

	Poliovirus Sabin	humide	70		10 min	>4,6		(Eterpi et al., 2009)
		humide	90		1 min	>4,6		(Eterpi et al., 2009)
		sèche	80		10min	>4,6		(Eterpi et al., 2009)
		sèche	90		1min	>4,6		(Eterpi et al., 2009)
<i>Polyomaviridae</i>	Virus Simien 40	sèche	75		1h	0,8		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	75		2h	2,3		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	85		1h	2,7		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	85		2h	3,4		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		1h	5,2		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		2h	>5,1		(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	100		30 min	<1		(Dichtelmüller et al., 1996)

<i>Poxviridae</i>	Virus de la Vaccine	humide	70		10 min	>4,6	(Eterpi et al., 2009)
		humide	90		1 min	>4,6	(Eterpi et al., 2009)
		sèche	80		10min	>4,6	(Eterpi et al., 2009)
		sèche	90		1min	>4,6	(Eterpi et al., 2009)
		sèche	75		1h	0,3	(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	75		2h	0,6	(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	85		1h	1,6	(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	85		2h	1,6	(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		1h	2,1	(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
		sèche	95		2h	>4,3	(Sauerbrei and Wutzler, 2009)
<i>Reoviridae</i>	Réovirus	sèche	100		30 min	>6	(Dichtelmüller et al., 1996)

<i>Retroviridae</i>	Virus de l'Immunodéficience Humaine	sèche	100		30 min	>6,6	lyophilisat	(Dichtelmüller et al., 1996)
<i>Rhabdoviridae</i>	Virus de la Stomatite Vésiculaire	sèche	100		30 min	>5,8		(Dichtelmüller et al., 1996)

Tableau 2 : Données dans la littérature de l'inactivation virale par chaleur sèche ou humide.

ii) Les ultraviolets

Les ultraviolets sont des rayonnements électromagnétiques dont les longueurs d'ondes (entre 100nm et 400 nm) sont inférieures à celles du domaine visible (entre 390nm et 790 nm). Les ultraviolets sont séparés en trois groupes en fonction de leurs longueurs d'onde :

- ☉ les UV-A, compris entre 400 et 115 nm, correspondent à la lumière noire. Ils traversent la couche d'ozone de la stratosphère.
- ☉ les UV-B, compris entre 315 et 280 nm, sont responsables de la synthèse de la vitamine D. Ils sont en grande partie absorbés par la couche d'ozone.
- ☉ les UV-C, compris entre 280 et 100 nm, sont totalement absorbés par l'ozone de la stratosphère et ont une activité germicide reconnue.

Les UVc ont une action virucide due au spectre d'absorption des acides nucléiques qui composent le matériel génétique des virus. En effet, les acides nucléiques absorbent les longueurs d'onde comprises entre 210 et 310 nm avec un maximum à 260 nm (**figure 9**). A noter que les lampes à mercure basse pression génèrent un pic de radiation à 253,7nm, proche du maximum d'absorbance des acides nucléiques.

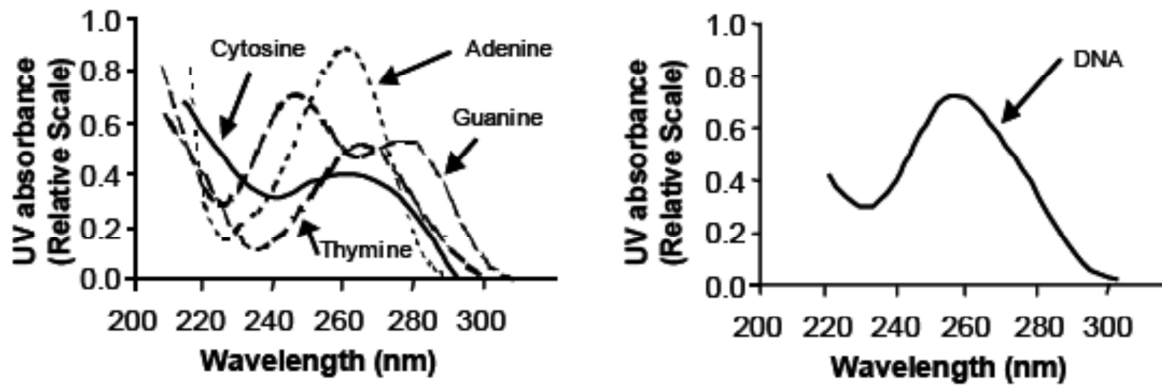


Figure 9 : Spectres d'absorbance relatifs des bases de l'ADN et de l'ADN

(BEN MESSAOUD, 2009)

L'énergie apportée par les UVc est absorbée au niveau de la base azotée des nucléotides permettant la création de liaisons covalentes entre deux nucléotides adjacents. Les photoproduits formés concernent 3 types de liaisons : T-T (appelé le dimère de thymine est le plus fréquent) (**figure 10**), T-C et C-C. Ces trois liaisons déforment la structure du génome viral par l'introduction de pliure rendant la réplication difficile voire impossible.

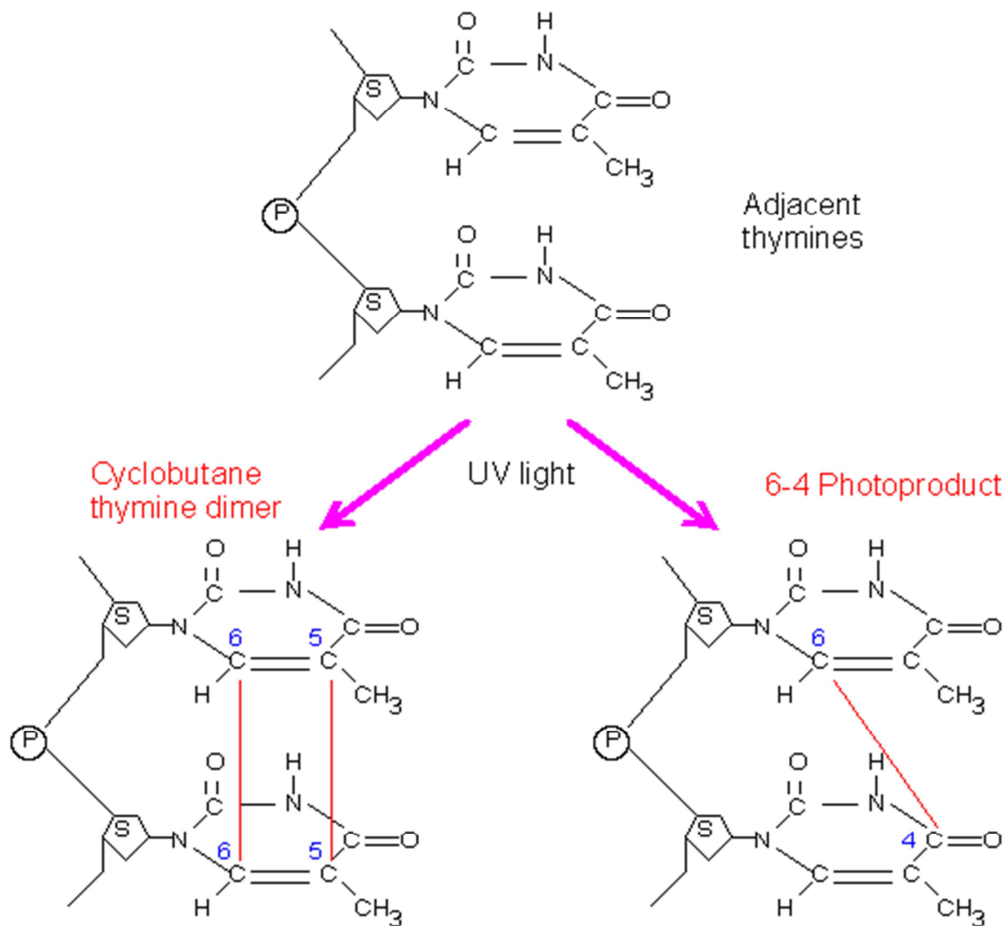


Figure 10 : Produit possible de deux pyrimidines adjacentes dans l'ADN en réaction aux UV (Bolton Bolton James R. « Light Compendium – Ultraviolet Principles and Applications », Inter-American Photochemical Society Newsletter, Vol. 22(2), 1999.).

L'ARN possède de l'uracile au lieu de la thymine. Or le dimère d'uracile est plus difficilement formé que le dimère de pyrimidines, qui est le plus fréquent. Ainsi, l'ADN est plus sensible aux UVc que l'ARN (A. Ben Messaoud 2009).

L'efficacité de l'inactivation virale par les rayons UVc est fonction de la dose absorbée par les virus. Cette dose est définie par le produit de l'intensité UV, mesurée au niveau du virus, et du temps d'exposition aux rayonnements, elle est exprimée en mJ/cm². Des

expériences ont montré qu'à doses reçues égales, l'effet des UV sur les micro-organismes est indépendant de l'intensité utilisée (Hunt, 1992).

Les profils d'inactivation des virus par les UVc, sont exprimés à partir des modèles de cinétique de réduction des micro-organismes. Ces modèles sont exprimés en fonction de la concentration d'un désinfectant C qui est remplacée par l'intensité du rayonnement I, dans le cas des UVc.

Modèle de Chick-Watson : en 1908, Chick a observé une analogie entre la cinétique de réduction des micro-organismes par un désinfectant et une réaction chimique. Elle a utilisé une loi similaire à celle d'une réaction chimique du premier ordre pour modéliser la cinétique de désinfection, soit :

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N$$

où N est le nombre de virus infectieux, t est le temps et k est la constante cinétique de réduction

Watson a proposé un modèle qui précise la constante cinétique de réduction en prenant compte de la concentration du désinfectant :

$$\frac{dN}{dt} = -k' \cdot C^n \cdot N$$

où C est la concentration du désinfectant, n est la constante de dilution, et k' est la constante cinétique de réduction, indépendante de la concentration C.

Ce modèle est ensuite adapté à la cinétique d'inactivation par les UVc où la concentration du désinfectant a été remplacée par l'intensité des UVc. Par conséquent, la cinétique de premier ordre, de la réduction des virus par les UVc, est :

$$\frac{dN}{dt} = -k_{UV} \cdot I \cdot N$$

où N est le nombre de virus infectieux, I est l'intensité UVc en mW/cm² et k_{UV} est la constante cinétique de réduction cm²/mW.s. L'intégration de l'équation donne le nombre de virus infectieux en fonction du temps par l'expression :

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-k_{UV} \cdot I \cdot t}$$

où N est le nombre de virus infectieux à l'instant t (en s), N₀ est le nombre initial de virus infectieux, I est l'intensité UV en mW/cm² et k_{UV}, la constante cinétique de réduction en cm²/mW/s,

Modèle de Scheible (Scheible et al., 1985) : le modèle de premier ordre est en général valable pour des réductions virales de l'ordre de 5 log (Harris et al., 1987). Au-delà, les courbes présentent un ralentissement de l'inactivation par un phénomène de queue. Pour expliquer ce phénomène, Scheible propose de diviser la population virale en deux catégories :

- ☉ les virus isolés, de concentration N₀' , qui sont sensibles aux UVc
- ☉ les virus associés à des éléments de protection (particules solides, agrégats ...), de concentration N_p, qui les protègent des rayonnements UVc.

Le nombre initial de virus infectieux N₀ est égal à la somme des virus isolés, N₀' et des virus associés, N_p. Scheible propose cette équation pour modéliser la cinétique de réduction virale :

$$Nv(t) = N_0' \cdot e^{-k_{UV} \cdot I \cdot t} + N_p$$

Cette équation considère que les virus protégés N_p ne peuvent pas être inactivé par le rayonnement UVc. Avec ce modèle, l'évolution du nombre de virus infectieux commence par suivre une décroissance exponentielle avant de ralentir et de se stabiliser à la valeur N_p .

Le tableau 3 regroupe les données de la littérature concernant les doses d'UV nécessaire pour inactiver des virus à ADN (*Adenoviridae*, *Herpesviridae* ...) et des virus à ARN (*Reoviridae*, *Picornaviridae* ...)

Famille	Virus	ARN/ADN	Dose UV pour 4 log d'inactivation (mJ/cm²)	Références
<i>Adenoviridae</i>	Adénovirus 1	ADN	138	(Nwachuku et al., 2005)
	Adénovirus 2		80-167	(Day, 1974) (Gerba et al., 2002) (Sirikanchana et al., 2008)
	Adénovirus 4		116	(Gerrity et al., 2008)
	Adénovirus 5		216-240	(Kallenbach et al., 1989) (Wang et al., 2004)
	Adénovirus 6		154	(Nwachuku et al., 2005)
	Adénovirus 15		165	(Thompson et al., 2003)
	Adénovirus 40		124-222,2	(Meng and Gerba, 1996)
	Adénovirus 41		100-222	(Meng and Gerba, 1996) (Ko et al., 2005) (Hijnen et al., 2006)
<i>Herpesviridae</i>	Herpes Simplex Virus 2		13	(Wolff and Schneewis, 1973)
	Herpes Simplex Virus 1		24	(Wolff and Schneewis, 1973) (Henderson et al., 1978) (Ross et al., 1971)

<i>Poxviridae</i>	Virus de la Vaccine		6,1	(Lytle et al., 1972) (Ross et al., 1971)
<i>Coronaviridae</i>	Virus de Berne	ARN	5	(Weiss and Horzinek, 1986)
	SARS Coronavirus		91	(Duan et al., 2003) (Kariwa et al., 2004)
<i>Caliciviridae</i>	Calicivirus Bovin		13,7-21,1	(Hijnen et al., 2006)
	Calicivirus Canin		30	(De Roda Husman et al., 2004)
	Calicivirus Félin		30	(Thurston-Enriquez et al., 2003)
<i>Picornaviridae</i>	Coxsackievirus B3		32.5	(Gerba et al., 2002)
	Coxsackievirus B4		30-58	(Battigelli et al., 2011) (Gerba et al., 2002)
	Coxsackievirus B5		33,6-36	(Hijnen et al., 2006) (Gerba et al., 2002)
	Echovirus I		33	(Gerba et al., 2002)
	Echovirus II		28	(Gerba et al., 2002)
	Virus de l'Encéphalomyocardite		16-113	(Smirnov YuA et al., 1992)

	Virus de la Fièvre Aphteuse		96	(Nuanualsuwan et al., 2008)
	Virus de l'Hépatite A		11-37	(Battigelli et al., 2011)(Chin et al., 1997) (Wang et al., 1995)(Wang et al., 2004)
	Poliovirus		12,9-40	(Battigelli et al., 2011)(Chang et al., 1985) (Gerba et al., 2002)(Harris et al., 1987) (Lazarova and Savoys, 2004) (Lytle and Sagripanti, 2005) (Meng and Gerba, 1996) (Tree et al., 2005)(Hughes et al., 1979)
<i>Rhabdoviridae</i>	Virus de la Rage		5	(Weiss and Horzinek, 1986)
	Virus de la Stomatite Vésiculaire		19	(Kariwa et al., 2004) (Danner and Mayr, 1979)
<i>Reoviridae</i>	Réovirus		70-74	(McClain and Spendlove, 1966) (Harris et al., 1987) (Wang et al., 2004) (Wang and Casadevall, 1994) (Kowalski, 2010)
	Rotavirus		19,6-92	(Battigelli et al., 2011)(Chang et al., 1985) (Meng et al., 1987)(Smirnov et al., 1991)
			200	(Caballero et al., 2004)

	Rotavirus SA-11		26-39,2	(Sommer et al., 1989) (Hijnen et al., 2006)
	Rotavirus Simien		117	(Li et al., 2009)
<i>Togaviridae</i>	Virus Sindbis		40	(Wang et al., 2004) (Závadová and Libíková, 1975)
	Virus de l'Encéphalite Equine Vénézuélienne		22	(Smirnov YuA et al., 1992)
<i>Orthomyxoviridae</i>	Virus de la grippe		6,25	(Ben Messaoud, 2009)

Tableau 3 : dose d'UV nécessaire pour inactiver des virus.

Les adénovirus ont une forte résistance aux UVc. La dose nécessaire pour une réduction de 4 log va jusqu'à 240 mJ/cm². Les autres virus, présentés dans le tableau 3, ont une résistance moindre, comprise entre 5 et 91 mJ/cm², excepté pour les Rotavirus dont l'énergie nécessaire est de 200 mJ/cm².

La résistance des adénovirus, virus à ADN, aux UVc est inattendue, vu que l'ADN est plus sensible à ces rayonnements que l'ARN. Cette résistance des adénovirus aux UVc est due à leur capacité à mettre à profit les mécanismes cellulaires de réparations des altérations des acides nucléiques (Eischeid et al., 2009).

L'interaction entre UVc et séchage

Il a été montré pour le virus de la Vaccine, le virus Ebola et le virus de Lassa, que le séchage confère une plus grande résistance des virus vis-à-vis des UV (Sagripanti and Lytle, 2011). La couche superficielle, contenant des virus séchés, ferait office de bouclier, protégeant ainsi les virus situés plus en profondeur.

L'interaction entre UVc et chaleur

Les bases des acides nucléiques s'apparient et forment des structures dont la capacité d'absorption des UVc est réduite. Lorsque l'appariement des bases est rompu par le chauffage, les bases sont davantage exposées aux UVc qu'elles absorbent de 20 à 40 % en plus par rapport à l'état apparié (Michelson, 1958) (Mergny, 2003). C'est le phénomène d'hyperchromicité qui peut jouer un rôle dans l'effet de la combinaison UVc et chaleur.

4) Objectifs de l'étude

La connaissance de la persistance et des moyens de réduction du pouvoir infectieux viral, est un enjeu essentiel pour la lutte contre la propagation des infections. Les virus pouvant être transmis par l'intermédiaire de gouttes qui se déposent sur une surface, notre objectif a été l'étude de la résistance de virus, contenus dans de petits volumes.

Cinq virus appartenant à des familles différentes ont été sélectionnés : H1N1 et HSV-1, deux virus enveloppés appartenant, respectivement, à la famille des *Orthomyxoviridae* et des *Herpesviridae* ; ainsi que CVB4, MVM et SV40, trois virus non-enveloppés appartenant, respectivement, à la famille des *Picornaviridae*, des *Parvovirida* et des *Polyomaviridae*.

La problématique de la résistance des virus, H1N1, HSV-1, CVB4 et MVM, au séchage a été abordée. L'hypothèse de l'existence dans une population virale de particules sensibles et résistantes au séchage a été étudiée.

Le pouvoir infectieux des virus sur support est influencé par la nature des matériaux et l'humidité relative (notamment), en revanche l'impact de la composition du milieu dans la résistance au séchage, est moins bien connu et a été analysé dans nos travaux. L'effet de la concentration initiale du chlorure de sodium (NaCl), du Sérum de Veau Fœtal (SVF) et de l'Albumine Sérique Bovine (BSA), dans la résistance du CVB4 vis-à-vis du séchage a été évalué.

L'inactivation du pouvoir infectieux des virus présents sur des surfaces, est un moyen de lutte contre la propagation des infections. Notre but a été d'étudier l'effet virucide de la chaleur et des UVc. Un système original a été conçu et mis en œuvre pour étudier l'inactivation thermique de MVM, CVB4, H1N1 et HSV-1. La résistance aux UVc de CVB4,

MVM, HSV-1, H1N1 et SV40 a été déterminée. De plus, l'effet virucide de la combinaison chaleur et UVc a été exploré.

MATERIELS ET METHODES

Virus et lignées cellulaires

CVB4 E2 est une souche fournie par Jo-Won Yoon, du centre de recherche Julia Mc FARLANE Diabetes (Calgary, Alta., Canada), (Kang et al., 1994). Les virus sont propagés dans des flasques sur des lignées cellulaires appropriées : HSV-1 (ATCC VR-260) sur des cellules Vero (ATCC CCL-81), CVB4 sur des cellules Hep-2 (ATCC CCL-23), MVM (ATCC VR-1346) sur des cellules A9 (EACC N° 85011426), SV40 (l'ATCC VR-305) sur des cellules BSC-1 (ECACC N° 85011422) et H1N1 A/PR/8/34 (ATCC VR-1469) sur des cellules MDCK (NBL2) (ATCC CCL-34).

Les cellules Vero, A9, BSC-1 et Hep-2 sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; Invitrogen, France) supplémenté avec 10% de SVF et 1% de L-glutamine, à 37°C dans une atmosphère à 5% CO₂. Les cellules MDCK sont cultivées dans du Eagle's Essential Medium (MEM ; Invitrogen, France) supplémenté avec 0,8% de tricine, 5% de SVF et 1% de L-glutamine. Quand une confluence cellulaire est observée, les cellules sont rincées avec du PBS puis trypsinées à 37°C. Les cellules sont ensuite diluées et mises dans de nouvelles flasques ou en plaques 96 puits. Pour les plaques, 50µL de cellules A9, Vero, MDCK, Hep-2 et BSC-1, respectivement à une concentration de 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$, 1×10^5 , $1,5 \times 10^5$ et 1×10^5 cellules/mL sont déposés dans les puits. Des informations concernant les lignées cellulaires sont regroupées dans le tableau 4.

Cellules	BSC-1	Hep-2	MDCK	Vero	A9
Organisme	<i>Cercopithecus aethiops</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Canis familiaris</i>	<i>Cercopithecus aethiops</i>	<i>Mus musculus</i>
Tissu	Rein	contaminant des cellules HeLa (issues d'un adénocarcinome du col de l'utérus)	Rein	Rein	Hybridome de lymphocyte B
Morphologie	épithéliale	épithéliale	épithéliale	épithéliale	lymphoblastique
Culture	adhérente	adhérente	adhérente	adhérente	semi-adhérente
Permissivité virale	SV40, poliovirus 1, VSV	adénovirus 3, poliovirus 1, VSV	CVB3-4-5, Réovirus 2, Adénovirus associé 4-5, virus de la vaccine, VSV poliovirus 2	plus d'une quarantaine notamment poliovirus 1-2-3, HSV-1, SV40 ...	MVM

Tableau 4 : caractéristique des lignées cellulaires BSC-1, Hep-2, MDCK, Vero et A9.

Les cellules Vero, BSC-1 et Hep-2 infectées sont cultivées dans du MEM supplémenté, les cellules A9 infectées sont cultivées dans du DMEM supplémenté, à 37°C dans une atmosphère à 5% CO₂. MEM et DMEM ont été supplémentés avec 2% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de L-glutamine. Les cellules MDCK infectées sont cultivées dans du MEM à 35°C dans une atmosphère à 5% CO₂. Quand un effet cytopathique d'au moins 75% apparaît, les cellules sont grattées et les particules virales sont libérées par trois cycles de congélation/décongélation. Après centrifugation à 2 000g pendant 10 min à 4°C, les surnageants sont récupérés, aliquotés et conservés à -80°C.

En plus du stock de CVB4, obtenu à partir des cultures de cellules Hep-2 infectées, comme expliqué précédemment, une purification de CVB4 a été réalisée selon un protocole du laboratoire modifié (Chehadeh et al., 2005). Brièvement, le surnageant clarifié de cellules Hep-2 infectées par CVB4 a été mis en présence de PEG puis centrifugé à 8 000g pendant 20

min à 4°C. Le culot obtenu a été ensuite resuspendu et ultra-centrifugé sur un gradient de chlorure de césium. Enfin, la suspension de CVB4 a été dessalée et resuspendue dans du PBS. Les aliquots ont été stockés à -80°C.

Titration virale

Les liquides à titrer ont été distribués en 6 réplicats dans des micro-puits et dilués de 10 en 10 de 10^{-1} à 10^{-8} dans du MEM supplémenté avec 2% de PBS, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de L-glutamine pour HSV-1, SV40 et CVB4 ; du DMEM supplémenté avec 2% de PBS, 1% d'acides aminés non essentiels et 1% de L-glutamine pour MVM ; et du MEM pour H1N1. Ensuite les plaques ont été incubées pendant 5 jours pour H1N1 et CVB4, 7 jours pour HSV-1, 2 semaines pour SV40 et 3 semaines pour MVM, à 37°C dans une atmosphère à 5% CO₂. Après cela, les plaques ont été examinées en utilisant un microscope inversé afin d'évaluer l'ampleur de l'effet cytopathique induit par les virus sur les cultures cellulaires. Le titre viral a été estimé par dilution limite et calculé grâce à la méthode de Spearman-Kärber et exprimé en \log_{10} TCID₅₀/X μ L (Hamilton et al., 1977), X représentant la valeur du volume de suspension virale prélevée dans la solution stock.

RT-qPCR

La quantité d'ARN à polarité positive de CVB4 E2 a été évaluée par RT-PCR quantitative en deux étapes, comme précédemment décrit (Thevenin et al., 2013). Brièvement, les ARN totaux ont été extraits avec le RNeasy minikit (Qiagen, Valencia, Calif.) et resuspendus. La quantité d'ARN viral a été déterminé par RT-PCR quantitative à l'aide des kits : Affinityscript QPCR cDNA et Brilliant II QPCR (Agilent Technologie Stratagene). Une

rétrotranscription du brin ARN de polarité positive de CVB4 a été effectuée en utilisant une amorce antisens (séquence : 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA) à 42°C pendant 15 min. L'étape de PCR a été réalisée selon le programme suivant : 10 min à 95°C, puis 40 cycles de 1 min à 60°C et 30s à 95°C (Mx3000p (Stratagen)). Les amorces suivantes, utilisées pour détecter l'ARN de CVB4, sont localisées au niveau de la région 5' non codante, qui est fortement conservée. L'amorce sens était 5'-CCC TGA ATG GGG CTA ATC et l'amorce antisens était 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA. La séquence de la sonde reconnaissant le fragment amplifié était 5'-VIC-AAC CGA CTA CTT TGG GTG TCC GTG TTT-TAMRA (Applied Biosystems). L'absence d'ADN contaminant dans les échantillons a été vérifiée par RT-PCR sans retro-transcriptase. Les amorces et la sonde ont été conçues avec le logiciel PrimerExpress, et les données ont été analysées avec le Sequence Detector version 1.6.3 (tous les deux provenant de Perkin-Elmer, Boston, Mass.). Les résultats ont été exprimés avec les cycles threshold (Ct) qui sont inversement proportionnels à la quantité d'ADN amplifié à partir de l'ARN viral.

Inactivation par séchage

50µL (10µL pour le séchage itératif) d'inoculum viral sont déposés sur le milieu de chaque boîte de Pétri (35 mm de diamètre (Falcon)), et séchés sous le flux d'air d'un PSM de classe II à température ambiante. Du milieu de titrage (1mL) est ajouté pour récupérer l'inoculum de virus séché. Les titres infectieux sont ensuite déterminés.

Appareillage et inactivation virale par la chaleur

L'appareillage est composé d'une plaque électrique, chauffant un bain de glycérol dans un bécher. La température du bain est vérifiée par un thermomètre électronique (AVAX, UK). Un cône d'aluminium est plongé dans le glycérol chauffé. Après quelques secondes, 4µL de suspension virale sont déposés à l'intérieur du cône d'aluminium pendant le temps désiré. 200µL de milieu de titrage froid sont ensuite rapidement ajoutés et récupérés, et ensuite mélangés avec 800µL de milieu de titrage froid.

Modélisation des courbes d'inactivation virale par la chaleur

Deux modèles ont été utilisés en fonction des courbes obtenues : le modèle cinétique de premier ordre et le modèle de Weibull.

Le modèle cinétique du premier ordre suppose une relation linéaire entre la réduction logarithmique de nombre de survivants et le temps selon la formule suivante :

$$\log(S(t)) = kt$$

où $S(t)$ est le rapport entre le titre infectieux après exposition de durée t ($N(t)$ en TCID₅₀/4µL) et le titre viral initial (N_0 en TCID₅₀/4µL), k est le coefficient d'inactivation exprimé en log₁₀ TCID₅₀/4µL/s et t est la durée du temps de traitement en secondes.

Le modèle de Weibull permet de modéliser les courbes présentant un épaulement ou un effet de queue de la réduction logarithmique de nombre de survivants en fonction du temps selon la formule suivante :

$$\log S(t) = -\frac{1}{2.303} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta$$

où $S(t)$ est le rapport entre le titre infectieux après exposition de durée t ($N(t)$ en $TCID_{50}/4\mu L$) et le titre viral initial (N_0 en $TCID_{50}/4\mu L$). α et β sont deux constantes déterminées expérimentalement et t est la durée du temps de traitement en secondes.

Les coefficients α et β ont été calculés par la méthode des moindres carrés avec le solveur Excell (Résolution GRG non linéaire)

Inactivation virale par les UVc

L'inactivation par les UVc a été obtenue en utilisant une lampe à mercure basse pression émettant une raie monochromatique à 253,7 nm (VL-4.C 4W – 254nm Tube). La lampe a été maintenue au-dessus de la suspension virale déposée sur la face intérieure d'un couvercle d'une boîte de Pétri. L'intensité d'UVc atteignant la suspension a été mesurée avec un détecteur d'UV (UV light meter Q652693). La dose reçue par la suspension virale (en mJ/cm^2) est le produit de l'intensité des UVc mesurée (en mW/cm^2) par la durée du traitement (en s).

Modélisation des courbes d'inactivation virale par les UVc

Le modèle exponentiel de premier ordre a été utilisé pour modéliser la réduction logarithmique de nombre de survivants en fonction de la dose reçue par la suspension virale selon la formule suivante :

$$\log S(t) = \log\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = e^{-ki}$$

où $S(t)$ est le rapport entre le titre infectieux après exposition de durée t ($N(t)$ en TCID₅₀/4μL) et le titre viral initial (N_0 en TCID₅₀/4μL). k est le coefficient d'inactivation exprimé en log₁₀ TCID₅₀/10μL/s et i est la dose reçue par la suspension virale en mJ/cm².

Analyses statistiques

L'analyse statistique des résultats a été réalisée à l'aide du test de Mann-Whitney. Les courbes ont été comparées par analyse de covariance (ANCOVA). Le logiciel utilisé pour les analyses statistiques était Graphpad Prism version 5.00 (Graphpad Software, San Diego, USA).

Les différences ont été considérées statistiquement significatives quand $p < 0,05$.

RESULTATS

1) **Persistence du pouvoir infectieux de virus enveloppés et non-enveloppés déposés sur une surface**

Impact du séchage sur le pouvoir infectieux de H1N1, HSV-1, CVB4 et MVM

Cinquante microlitres de surnageant de culture clarifié de cellules infectées par CVB4, MVM, H1N1 ou HSV-1 ont été déposés sur un couvercle de boîte de Pétri et séchés sous le flux d'air d'un poste de sécurité microbiologique de classe II, à température ambiante (20°C ±2°C). L'inoculum séché a été récupéré et le titrage a été effectué comme décrit dans la section « matériels et méthodes ».

Les échantillons ont été séchés au bout d'environ 2 heures, temps au terme duquel le liquide avait visuellement disparu. La valeur moyenne des titres infectieux des inocula d'HSV-1, H1N1 et CVB4 séchés au bout de 2 heures a été, respectivement, réduite de 2,33 log₁₀; 1,1 log₁₀ et 1,5 log₁₀ TCID₅₀/50µL (**figure 11**). Aucun virus infectieux n'a été détecté dans les inocula séchés d'HSV-1 et H1N1 récupérés respectivement après 3 et 5 jours. En revanche, le titre infectieux des particules dans l'inoculum séché de CVB4 récupéré 2 heures à 5 jours après inoculation était inchangé (4,39 +/- 0,38 log₁₀ TCID₅₀/50µL, n=4). Les titres infectieux de MVM dans les inocula séchés récupérés une semaine après inoculation sont inchangés et similaires aux niveaux mesurés dans les gouttes déposées sur le couvercle (5,87 +/- 0,20 log₁₀ TCID₅₀/mL, n=4). Six semaines après l'inoculation, il n'y avait plus de particule infectieuse dans les inocula séchés de CVB4 tandis qu'une quantité significative de

particules infectieuses a été retrouvée dans les inocula séchés de MVM (respectivement 0,5 \log_{10} TCID₅₀/50 μ l (limite de détection) vs 4,00 \log_{10} TCID₅₀/50 μ l, $p < 0.02$).

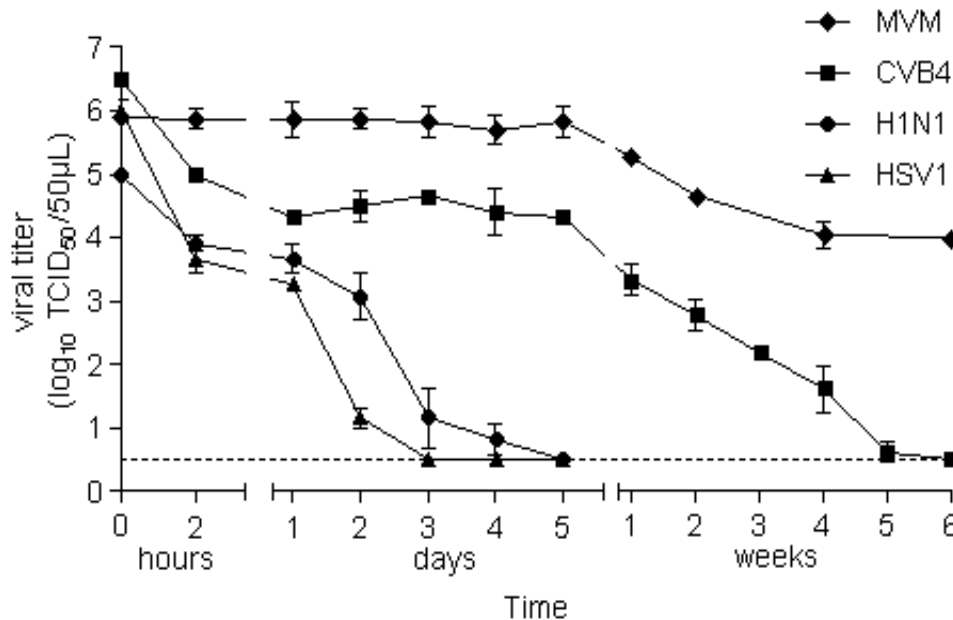


Figure 11 : Effet du séchage sur le pouvoir infectieux des virus. 50 μ l de surnageant de culture contenant H1N1, CVB4, HSV-1 et MVM ont été déposés sur un couvercle de boîte de Pétri en quatre répliquats puis séchés sous le flux d'air d'un poste de sécurité microbiologique de classe II à température ambiante entre 2 heures et 6 semaines. Par la suite, l'inoculum séché a été récupéré avec 1 mL de milieu et le titre infectieux a été déterminé et exprimé en \log_{10} TCID₅₀/50 μ L. Les résultats sont la moyenne \pm SD de quatre expériences indépendantes. La ligne en pointillé représente la limite de détection du test.

La réduction des titres infectieux des inocula séchés sur le couvercle d'une boîte de pétri, a soulevé plusieurs questions. L'efficacité de la récupération des particules virales dans ces conditions a été évaluée. Dans ce but, d'une part le titre infectieux de CVB4 a été déterminé et d'autre part, les ARN totaux ont été extraits pour mesurer la quantité d'ARN viral par RT-PCR en temps réel afin d'estimer la quantité de particules infectieuses.

Les quantités d'ARN viral dans les inocula séchés pendant 2 heures à température ambiante et dans les inocula non séchés, étaient similaires comme le montrent les valeurs des Ct obtenues par RT-PCR en temps réel (valeurs moyennes : 24,36 vs 23,86 respectivement, $p=0,56$) tandis que les valeurs des titres infectieux étaient nettement différentes (réduction de 2,17 \log_{10} , $p=0,028$) (**figure 12**). Ensemble, ces résultats montrent que les particules virales séchées sur le couvercle d'une boîte de pétri étaient efficacement récupérées.

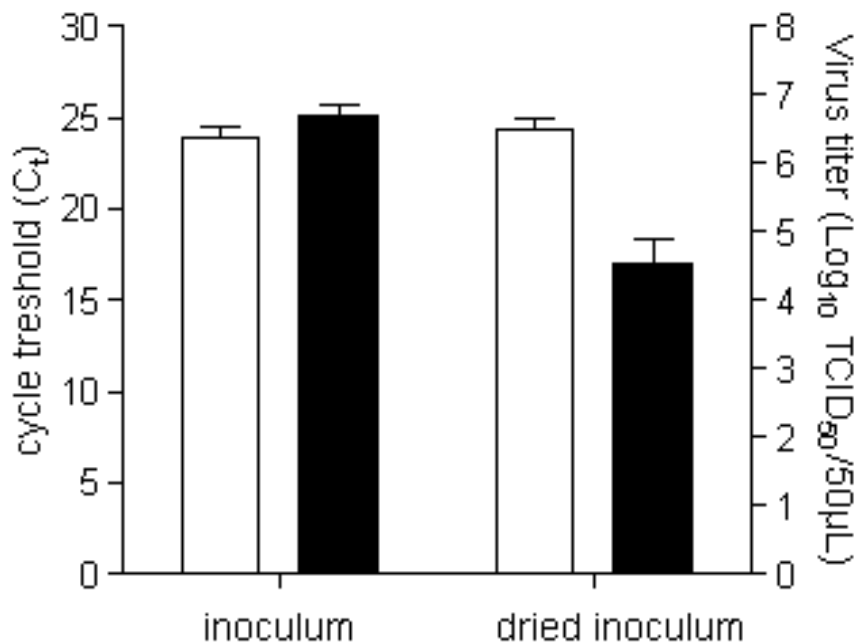


Figure 12 : Quantification de l'ARN et du titre infectieux de CVB4.

50µL de surnageant de culture contenant du CVB4 ont été déposés sur des couvercles de boîtes de Pétri en quatre répliquats. Ils ont été séchés en 2h sous le flux d'air du PSM à température ambiante et ensuite récupérés avec 1mL de milieu de culture. Le titre infectieux a été déterminé et exprimé en \log_{10} TCID₅₀/50µL(■). La quantité d'ARN viral a été évaluée par RT-PCR et exprimée en Ct (□). Les résultats sont les moyennes \pm SD de 4 expériences indépendantes.

Pour explorer davantage la résistance des virus, dix microlitres de surnageant clarifié contenant du MVM, CVB4, H1N1 ou HSV-1 ont été séchés comme décrit ci-dessus, puis

l'opération a été réitérée. Dix microlitres d'eau distillée stérile ont été ajoutés à l'inoculum séché avant d'être de nouveau exposé au flux d'air. Jusqu'à 8 cycles de séchage/resuspension ont été effectués. Par la suite l'inoculum séché est récupéré avec 1 mL de milieu de culture et les titres infectieux ont été déterminés.

Pour H1N1, HSV-1 et CVB4, chaque cycle de séchage a engendré une réduction graduelle des particules infectieuses, respectivement d'environ -0.4, -1.1 et -1.8 log₁₀ TCID₅₀/10µl par cycle (**figure 13**). Aucune réduction du titre infectieux de MVM n'a été observée après chaque cycle de séchage.

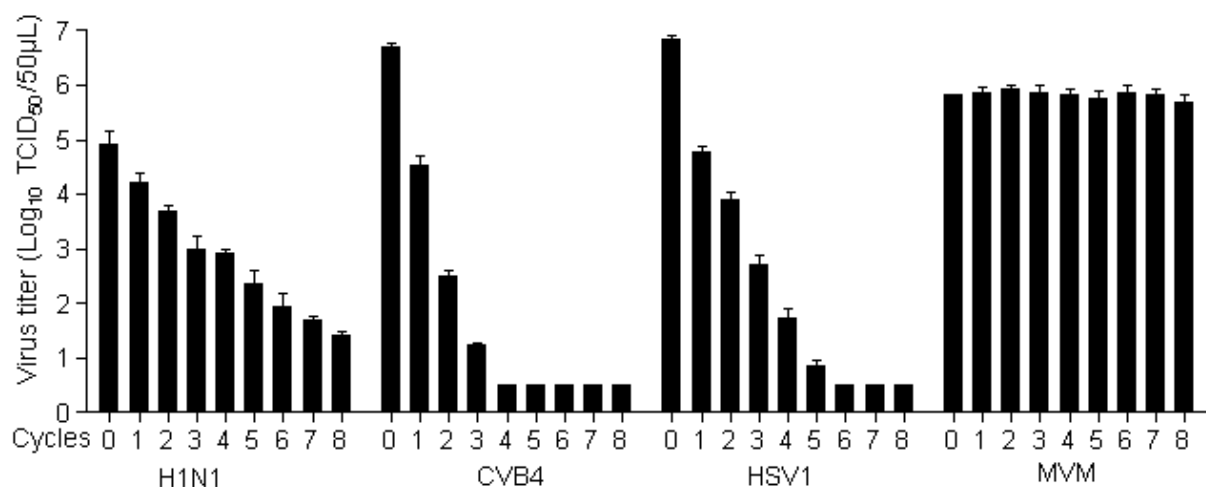


Figure 13 : Effet du séchage itératif sur le pouvoir infectieux des virus. 10 µL de surnageant de culture ont été déposés sur un couvercle de boîte de Pétri en quatre réplicats puis séchés sous le flux d'air d'un poste de sécurité microbiologique de classe II à température ambiante. 10µL d'eau distillée ont été ajoutés aux inocula séchés afin de commencer un nouveau cycle de séchage. Ensuite, l'inoculum séché a été récupéré dans 1 mL de milieu et le titre infectieux a été déterminé et exprimé en log₁₀ TCID₅₀/50µL. Les résultats sont la moyenne ± SD de quatre expériences indépendantes. La limite du test était 0,5 en log₁₀ TCID₅₀/50µL.

Effet des protéines et des sels sur la résistance au séchage du CVB4.

Des suspensions de virus constituées de milieu de culture comportant différentes concentrations de SVF, BSA et NaCl diluées dans de l'eau distillée stérile, auxquelles on rajoute 1% de surnageant clarifié contenant du CVB4 ont été préparées. Cinquante microlitres de ces suspensions virales sont déposés sur un couvercle de boîte de pétri et séchés. Deux heures après inoculation le nombre de particules infectieuses dans les inocula récupérés est déterminé.

Quand CVB4 est resuspendu dans du milieu contenant une faible concentration de SVF (<0,05%) ou BSA (<0,01mg/mL) les quantités de particules infectieuses dans les inocula récupérés, après séchage, étaient les plus élevées, 2,66 et 3,08 \log_{10} TCID₅₀/50 μ l respectivement (**figure 14**). En revanche, le nombre de particules infectieuses dans du milieu contenant 1,25% de SVF et plus de 0,39 mg/mL de BSA était en dessous de la limite de détection du test <0,5 \log_{10} TCID₅₀/50 μ l. Au-dessus de 1,25% de SVF, le nombre des particules infectieuses a augmenté régulièrement et à 100% de SVF le niveau atteint était de 1,17 \log_{10} TCID₅₀/50 μ l (p=0,019 vs la limite de détection du test).

Pour toutes les concentrations de NaCl, le nombre de particules infectieuses était plus élevé que ceux avec du milieu contenant du SVF ou de la BSA (**figure 14**). Dans des milieux contenant de faibles concentrations de NaCl de 0 à 0,1 mg/mL, le niveau des particules infectieuses récupérées des inocula séchés a augmenté légèrement de 2,66 à 3,08 \log_{10} TCID₅₀/50 μ l (p=0,1). En revanche, le pouvoir infectieux des particules dans du milieu contenant entre 0,1 et 2 mg/mL de NaCl a diminué de 3,08 à 2,58 \log_{10} TCID₅₀/50 μ l (p=0,04). Au-dessus de 2 mg/mL de NaCl, le niveau des particules infectieuses avait augmenté, et à 300 mg/mL, le niveau atteignait 4,16 \log_{10} TCID₅₀/50 μ l (p=0,028 vs. le niveau infectieux à 2 mg/mL).

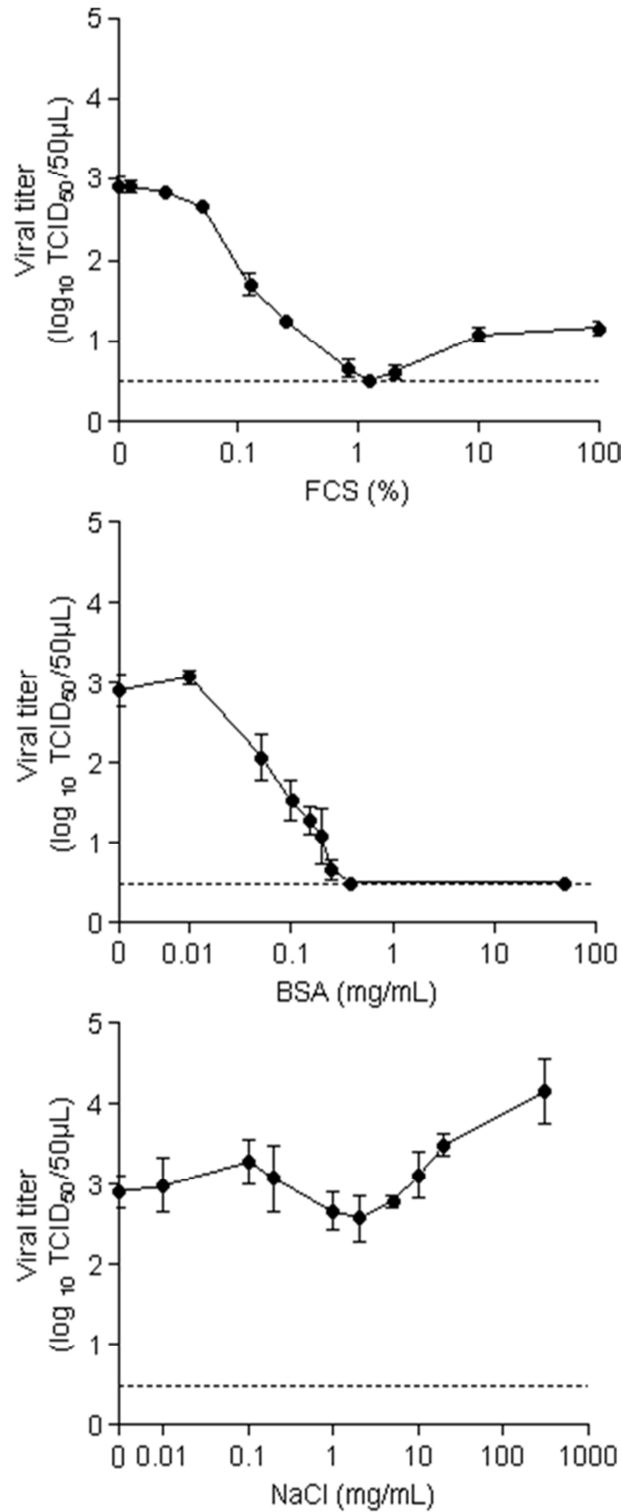


Figure 14 : Effet virucide du séchage sur une suspension virale de CVB4 à différentes concentrations de SVF, BSA et NaCl.

50 µl de surnageant de culture contenant du CVB4 ont été déposés sur un couvercle de boîte de Pétri en quatre réplicats puis séchés sous le flux d'air d'un PSM, à température ambiante pendant 2 heures. Par la suite, l'inoculum séché a été récupéré avec 1 mL de milieu et le titre infectieux a été déterminé et exprimé en log₁₀ TCID₅₀/50µL. Les résultats sont la moyenne ± SD de quatre expériences indépendantes. La ligne en pointillé représente la limite de détection du test.

2) Inactivation rapide de virus contenus dans des gouttelettes appliquées sur une surface chauffée

Des inocula (4 μ L) de virus ont été déposés dans des cônes en feuille d'aluminium immergés dans un bain de glycérol à différentes températures (70, 80, 90, 100, 110, 120, 130°C). Une seconde à 90 minutes après inoculation, les inocula ont été repris dans 200 μ L de milieu de titrage froid. Les solutions récupérées ont été ajoutées à 800 μ L de milieu de titrage froid avant d'être titrées.

Lorsque les gouttes contenant des virus enveloppés, HSV-1 et H1N1, sont chauffées, le profil des résultats obtenus est comparable ; cependant H1N1 s'est avéré plus résistant à l'inactivation par la chaleur que HSV-1. En effet, à 70°C, le titre de HSV-1 était réduit à 0,63 \log_{10} TCID₅₀/4 μ L en 6s, soit une réduction de 4 \log_{10} TCID₅₀/4 μ L ; alors que dans les mêmes conditions, le titre de H1N1 était de 2,42 \log_{10} TCID₅₀/4 μ L (P=0,017) soit une réduction de 2 \log_{10} TCID₅₀/4 μ L (**figure 15**). Une réduction de 4 \log_{10} du titre infectieux de H1N1 et HSV-1 a été obtenue respectivement en moins de 5s et 3s à 80°C, 3s et 2s à 90°C, 2s et 1s à 100°C.

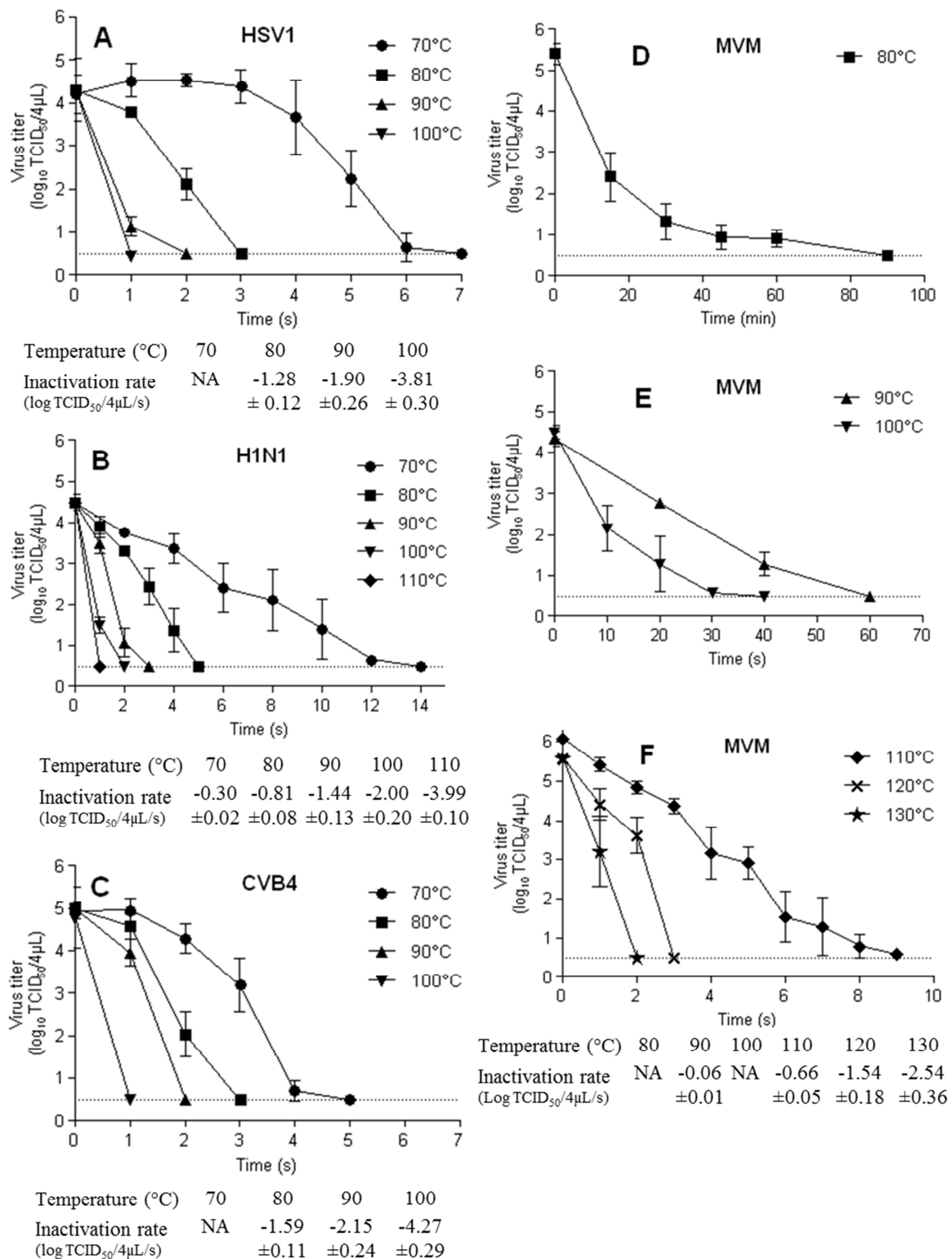


Figure 15 : Virus exposés à la chaleur.

4µL de surnageant de culture contenant H1N1 (A), CVB4 (B), HSV-1 (C), ou MVM (D, E, F) sont déposés dans un cône, constitué d'une feuille d'aluminium, plongé dans du glycérol chauffé à différentes températures. Les inocula sont refroidis avec 200µL de milieu frais. Ce mélange est récupéré, complété avec du milieu froid pour un volume final de 800µL et le titre infectieux est déterminé et exprimé en log₁₀ TCID₅₀/4µL. Les taux d'inactivation des courbes de survie de H1N1, CVB4, HSV-1 et MVM, exprimés en log₁₀ TCID₅₀/4µL/s, sont présentés dans les tableaux sous les graphes. NA : Non applicable, lorsque la courbe ne correspond pas au modèle cinétique de premier ordre. La ligne en pointillés délimite la limite de détection du test. Les résultats sont la moyenne ± SD de 4 expériences indépendantes.

Les taux d'inactivation pour H1N1 vs HSV-1 étaient respectivement de -0,81 vs -1,28 \log_{10} à 80°C (P<0,0001), de -1,44 vs -1,90 \log_{10} à 90°C (P<0,0001), -2,00 vs -1,77 \log_{10} TCID₅₀/4 μ L/s à 100°C (P<0,0001).

L'action de la chaleur sur les gouttes contenant CVB4, un virus non enveloppé, a conduit à une cinétique d'inactivation légèrement comparable à celui de HSV-1. Par rapport à H1N1, CVB4 apparaît moins résistant à l'inactivation par la chaleur. En effet, CVB4 était fortement inactivé, jusqu'à 4,23 \log_{10} TCID₅₀/4 μ L à 70°C en 4s, alors que dans les mêmes conditions, la réduction du titre infectieux de H1N1 n'était que de -1,13 \log_{10} TCID₅₀/4 μ L (P=0,028). Les taux d'inactivation de CVB4 vs H1N1 à 80, 90 et 100°C étaient respectivement de -1,59 vs -0,81 (p<0,0001), -2,15 vs -1,44 (p<0,0001) et -4,27 vs -2,00 \log_{10} TCID₅₀/4 μ L/s (p<0,0001).

L'impact, du chauffage à des températures inférieures ou égales à 100°C sur le titre infectieux de 4 μ L de suspension virale contenant MVM, est modéré. En effet, une réduction du titre de -4 \log_{10} n'était obtenue qu'après une exposition des gouttes à 80°C pendant 30 minutes, à 90°C pendant 60s et à 100°C durant 30s. Une réduction du titre infectieux de MVM supérieure à 4 \log_{10} a été obtenue à 110, 120 et 130°C en 9s, 3s et 2s respectivement.

Les courbes d'inactivations de HSV-1 et CVB4 à 70°C ainsi que celles du MVM à 80°C et 100°C présentaient des parties convexes ou concaves. Elles ont été analysées à l'aide du modèle de Weibull et les coefficients α et β ont été calculés (**tableau 5**).

Conditions	α	β
HSV-1 70°C	3,65	4,29
CVB4 70°C	1,85	2,94
MVM 80°C	0,24	0,25
MVM 100°C	0,12	0,39

Tableau 5 : coefficients α et β déterminés à l'aide du modèle de Weibull à partir des courbes d'inactivation d'HSV-1 à 70°C, CVB4 à 70°C et MVM à 80 et 100°C.

Dans la mesure où il a été rapporté que des métaux, tels que l'argent ou le cuivre, pouvaient inactiver des virus (Chen et al., 2013), (Kim et al., 2011), (Lara et al., 2010), nous avons évalué, en prenant le CVB4 comme modèle, si les feuilles d'aluminium pouvaient avoir un effet inactivant sur les virus. Du milieu de culture, avec ou sans fragments de feuilles d'aluminium, a été préalablement chauffé à 90°C pendant 30s, avant d'être refroidi à 4°C. Le milieu de culture a été ensuite mélangé à une suspension virale de CVB4 ($8,5 \log_{10}$ TCID₅₀/mL) et a été ensuite incubé à température ambiante pendant 30 min avant d'être titré. Aucune réduction du titre infectieux n'a été observée quand la suspension virale était traitée avec du milieu contenant des fragments de feuilles d'aluminium (**figure 16**).

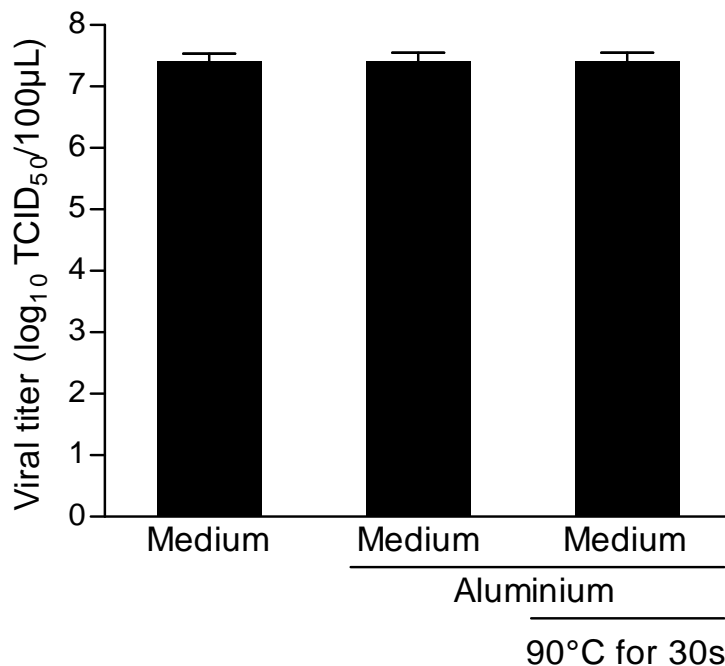


Figure 16 : Effet de l'aluminium sur CVB4.

200µL de milieu de culture contenant des fragments d'aluminium ont été chauffés ou non pendant 30s à 90°C. Après refroidissement, 100µL de suspension virale de CVB4 ont été ajoutés et incubés à température ambiante pendant 30 min. Les titres infectieux ont été déterminés et exprimés en log₁₀ TCID₅₀/100µL. Les résultats sont la moyenne + SD de 4 expériences indépendantes.

La réduction des titres infectieux des différents inocula obtenue quand les gouttes étaient chauffées sur des feuilles d'aluminium, a soulevé plusieurs questions. Il s'est notamment posé la question de l'efficacité de la récupération des particules virales dans ces conditions. Par conséquent, nous avons d'une part évalué le titre viral de CVB4 et d'autre part quantifié l'ARN viral par RT-PCR en temps réel afin d'évaluer le nombre de particules virales. Le résultat de cette évaluation montre que le nombre de particules virales dans les gouttes chauffées ou non à 110°C durant 15s sont comparables, comme le révèlent les valeurs des Ct (23,86 vs 27,15 respectivement), tandis que les titres infectieux étaient significativement différents (6,21 log₁₀ de réduction) (**figure 17**). Ces résultats confirment que

les particules virales chauffées dans des cônes en feuilles d'aluminium étaient efficacement récupérées.

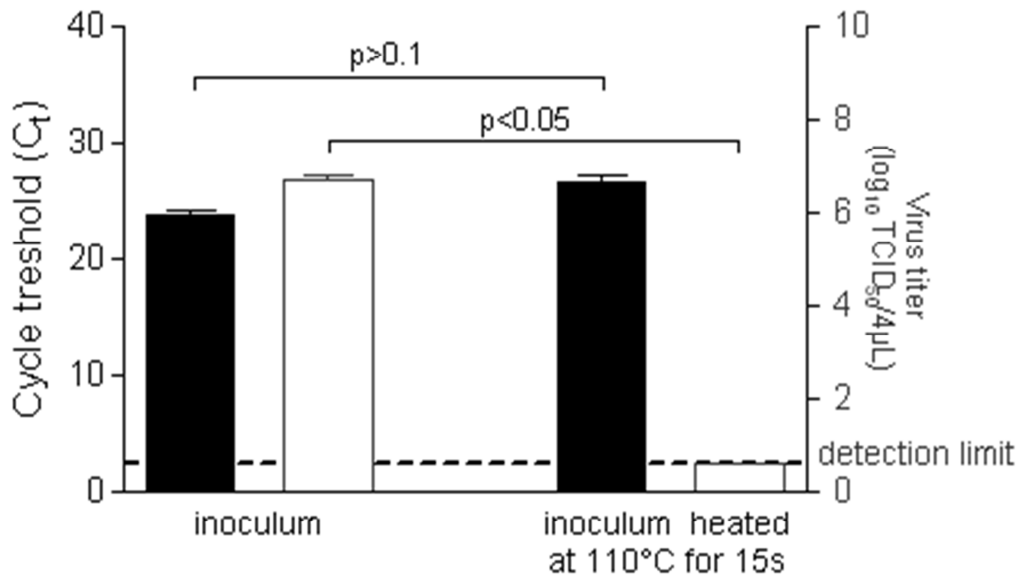


Figure 17 : Quantification de l'ARN de CVB4 et titre infectieux.

4 μL de surnageant de culture contenant du CVB4 ont été chauffés pendant 15s à 110°C, puis le titre infectieux a été déterminé. Le résultat est exprimé en $\log_{10} \text{TCID}_{50}/4\mu\text{L}$ (■). La quantité d'ARN virale a été évaluée par RT-PCR en temps réel et exprimée en Ct (□). Les résultats sont la moyenne + SD de 4 expériences indépendantes.

La suspension virale de CVB4 utilisée pour les essais provenait d'un stock de virus produit sur la lignée cellulaire Hep-2, comme décrit dans la section « matériels et méthodes ». L'impact potentiel des composés cellulaires, ainsi que celui de la concentration en protéines sur ce procédé d'inactivation par la chaleur ont été évalués. Des expériences ont été réalisées avec, d'une part, du virus issu du stock initial de suspension virale, et, d'autre part, du CVB4 purifié (dilution finale 1%) ajouté à du PBS, du PBS supplémenté avec 2% de SVF et à du surnageant de lysat de culture de cellules Hep-2 non infectées. Lorsque le CVB4 stock, d'une

part, et le virus purifié contenu dans les différentes solutions, d'autre part, ont été chauffés 4s à 70°C, les titres infectieux étaient comparables et significativement plus bas par rapport aux contrôles (réduction allant de 4,7 à 4,9 log₁₀) (**figure 18**). Ainsi, il apparaît que le surnageant cellulaire et la concentration en protéines n'interfèrent pas sur le résultat de l'inactivation de suspensions virales par la chaleur.

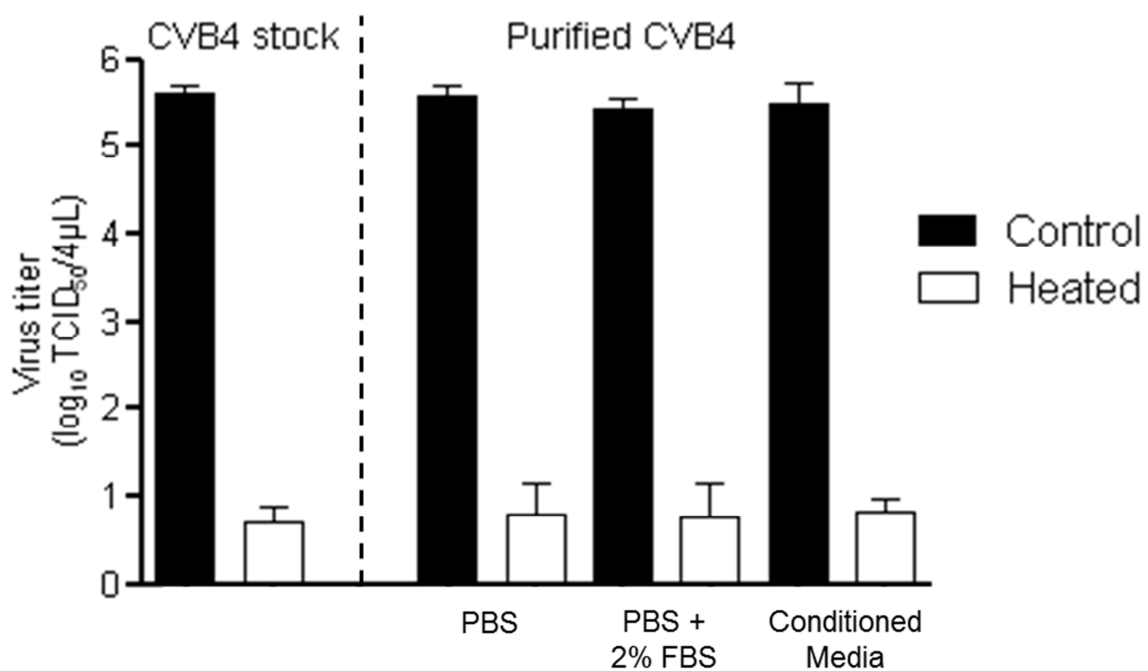


Figure 18 : Inactivation par la chaleur de CVB4 stock et CVB4 purifié.

4µL de CVB4 stock ou CVB4 purifié additionné (dilution finale 1%) à du PBS, du PBS supplémenté avec 2% de SVF, et à du surnageant d'un lysat de culture de cellules Hep-2 sont exposés (□) ou non (■) à la chaleur (70°C pendant 4s). Le titre infectieux est ensuite déterminé et exprimé en log₁₀ TCID₅₀/4µL. Les résultats sont la moyenne + SD de 2 expériences indépendantes.

3) Résistance des virus aux UVc et effet de la combinaison UV- chaleur sur MVM.

Inactivation par les UVc de MVM, SV40, H1N1, HSV-1 et CVB4.

Dix microlitres de surnageant clarifié de cultures cellulaires infectées par CVB4, MVM, SV40, H1N1 et HSV-1 ont été déposés dans des boîtes de Pétri placées sous la lampe UVc préchauffée. Après le temps nécessaire pour que les suspensions virales reçoivent la dose d'UVc désirée, les inocula sont récupérés et titrés comme décrit dans la section « matériels et méthodes ».

Le préchauffage de la lampe UVc était nécessaire pour obtenir une intensité en UVc, constante au cours du temps (**figure 19**). L'intensité délivrée par la lampe était stable après 80 min de préchauffage.

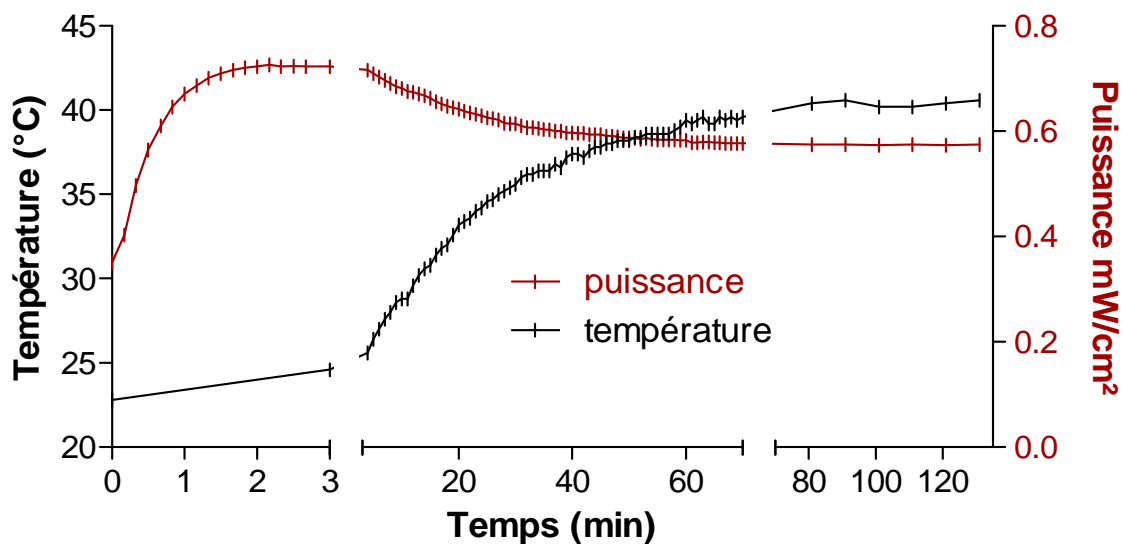


Figure 19 : Evolution de la température et de l'intensité de la lampe UVc.

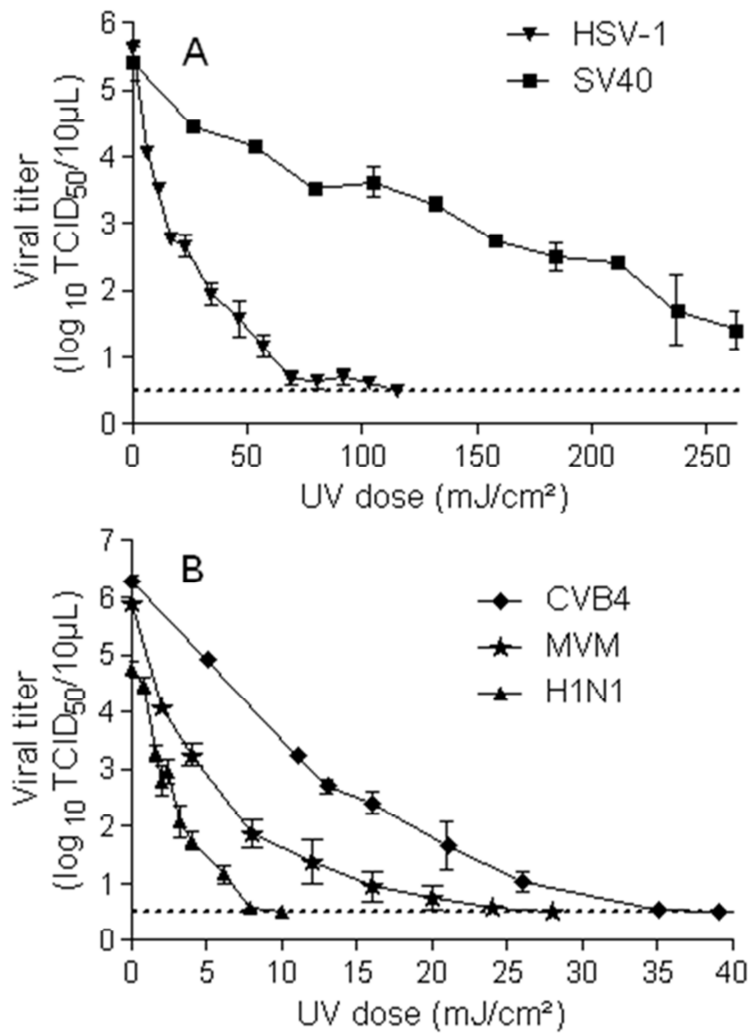
La lampe UV a été allumée sous le PSM et d'une part, la température de la lampe a été mesurée à l'aide d'un thermomètre électronique et d'autre part, l'intensité d'UVc a été mesurée avec le radiomètre à 7cm de la lampe.

Quand des gouttes de 10 μ L, contenant des virus, ont été exposées aux UVc, les profils d'inactivation obtenus étaient similaires et ont été analysés avec le modèle exponentiel de premier ordre. Les coefficients d'inactivation calculés pour H1N1, MVM, CVB4, HSV-1 et SV40 étaient respectivement 0,250 ; 0,161 ; 0,061 ; 0,037 et 0,001 \log_{10} TCID₅₀ /10 μ L/s (tableau de la figure 20)

La résistance du SV40 aux UVc était la plus importante par rapport aux autres virus. Après une dose reçue de 263 mJ/cm², le titre viral résiduel était de 1,4 \log_{10} TCID₅₀ /10 μ L, soit une réduction de 4,0 \log_{10} TCID₅₀ /10 μ L ; tandis que des doses reçues de 115 ; 35 ; 28 et 10 mJ/cm² ont été suffisantes pour, respectivement, inactiver HSV-1, CVB4, MVM et H1N1, soit des réductions respectives de 5,12 ; 5,77 ; 5,2 et 4,25 \log_{10} TCID₅₀ /10 μ L.

Les virus à ADN double brins, HSV-1 et SV40, ont été plus résistants à l'inactivation UVc que les virus à ARN, CVB4 et H1N1 et le virus à ADN simple brin, MVM. En effet, une dose d'UVc de 35 mJ/cm² a été nécessaire pour réduire les titres infectieux de SV40 et HSV-1 de, respectivement, 0,56 et 3,8 \log_{10} TCID₅₀ /10 μ L tandis qu'à cette dose, les titres infectieux de H1N1, CVB4 et MVM ne sont plus détectés.

Comparé à l'inactivation de H1N1 et MVM, CVB4 est apparu plus résistant aux UVc. En effet, une réduction du titre infectieux de H1N1 et MVM, de 4,25 et 4,04 \log_{10} TCID₅₀ /10 μ L respectivement, a été obtenue avec une dose de 8 mJ/cm² alors qu'avec cette quantité d'UVc, la réduction du titre infectieux de CVB4 était de 2,16 \log_{10} TCID₅₀ /10 μ L (p=0,028).



virus	H1N1	MVM	CVB4	HSV-1	SV40
k ($\log_{10}TCID_{50} / 10\mu L/s$)	0,250±0,03	0,166±0,02	0,061±0,005	0,037±0,003	0,0033±0,001

Figure 20 : Virus exposés aux UVc.

10µL de surnageant viral de HSV-1, SV40 (A), H1N1, CVB4, ou MVM (B) sont déposés dans une boîte de Pétri et exposés à différentes doses d'UVc. Les inocula sont récupérés dans 990µL de milieu de culture et le titre infectieux est déterminé et exprimé en $\log_{10} TCID_{50}/10\mu L$. Les taux d'inactivation des courbes de survie de SV40, H1N1, CVB4, HSV-1 et MVM, exprimés en $\log_{10} TCID_{50}/s$, sont présentés dans le tableau sous les graphes. Les résultats sont la moyenne \pm SD de 4 expériences indépendantes.

Effet combiné des UVc et de la chaleur vis-à-vis de MVM.

Quatre microlitres issus des 10 μL d'inocula de MVM ayant reçu différentes doses d'UVc, ont été déposés dans des cônes en feuille d'aluminium, immergés dans un bain de glycérol à 100°C ou à température ambiante. Après une exposition à la chaleur de 20s, 200 μL de milieu de titrage froid ont été ajoutés puis repris pour récupérer l'inoculum de virus. La solution récupérée a été ajoutée à 800 μL de milieu de titrage froid avant d'être titrée.

Quand les gouttes contenant le MVM ont été chauffées, une réduction du titre viral de 1,79 \log_{10} TCID₅₀/10 μL a été observée (**figure 21**). Sans traitement thermique, une dose d'UVc de 28 mJ/cm^2 a été nécessaire pour inactiver MVM alors qu'avec le traitement thermique (20s à 100°C), la dose d'UVc nécessaire pour inactiver le MVM a été réduite à 20 mJ/cm^2 .

Les deux courbes d'inactivation obtenues, lorsque MVM a été irradié par différentes doses d'UVc puis a été chauffé ou non 20s à 100°C, étaient similaires. Entre ces deux courbes, un écart horizontal relativement constant a été observé : pour un titre viral de 4,1 \log_{10} TCID₅₀/4 μL , il était de 3 mJ/cm^2 et pour un titre viral de 1 \log_{10} TCID₅₀/4 μL , il était aussi de 3 mJ/cm^2 . Cette observation se vérifie avec les coefficients d'inactivation k, calculés à partir du modèle exponentiel du premier ordre, qui étaient similaires : 0,161 et 0,166 $\log_{10}\text{TCID}_{50} / 10\mu\text{L}/\text{s}$ (p=0,967) quand MVM était exposé respectivement aux UVc puis à la chaleur ou aux UVc uniquement.

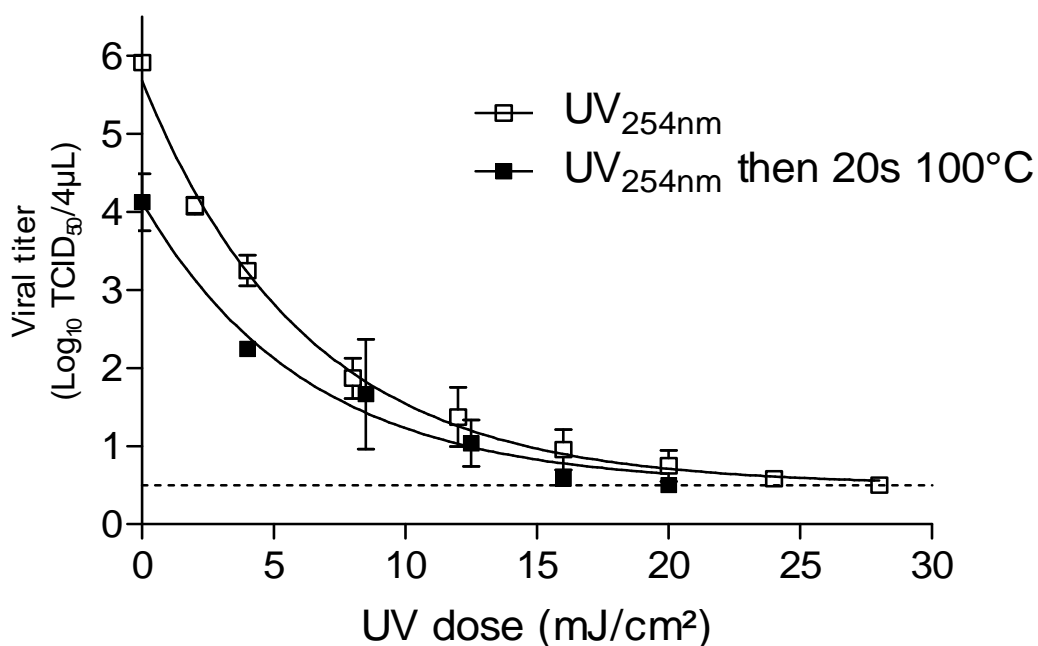


Figure 21 : MVM exposé aux UVc puis à 100°C pendant 20 s.

10µL de surnageant viral de MVM ont été déposés dans une boîte de Pétri et exposés à différentes doses d'UVc. 4µL du surnageant viral de MVM irradié ont été ensuite prélevés et déposés dans un cône en feuille d'aluminium plongé, pendant 20 s, dans du glycérol chauffé à 100°C. Les inocula sont refroidis avec 200µL de milieu froid. Ce mélange est récupéré, complété avec du milieu froid pour un volume final de 800µL et le titre infectieux est déterminé et exprimé en log₁₀ TCID₅₀/4µL. Les résultats sont la moyenne ± SD de 4 expériences indépendantes.

DISCUSSION GENERALE

Plusieurs considérations dans ce mémoire sont notables. La persistance de H1N1, HSV-1, MVM et CVB4 a été étudiée et pour la première fois, l'effet des concentrations de NaCl, SVF et BSA sur la persistance de CVB4 a été déterminé. De plus, l'effet de cycles répétés de séchage et de remise en suspension de H1N1, HSV-1, MVM et CVB4 a été étudié. Le pouvoir infectieux de petits volumes de suspensions virales (4 μ L) de H1N1, HSV-1, MVM et CVB4, appliquées, pendant de courtes périodes, sur une surface chauffée a été déterminé. Les profils d'inactivation de H1N1, HSV-1, MVM, CVB4 et SV40 par les UVc ont été observés. Enfin, la combinaison des effets des UVc et de la chaleur sur le pouvoir infectieux du MVM a été analysée.

1) Persistance du pouvoir infectieux de virus enveloppés et non-enveloppés déposés sur une surface

L'étude de la persistance a été réalisée sur des couvercles de boîte de Pétri, stériles et composés de polystyrène, un plastique hydrophobe et non poreux. Ces deux qualités ont été choisies pour limiter la surface de contact entre les gouttes de suspensions virales et le support. En effet, le polystyrène est un polymère riche en cycle benzène qui lui donne son caractère hydrophobe (Mark, 2007).

L'efficacité de la récupération des virus séchés sur les couvercles de boîtes de Pétri a été illustrée avec le CVB4 par les expériences combinant la mesure du titre viral et de la quantité

de particules virales estimée au travers de la quantité d'ARN virale mesurée par RT-PCR en temps réel. La réduction du titre viral de CVB4 observée après séchage était de $2,17 \log_{10}$ TCID₅₀ alors que la différence des Ct observés, par RTqPCR, n'était pas significative. Cela signifie que le CVB4 a bien été récupéré. Un autre indice va dans le sens d'une récupération complète des particules virales. En effet, le titre infectieux du MVM est identique avant et après séchage ce qui exclut une perte de particules virales lors du procédé de récupération.

L'inactivation sous PSMII a été obtenue au bout d'une période de temps différente selon les virus. Pour H1N1, HSV-1 et CVB4, les courbes d'inactivations comprennent deux phases (**figure 22**).

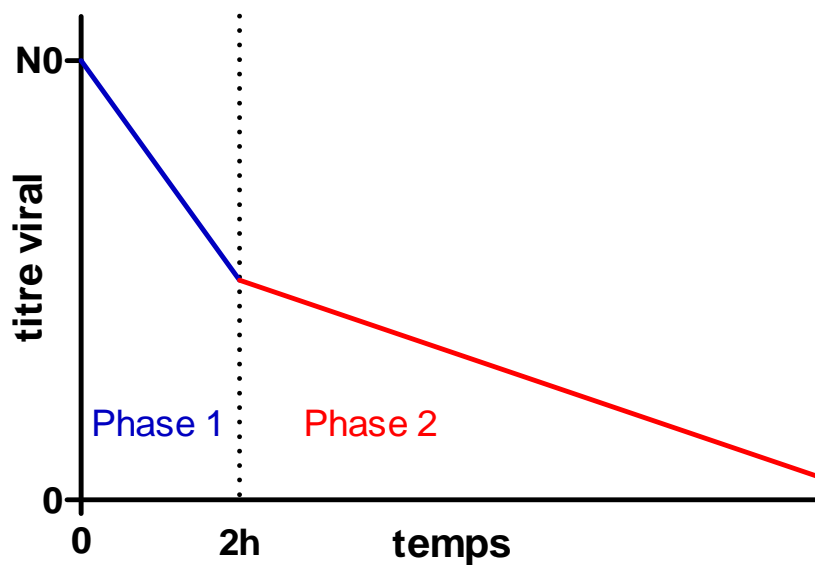


Figure 22 : Représentation des deux phases de l'inactivation virale de H1N1, CVB4 et HSV-1 par le séchage.

La première phase dure deux heures et correspond à une diminution rapide du titre viral de $-2,33$; $-1,1$ et $-1,5 \log_{10}$ TCID₅₀/mL pour respectivement, HSV-1, H1N1 et CVB4. Aucune

réduction du titre viral de MVM n'est observée dans ces deux heures. Scheuplein et al. ont suggéré que la première phase d'inactivation est caractérisée par l'évaporation d'eau libre présente à l'interface air-liquide (Scheuplein and Morgan, 1967). L'évaporation a pour effet d'exposer le virus à cette interface ce qui conduit à son inactivation (Ward and Ashley, 1979).

La seconde phase commence quand l'eau n'est plus visiblement présente dans l'inoculum. A partir de ce moment, le titre viral diminue plus lentement pour HSV-1, H1N1 et CVB4. Dans cette phase, les virus enveloppés se sont révélés plus fragiles que les virus non enveloppés. En effet, H1N1 et HSV-1 ont été inactivés en 5 et 3 jours respectivement alors que CVB4 a été inactivé en 6 semaines et le MVM restait infectieux six semaines après le séchage. Dans cette phase, l'élimination de l'eau est plus lente, ce qui est dû à la diffusion et l'évaporation de l'eau liée (Scheuplein and Morgan, 1967).

Plusieurs différences, entre nos durées de persistance virale et celles obtenues par d'autres équipes, ont été observées. Ces différences peuvent s'expliquer de plusieurs façons en fonction des milieux, surfaces, souches virales et températures mis en œuvre dans les expériences. Par exemple, Bean et al. ont inactivé H1N1 en 3 jours (5 jours dans nos conditions), déposé sur du plastique, à une température supérieure à celle régnant dans nos expériences (28,3°C vs 20°C) (Bean et al., 1982). Abad et al. ont réussi à inactiver Poliovirus 1, (un entérovirus) en moins de 20 jours, en le laissant sécher sur du latex, alors que CVB4 a été inactivé en 6 semaines sur du polystyrène dans nos expériences (Abad et al., 1994).

Pour la première fois une répétition des cycles de séchage et de remise en suspension de l'inoculum viral dans de l'eau a été réalisée. Les titres infectieux de H1N1, HSV-1 et CVB4 ont diminué graduellement à chaque cycle tandis qu'aucune diminution n'a été observée pour le titre viral de MVM. Lors de ces cycles, chaque remise en suspension a modifié la position des particules virales permettant une nouvelle probabilité d'exposition des particules virales à

l'interface air/liquide. Étonnamment, CVB4, qui persiste 5 semaines sous le flux d'air du PSM, est totalement inactivé en 4 cycles de séchage et remise en suspension alors que H1N1, qui ne persiste que 5 jours, est encore infectieux après 8 cycles. Cette différence peut être expliquée par le fait que lors de la réhydratation, les virus non enveloppés peuvent être considérablement inactivés (Benbough, 1971). Cependant, MVM, un virus non-enveloppé, n'est pas affecté par ces cycles de séchage et remise en suspension.

Ces résultats suggèrent que la résistance de H1N1, HSV-1 et CVB4, vis-à-vis du séchage n'est pas due à une hétérogénéité des populations virales mais serait due à la position initiale des particules virales. Le lent processus d'inactivation de MVM par le séchage, reflété par nos expériences de persistance, reste à déterminer.

Les résultats de notre étude montrent que les concentrations initiales de BSA, SVF et NaCl jouent un rôle dans les profils d'inactivation de CVB4 exposé au séchage. En effet, le titre infectieux du CVB4 après séchage était plus élevé quand le virus était en suspension dans l'eau pure que dans l'eau contenant de la BSA ou du SVF. En effet, nos résultats montrent qu'en présence de SVF ou BSA, la résistance de CVB4 au séchage est diminuée. Étonnamment, les courbes de survie de CVB4, initialement en suspension dans 0 à 0,29 mg/mL de BSA et 0 à 1,25 % de SVF, sont relativement similaires. Or, la concentration de BSA dans le SVF est de 23,9 mg/mL, ce qui signifie que la concentration de BSA à 1,25% de SVF était de 0,30 mg/mL. Cela suggère que la faible résistance de CVB4, en présence de 0 à 1,25% de SVF, pourrait dépendre de la BSA. À l'opposé, au-dessus de 1,25% de SVF, l'impact du séchage sur la survie de CVB4 est réduit. Il a été démontré que des concentrations élevées de protéines peuvent protéger les virus contre le séchage (Thomas et al., 2008). Néanmoins dans nos expériences, la présence de hautes concentrations de BSA (au-dessus de 0,39 mg/mL) inactive totalement CVB4 lorsqu'il est exposé au séchage. Le mécanisme de

l'effet de protection apporté par les concentrations élevées de SVF, vis-à-vis du séchage reste à déterminer.

Au-dessus de 10mg/mL, le NaCl protège CVB4 de la dessiccation. Cela peut être expliqué par le fait que lors de l'évaporation de l'eau, la concentration de NaCl augmente jusqu'au point de cristallisation. Cette cristallisation ralentie le processus de réhydratation pendant la phase de récupération du virus, protégeant les particules virales d'un choc osmotique trop important, comme précédemment suggéré (Benbough, 1971). Étonnamment, à 9mg/mL de NaCl, qui correspond à la concentration dans le sang, la survie du CVB4 vis-à-vis du séchage est minimum.

2) Inactivation rapide de virus contenus dans des gouttelettes appliquées sur une surface chauffée

Notre étude de l'inactivation virale par la chaleur se distingue de celles déjà publiées. Pour la première fois, le titre infectieux de petits volumes (4 μ L) de suspensions virales déposées sur une surface chaude, pendant une courte période (à partir de 1s), a été étudié. Pour l'étude de l'effet virucide de la température, un système original a été conçu et mis en œuvre (**figure 22**). Le montage devait répondre à plusieurs contraintes qui étaient :

- ☉ une gamme de températures, comprises entre 70°C et 130°C.
- ☉ une durée d'exposition à la chaleur, très courte (1s).
- ☉ un titre viral initial d'au moins 4,5 log₁₀ TCID₅₀.
- ☉ un usage sur le plan de travail d'un PSMII.

Le système mis en œuvre comporte une feuille d'aluminium (papier aluminium alimentaire) dont la conductivité thermique est importante (237 W/m²/K) (Iide, 2007). La feuille sous forme conique est plongée dans un bain-marie de glycérol. Le glycérol peut être chauffé jusqu'à 171°C, température de décomposition du glycérol. Après quelques instants, un faible volume de suspension virale (4 μ L) est ajouté sur la surface du cône pendant une durée allant de 1s à 90 min. La petite goutte de suspension virale entre en contact avec le support chauffé et parvient ainsi rapidement à la température souhaitée. Une fois le temps écoulé, du milieu froid (200 μ L à 4 °C) est ajouté pour ramener le virus à une température comprise entre 4 et 20°C.

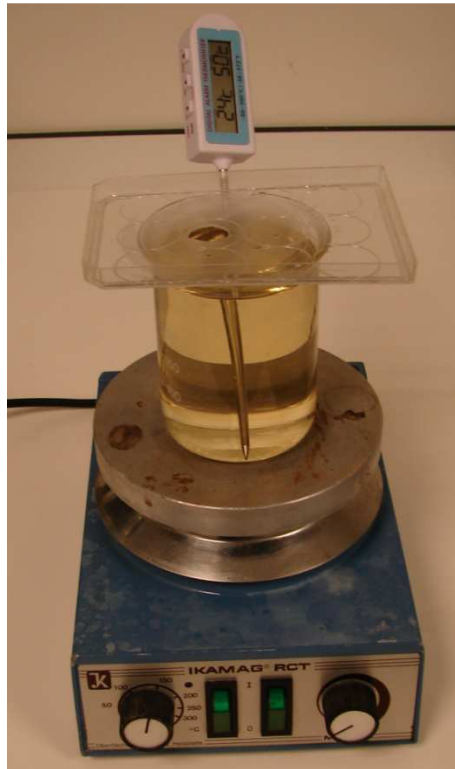


Figure 22 : Photographie du montage utilisé pour l'étude de l'inactivation thermique des virus.

Les métaux comme l'argent, le cuivre et le fer exercent une activité virucide (Chen et al., 2013),(Jeong et al., 2010),(Kim et al., 2011). L'activité virucide de l'aluminium (un métal) chauffé a donc été testée. L'étude du milieu conditionné obtenu après chauffage de fragments d'aluminium, n'a pas montré d'effet virucide ou de toxicité cellulaire. Cela indique que le support aluminium n'interfère pas dans nos tests de température.

L'efficacité de la récupération des virus chauffés dans les cônes d'aluminium a été illustrée avec le CVB4 par les expériences combinant la mesure du titre viral et de la quantité de particules virales estimée au travers de la quantité d'ARN virale mesurée par RT-PCR en temps réel.

Les virus testés ont été cultivés dans des milieux différents et/ou des cellules différentes. Il en résulte des différences dans la composition des suspensions virales qui pourraient, comme nous l'avons vu pour le séchage, modifier l'efficacité virucide de la température. Pour cela, l'impact des composants cellulaires et de la quantité de protéines sur l'inactivation thermique de CVB4 a été testé. Les expériences d'inactivation thermique de la suspension stock de CVB4 et de CVB4 purifié dilué au 1/100^{ème} soit dans du PBS, soit du PBS avec 2% de SVF, soit du milieu conditionné enrichi avec du surnageant de lysat de culture de cellules Hep-2, ont montré une réduction équivalente des titres viraux (entre -4,7 et -4,9 log₁₀ TCID₅₀/50µL). Cela suggère que, dans nos conditions, la composition du milieu ne joue pas un rôle dans l'efficacité virucide de la température.

Il a été montré que la température et le pH peuvent avoir un effet synergique sur l'inactivation du norovirus murin (Seo et al., 2012). Comme le pH peut modifier l'effet virucide de la chaleur, les expériences ont été réalisées avec des suspensions virales dont le pH était similaire (entre 7,5 et 8).

L'inactivation thermique des virus a été obtenue dans un laps de temps très court dans nos expériences et les courbes d'inactivation étaient approximativement linéaires, c'est pourquoi elles ont été analysées selon le modèle de cinétique du premier ordre. Cela nous a permis de comparer les coefficients d'inactivations (k) obtenus avec ceux rapportés par d'autres équipes (Stumbo, 1973). Cependant, le modèle de cinétique du premier ordre ne s'adapte ni aux courbes d'inactivations de HSV-1 et CVB4 à 70°C ni à celles du MVM à 80°C et 100°C. Ces courbes sont convexes ou concaves, ce qui a déjà été observé dans de nombreux cas (Cerf, 1977). Ces courbes ont été analysées à l'aide du modèle de Weibull.

Les coefficients d'inactivation de H1N1 à 70 et 80°C sont respectivement -0,30 et -0,75 log₁₀ TCID₅₀/s dans nos expériences, alors que des coefficients d'inactivation plus faibles, -

0,0092 et -0,023 \log_{10} TCID₅₀/s, respectivement 70 et 80°C, ont été obtenus par une autre équipe (Jeong et al., 2010). Cette différence peut être expliquée par l'efficacité du transfert thermique. En effet, dans notre système, la suspension virale atteint immédiatement les températures désirées car seulement 4 μ L sont chauffés sur une surface préchauffée alors que dans l'étude de Jeong et al, un volume plus grand de suspension virale (40mL) est chauffé dans un tube de 50mL de polypropylène qui n'a pas été préalablement chauffé.

CVB4, un virus non-enveloppé, a été inactivé avec des cinétiques proches de celles de HSV-1, un virus non enveloppé, et H1N1, un autre virus enveloppé, était plus résistant à la chaleur que CVB4. Une explication possible de la sensibilité à la chaleur de CVB4 est que la chaleur, à des températures relativement basses, provoque la libération de l'ARN viral de la capsid de CVB4. Cela a déjà été décrit pour d'autres virus (poliovirus 1, 2 et 3) appartenant à la famille des *Picornaviridae* qui ont été chauffés dans une moindre mesure (37°C) (Rombaut et al., 1994).

Pour la première fois, l'inactivation de particules virales contenues dans des gouttelettes exposées à des températures supérieures à 100°C a été étudiée. Les coefficients d'inactivation thermique à ces températures ont été déterminés seulement pour H1N1 et MVM car HSV-1 et CVB4 ont été totalement inactivés en 1s à 100°C. Le coefficient d'inactivation de H1N1 à 110°C était de -3,54 \log_{10} TCID₅₀/s et dans le cas de MVM à 110, 120 et 130°C, ces valeurs étaient respectivement de -0,66 ; -1,54 et -2,54 \log_{10} TCID₅₀/s.

Une inactivation complète de MVM a été obtenue dans nos expériences quand les particules virales ont été exposées à 90°C pendant 1min, cependant dans une étude précédente, 10 min à 90°C en chaleur humide sont nécessaires pour inactiver MVM (Boschetti et al., 2003). Dans une autre étude (Harris et al., 1974), MVM en suspension dans un volume de 1ml chauffée à 100°C, est inactivé en 15 min alors que 9s ont suffi dans nos

conditions. Selon Eterpi et al., aucune réduction du pouvoir infectieux de MVM n'est observée après une exposition à une chaleur sèche à 90°C pendant 1 min tandis que dans nos conditions (1 min à 90°C), MVM est totalement inactivé (Eterpi et al., 2009). Globalement, il apparaît que l'inactivation thermique de MVM a été plus rapidement obtenue dans nos expériences que dans celles des autres études. Dans notre étude, des petites gouttes ont été exposées à la chaleur ; par conséquent ces gouttelettes ont été séchées pendant le traitement thermique. Or, nous avons vu précédemment que la première phase de séchage réduit les titres viraux de H1N1, HSV-1 et CVB4 (jusqu'à 2,33 log₁₀ TCID₅₀ de réduction pour HSV-1), mais n'a pas d'effet sur MVM. Ceci suggère que le séchage peut contribuer à l'inactivation thermique de H1N1, HSV-1 et CVB4 mais pas de MVM. Cependant le séchage a été obtenu en deux heures alors que quelques secondes ont suffi pour que les virus soient inactivés par la chaleur.

3) Résistance des virus aux UV et effet de la combinaison UV- chaleur sur le MVM

Les inactivations de H1N1, HSV-1, SV40, MVM et CVB4 ont été obtenues à différentes doses d'UVc. Pour tous les virus, les profils d'inactivation sont similaires et le même modèle mathématique a été utilisé : le modèle exponentiel de premier ordre. La raison de l'effet de queue observé sur toutes les courbes d'inactivation a été expliquée par la présence de particules solides dans la suspension virale qui font écran de protection autour du virus (Scheible et al., 1985). Cependant, selon d'autres auteurs, l'effet de queue serait dû à la présence d'agrégats viraux qui permettent une infection multiple des cellules suivi d'une recombinaison qui est la création d'un génome intégral par l'utilisation de portions intactes du génome viral de plusieurs virus endommagés (Mattle and Kohn, 2012). La polymérase passe d'un génome à l'autre pendant le processus de réplication (Nagy and Simon, 1997). Ce phénomène a été observé avec le virus de la Vaccine, un virus à ADN double brins (Sharp and Kim, 1966), le Poliovirus, un entérovirus (Savolainen-Kopra and Blomqvist, 2010) et dans une moindre mesure avec des virus à ARN simple brin à polarité négative (Simon-Lorier and Holmes, 2011) tel que H1N1 (Boni et al., 2010).

Les virus à ADN double brins, HSV-1 et SV40, ont été plus résistants que les virus à ARN, CVB4 et H1N1, et que le virus à ADN simple brin, MVM. Cette résistance s'explique par l'utilisation des mécanismes cellulaires de réparation des altérations des acides nucléiques pour la réparation de l'ADN viral irradié. Cette mise à profit a été observée dans les cellules Véro pour HSV-1 (Millhouse et al., 2012) et dans les BSC-1 pour SV40 (Abrahams and Van der Eb, 1976).

L'expérience combinant différentes doses d'UVc suivi par un traitement thermique de 20s à 100°C permet d'obtenir une inactivation plus efficace. En effet, en ajoutant le traitement par la chaleur, 17mJ/cm² d'UVc sont suffisants pour inactiver le MVM alors que 27 mJ/cm² d'UVc sont nécessaires dans le cas où aucun traitement thermique n'est appliqué. Par ailleurs, les coefficients d'inactivation K calculés à partir du modèle exponentiel de premier ordre sur les deux courbes obtenues sont similaires ; 0,161 et 0,166 log₁₀ TCID₅₀/s pour respectivement la suspension de MVM irradiée puis chauffée et la suspension de MVM uniquement irradiée. Ces résultats suggèrent une indépendance des effets (**figure 24**). Il a été montré que les UVc et la chaleur agissent sur deux parties différentes du virus. La chaleur inactive la liaison du virus à son récepteur cellulaire tandis que les UVc inhibent la réplication du génome (Wigginton et al., 2012).

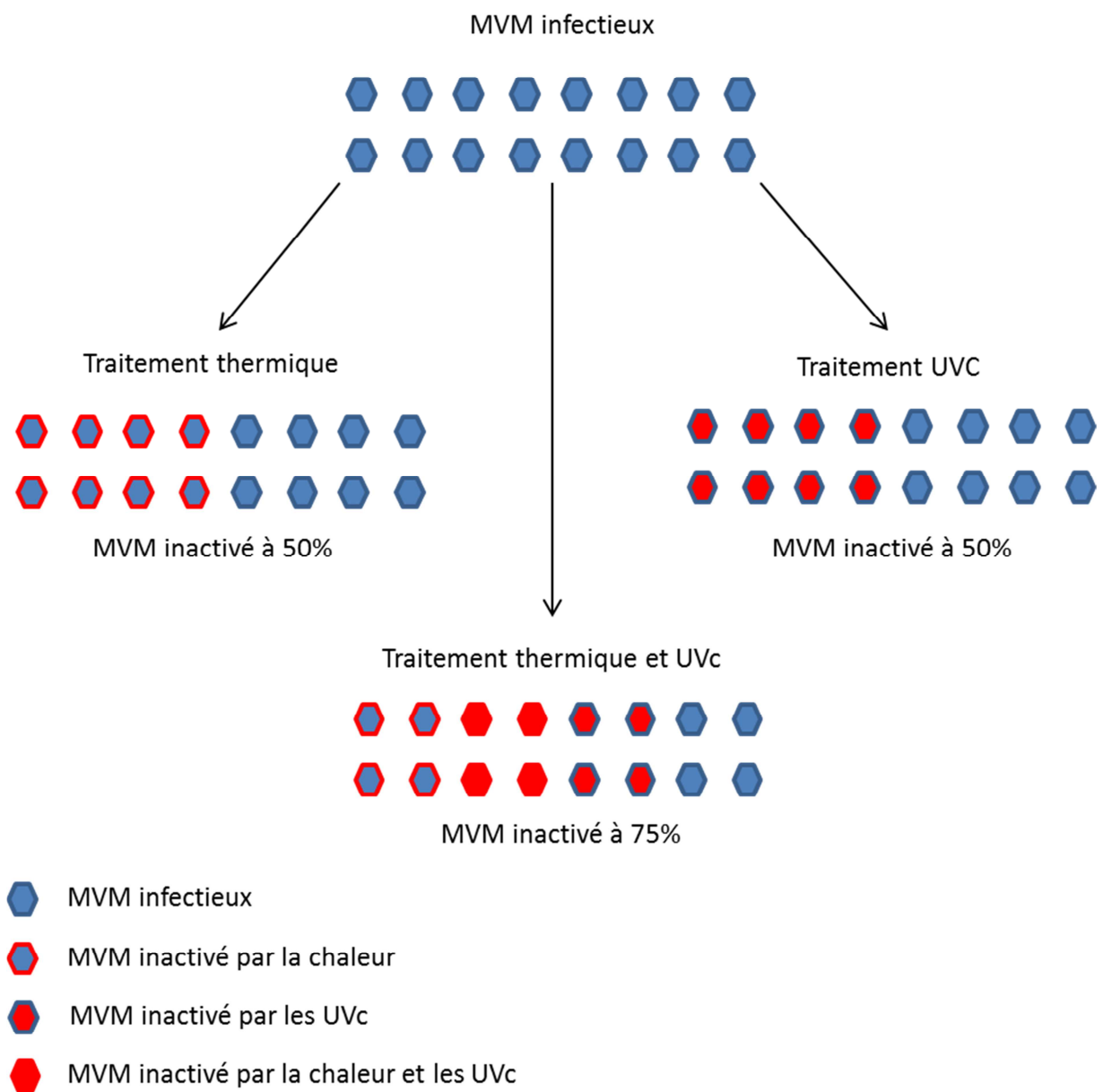


Figure 24 : Schéma explicatif de l'hypothèse de l'effet combinatoire de la chaleur et des UVC sur le MVM.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude montre que les virus peuvent persister pendant plusieurs jours voire des semaines sur une surface hydrophobe. Les profils de résistance des virus vis-à-vis du séchage ne sont pas dus à une hétérogénéité de populations virales. De plus, la composition et la concentration des composants du milieu jouent un rôle dans la résistance des virus exposés au séchage. Par conséquent, nous recommandons l'étude de la persistance virale dans des milieux naturels (cliniques ou environnementaux) au lieu de milieux définis.

Par ailleurs, la résistance thermique des virus contenus dans un petit volume de liquide exposés pendant une très courte durée à des températures comprises entre 70°C et 130°C a été étudiée. Pour la première fois, l'inactivation de particules virales contenues dans des gouttelettes exposées à des températures supérieures à 100°C a été réalisée. La plus grande résistance thermique de H1N1, comparé à HSV-1, un autre virus enveloppé, et à CVB4, un virus non-enveloppé a été observée. De plus, il a été montré que, dans nos conditions, la chaleur inactive plus rapidement les virus que précédemment décrit.

Enfin, la résistance aux UVc des virus a été étudiée. La résistance de HSV-1 et SV40, deux virus à ADN double brins, a été observée. L'effet combiné des UVc et de la chaleur vis-à-vis de MVM a été testé et a mis en évidence une indépendance des effets. L'étude des deux moyens d'inactivation agissant en même temps serait intéressante à réaliser pour déterminer si

l'hyperchromicité des acides nucléiques provoquée par la chaleur favorise l'inactivation virale due aux UVc.

La chaleur et les UVc sont une alternative efficace à la désinfection chimique. Ils présentent les avantages des moyens physiques : pas de matière résiduelle sur les surfaces et action rapide dans certaines conditions. Il reste à déterminer l'impact du séchage sur les effets virucides de la chaleur et des UVc.

BIBLIOGRAPHIE

Abad, F.X., Pinto, R.M., and Bosch, A. (1994). Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.* *60*, 3704–3710.

Abad, F.X., Villena, C., Guix, S., Caballero, S., Pinto, R.M., and Bosch, A. (2001). Potential Role of Fomites in the Vehicular Transmission of Human Astroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 3904–3907.

Abrahams, P.J., and Van der Eb, A.J. (1976). Host-cell reactivation of ultraviolet-irradiated SV40 DNA in five complementation groups of xeroderma pigmentosum. *Mutat. Res.* *35*, 13–22.

Adler, S., Scherrer, M., and Daschner, F.D. (1998). Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods. *J. Hosp. Infect.* *40*, 125–134.

Baker, D.G. (1998). Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research. *Clin. Microbiol. Rev.* *11*, 231–266.

Battigelli, D.A., Sobsey, M.D., and Lobe, D.C. (1993). The Inactivation of Hepatitis A Virus and other Model Viruses by UV Irradiation. *Water Sci Technol* *27*, 339–342.

Bean, B., Moore, B.M., Sterner, B., Peterson, L.R., Gerding, D.N., and Balfour, H.H. (1982). Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *J. Infect. Dis.* *146*, 47–51.

Benbough, J.E. (1971). Some factors affecting the survival of airborne viruses. *J. Gen. Virol.* *10*, 209–220.

Block, S.S. (2001). *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (Lippincott Williams & Wilkins).

Blümel, J., Stühler, A., and Dichtelmüller, H. (2008). Kinetics of inactivating human parvovirus B19 and porcine parvovirus by dry-heat treatment. *Transfusion (Paris)* 48, 790.

Van Boekel, M.A.J.S. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 139–159.

Boni, M.F., de Jong, M.D., van Doorn, H.R., and Holmes, E.C. (2010). Guidelines for Identifying Homologous Recombination Events in Influenza A Virus. *PLoS ONE* 5.

Boschetti, N., Wyss, K., Mischler, A., Hostettler, T., and Kempf, C. (2003). Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* 31, 181–185.

Bozkurt, H., D'Souza, D.H., and Davidson, P.M. (2013). Determination of the thermal inactivation kinetics of the human norovirus surrogates, murine norovirus and feline calicivirus. *J. Food Prot.* 76, 79–84.

Bräuniger, S., Peters, J., Borchers, U., and Kao, M. (2000). Further studies on thermal resistance of bovine parvovirus against moist and dry heat. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203, 71–75.

Brown, F., and Lewis, A.M. (1998). Simian virus 40 (SV40): a possible human polyomavirus: Natcher Auditorium, NIH, Bethesda, Maryland, USA, January 27 and 28, 1997 (Karger).

Butel, J.S. (1994). Simian virus 40. In *Encyclopedia of Virology*, (San Diego, CA, Academic press), pp. 1322–1329.

Caballero, S., Abad, F.X., Loisy, F., Le Guyader, F.S., Cohen, J., Pintó, R.M., and Bosch, A. (2004). Rotavirus virus-like particles as surrogates in environmental persistence and inactivation studies. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 3904–3909.

Cabrera-Martinez, R.-M., Setlow, B., and Setlow, P. (2002). Studies on the mechanisms of the sporicidal action of ortho-phthalaldehyde. *J. Appl. Microbiol.* *92*, 675–680.

Cerf, O. (1977). Tailing of survival curves of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* *42*, 1–19.

Chan, K.H., Peiris, J.S.M., Lam, S.Y., Poon, L.L.M., Yuen, K.Y., and Seto, W.H. (2011). The Effects of Temperature and Relative Humidity on the Viability of the SARS Coronavirus. *Adv. Virol.* *2011*, 734690.

Chang, J.C., Ossoff, S.F., Lobe, D.C., Dorfman, M.H., Dumais, C.M., Qualls, R.G., and Johnson, J.D. (1985). UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* *49*, 1361–1365.

Chehadeh, W., Lobert, P.-E., Sauter, P., Goffard, A., Lucas, B., Weill, J., Vantghem, M.-C., Alm, G., Pigny, P., and Hober, D. (2005). Viral protein VP4 is a target of human antibodies enhancing coxsackievirus B4- and B3-induced synthesis of alpha interferon. *J. Virol.* *79*, 13882–13891.

Chen, N., Zheng, Y., Yin, J., Li, X., and Zheng, C. (2013). Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 in vitro. *J. Virol. Methods* *193*, 470–477.

Chéron, B. (1999). Transferts thermiques: Résumé de cours, problèmes corrigés (Ellipses Marketing).

Chin, S., Jin, R., Wang, X.L., Hamman, J., Marx, G., Mou, X., Andersson, I., Lindquist, L.O., and Horowitz, B. (1997). Virucidal treatment of blood protein products with UVC radiation. *Photochem. Photobiol.* *65*, 432–435.

Chmielewski, R.A., Beck, J.R., and Swayne, D.E. (2011). Thermal inactivation of avian influenza virus and Newcastle disease virus in a fat-free egg product. *J. Food Prot.* *74*, 1161–1168.

Cole, C. (1996). Polyomavirinae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, (Philadelphia, PA, Lippincott-Raven: Fields BN et al.), pp. 1997–2025.

Danner, K., and Mayr, A. (1979). In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus. *Arch. Virol.* *61*, 261–271.

Day, R.S. (1974). Cellular reactivation of ultraviolet-irradiated human adenovirus 2 in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* *19*, 9–13.

Day, R.S. (1974). Studies on repair of adenovirus 2 by human fibroblasts using normal, xeroderma pigmentosum, and xeroderma pigmentosum heterozygous strains. *Cancer Res.* *34*, 1965–1970.

Dichtelmüller, H., Rudnick, D., Breuer, B., Kotitschke, R., Kloft, M., Darling, A., Watson, E., Flehmig, B., Lawson, S., and Frösner, G. (1996). Improvement of virus safety of a S/D-treated factor VIII concentrate by additional dry heat treatment at 100 degrees C. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* *24*, 125–130.

Donaldson, A.I., and Ferris, N.P. (1976). The survival of some air-borne animal viruses in relation to relative humidity. *Vet. Microbiol.* *1*, 413–420.

Donelli, G., Dore, E., Frontali, C., and Grandolfo, M.E. (1975). Structure and physico-chemical properties of bacteriophage G. III. A homogeneous DNA of molecular weight 5 times 10⁸. *J. Mol. Biol.* *94*, 555–565.

Duan, S.-M., Zhao, X.-S., Wen, R.-F., Huang, J.-J., Pi, G.-H., Zhang, S.-X., Han, J., Bi, S.-L., Ruan, L., Dong, X.-P., et al. (2003). Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *Biomed. Environ. Sci. BES* *16*, 246–255.

Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., De Groot, A., Twisk, F., and Koopmans, M. (2004). Inactivation of caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 4538–4543.

Eischeid, A.C., Meyer, J.N., and Linden, K.G. (2009). UV Disinfection of Adenoviruses: Molecular Indications of DNA Damage Efficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 23–28.

Eterpi, M., McDonnell, G., and Thomas, V. (2009). Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J. Hosp. Infect.* *73*, 64–70.

Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005). *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Academic Press).

Fields, B.N., Knipe, D.M., and Howley, P.M. (2007). *Fields virology* (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins).

Fraumeni, J.F., Ederer, F., and Miller, R.W. (1963). An evaluation of the carcinogenicity of simian virus 40 in man. *JAMA* *185*, 713–718.

Gagneur, A., Legrand, M.C., Picard, B., Baron, R., Talbot, P.J., de Parscau, L., and Sizun, J. (2002). [Nosocomial infections due to human coronaviruses in the newborn]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* 9, 61–69.

Geisbert, T.W., and Jahrling, P.B. (1995). Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res.* 39, 129–150.

Geissler, E. (1990). SV40 and human brain tumors. *Prog. Med. Virol. Fortschritte Med. Virusforsch. Prog. En Virol. Médicale* 37, 211–222.

Gerba, C.P., and Rusin, P. (2001). Relationship between the use of antiseptics/disinfectants and the development of antimicrobial resistance. In *Disinfection, Sterilization and Antisepsis: Principles and Practices in Healthcare Facilities*, (Washington, D.C: Rutala WA), pp. 187–194.

Gerba, C.P., Gramos, D.M., and Nwachuku, N. (2002). Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5167–5169.

Gerrity, D., Ryu, H., Crittenden, J., and Abbaszadegan, M. (2008). UV inactivation of adenovirus type 4 measured by integrated cell culture qPCR. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 43, 1628–1638.

Gish, R. (2013). Delta virus infection: epidemiology and initiatives to intercept it. *Gastroenterol. Hepatol.* 9, 589–591.

Goldsmith, C.S., Metcalfe, M.G., Rollin, D.C., Shieh, W.-J., Paddock, C.D., Xu, X., and Zaki, S.R. (2011). Ultrastructural Characterization of Pandemic (H1N1) 2009 Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2056–2059.

Hamilton, M.A., Russo, R.C., and Thurston, R.V. (1977). Trimmed. Spearman-Kärber CPE Method for Estimating Median Lethal Concentration in Toxicity Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* *11*, 714–719.

Harper, G.J. (1961). Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses. *J. Hyg. (Lond.)* *59*, 479–486.

Harper, G.J. (1963). The influence of environment on the survival of airborne virus particles in the laboratory. *Arch. Für Gesamte Virusforsch.* *13*, 64–71.

Harris, G.D., Adams, V.D., Sorensen, D.L., and Curtis, M.S. (1987). Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria. *Water Res.* *21*, 687–692.

Harris, R.E., Coleman, P.H., and Morahan, P.S. (1974). Stability of minute virus of mice to chemical and physical agents. *Appl. Microbiol.* *28*, 351–354.

Hemmes, J.H., Winkler, K.C., and Kool, S.M. (1960). Virus survival as a seasonal factor in influenza and polimyelitis. *Nature* *188*, 430–431.

Hemmes, J.H., Winkler, K.C., and Kool, S.M. (1962). Virus survival as a seasonal factor in influenza and poliomyelitis. *Antonie Van Leeuwenhoek* *28*, 221–233.

Henderson, E., Heston, L., Grogan, E., and Miller, G. (1978). Radiobiological inactivation of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* *25*, 51–59.

Hijnen, W. a. M., Beerendonk, E.F., and Medema, G.J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* *40*, 3–22.

Hober, D., and Sauter, P. (2010). Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 279–289.

Hughes, J.H., Mitchell, M., and Hamparian, V.V. (1979). Rhinoviruses: kinetics of ultraviolet inactivation and effects of UV and heat on immunogenicity. *Arch. Virol.* 61, 313–319.

Hunt, B.A. (1992). Hunt, B. A. (1992). “Ultraviolet dosimetry using microbial indicators and theoretical modelling,” MS thesis, School of Civil Engineering, Purdue University, West Lafayette, Ind. School of civil engineering, Purdue university.

Hurax J. M., Nicolas J. C., Agut H, and Peigue-Lafeuille H. (2003). *Traité de virologie médicale* (Paris: Estem).

Jeong, E.K., Bae, J.E., and Kim, I.S. (2010). Inactivation of influenza A virus H1N1 by disinfection process. *Am. J. Infect. Control* 38, 354–360.

Kallenbach, N.R., Cornelius, P.A., Negus, D., Montgomerie, D., and Englander, S. (1989). Inactivation of viruses by ultraviolet light. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.* 70–82.

Kamolsiripichaiporn, S., Subharat, S., Udon, R., Thongtha, P., and Nuanualsuwan, S. (2007). Thermal inactivation of foot-and-mouth disease viruses in suspension. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7177–7184.

Kang, Y., Chatterjee, N.K., Nodwell, M.J., and Yoon, J.W. (1994). Complete nucleotide sequence of a strain of coxsackie B4 virus of human origin that induces diabetes in mice and its comparison with nondiabetogenic coxsackie B4 JBV strain. *J. Med. Virol.* 44, 353–361.

Kariwa, H., Fujii, N., and Takashima, I. (2004). Inactivation of SARS coronavirus by means of povidone-iodine, physical conditions, and chemical reagents. *Jpn. J. Vet. Res.* 52, 105–112.

Kim, J.Y., Lee, C., Love, D.C., Sedlak, D.L., Yoon, J., and Nelson, K.L. (2011). Inactivation of MS2 coliphage by ferrous ion and zero-valent iron nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6978–6984.

Ko, G., Cromeans, T.L., and Sobsey, M.D. (2005). UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. *Water Res.* 39, 3643–3649.

Kowalski, W. (2010). *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook: UVGI for Air and Surface Disinfection* (Springer Science & Business Media).

Kujundzic, E., Matalkah, F., Howard, C.J., Hernandez, M., and Miller, S.L. (2006). UV air cleaners and upper-room air ultraviolet germicidal irradiation for controlling airborne bacteria and fungal spores. *J. Occup. Environ. Hyg.* 3, 536–546.

Kyi, M.S., Holton, J., and Ridgway, G.L. (1995). Assessment of the efficacy of a low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization system. *J. Hosp. Infect.* 31, 275–284.

Lara, H.H., Ayala-Nuñez, N.V., Ixtapan-Turrent, L., and Rodriguez-Padilla, C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotechnology* 8, 1.

Lazarova, V., and Savoys, P. (2004). Technical and sanitary aspects of wastewater disinfection by UV irradiation for landscape irrigation. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 50, 203–209.

Lewis, A.J. (1973). Experience with SV40 and adenovirus-SV40 hybrids. In *Biohazards in Biological Research*, (NY), pp. 96–113.

Li, D., Gu, A.Z., He, M., Shi, H.-C., and Yang, W. (2009). UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. *Water Res.* 43, 3261–3269.

Lide, D.R. (2007). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (Hardcover: CRC press).

Livingston, R.S., Besselsen, D.G., Steffen, E.K., Besch-Williford, C.L., Franklin, C.L., and Riley, L.K. (2002). Serodiagnosis of Mice Minute Virus and Mouse Parvovirus Infections in Mice by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Baculovirus-Expressed Recombinant VP2 Proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1025–1031.

Lytle, C.D., and Sagripanti, J.-L. (2005). Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *J. Virol.* 79, 14244–14252.

Lytle, C.D., Aaronson, S.A., and Harvey, E. (1972). Host-cell reactivation in mammalian cells. II. Survival of herpes simplex virus and vaccinia virus in normal human and xeroderma pigmentosum cells. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 22, 159–165.

Mahl, M.C., and Sadler, C. (1975). Virus survival on inanimate surfaces. *Can. J. Microbiol.* 21, 819–823.

Mahnel, H. (1987). Experimentelle Ergebnisse über die Stabilität von Pockenviren unter Labor- und Umweltbedingungen. *J. Vet. Med. Ser. B* 34, 449–464.

Mark, J.E. (2007). *Physical Properties of Polymer Handbook* (springer).

Mattle, M.J., and Kohn, T. (2012). Inactivation and tailing during UV254 disinfection of viruses: contributions of viral aggregation, light shielding within viral aggregates, and recombination. *Environ. Sci. Technol.* 46, 10022–10030.

Mbithi, J.N., Springthorpe, V.S., and Sattar, S.A. (1991). Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* *57*, 1394–1399.

McClain, M.E., and Spendlove, R.S. (1966). Multiplicity reactivation of reovirus particles after exposure to ultraviolet light. *J. Bacteriol.* *92*, 1422–1429.

McDevitt, J., Rudnick, S., First, M., and Spengler, J. (2010). Role of absolute humidity in the inactivation of influenza viruses on stainless steel surfaces at elevated temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 3943–3947.

McDonnell, G.E. (2007). *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action, and Resistance* (Washington, D.C: ASM Press).

Meng, Q.S., and Gerba, C.P. (1996). Comparative inactivation of enteric adenoviruses, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water Res.* *30*, 2665–2668.

Meng, Z.D., Birch, C., Heath, R., and Gust, I. (1987). Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* *53*, 727–730.

Mergny, J.-L., and Lacroix, L. (2003). Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides* *13*, 515–537.

Ben Messaoud, A. (2009). *Etude expérimentale et modélisation d'un procédé de désinfection par rayonnement uv.* Ecole Nationale d'Ingénieurs de Tunis et de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Michelson, A.M. (1958). Hyperchromicity and nucleic acids. *Nature* *182*, 1502–1503.

Millhouse, S., Wang, X., Fraser, N.W., Faber, L., and Block, T.M. (2012). Direct evidence that HSV DNA damaged by Ultra Violet (UV) irradiation can be repaired in a cell type dependent manner. *J. Neurovirol.* *18*, 231–243.

Mpandi, M., Schmutz, P., Legrand, E., Duc, R., Geinoz, J., Henzelin-Nkubana, C., Giorgia, S., Clerc, O., Genoud, D., and Weber, T. (2007). Partitioning and inactivation of viruses by the caprylic acid precipitation followed by a terminal pasteurization in the manufacturing process of horse immunoglobulins. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* *35*, 335–341.

Mutsafi, Y., Shimoni, E., Shimon, A., and Minsky, A. (2013). Membrane Assembly during the Infection Cycle of the Giant Mimivirus. *PLoS Pathog.* *9*.

Nagy, P.D., and Simon, A.E. (1997). New Insights into the Mechanisms of RNA Recombination. *Virology* *235*, 1–9.

Najdovski, L., Dragas, A.Z., and Kotnik, V. (1991). The killing activity of microwaves on some non-sporogenic and sporogenic medically important bacterial strains. *J. Hosp. Infect.* *19*, 239–247.

Nuanualsuwan, S., Thongtha, P., Kamolsiripichaiporn, S., and Subharat, S. (2008). UV inactivation and model of UV inactivation of foot-and-mouth disease viruses in suspension. *Int. J. Food Microbiol.* *127*, 84–90.

Nwachuku, N., Gerba, C.P., Oswald, A., and Mashadi, F.D. (2005). Comparative inactivation of adenovirus serotypes by UV light disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 5633–5636.

Nygaard, H., Modahl, I., and Myrmel, M. (2012). Thermal inactivation of infectious pancreatic necrosis virus in a peptone-salt medium mimicking the water-soluble phase of hydrolyzed fish by-products. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2446–2448.

Oberste, M.S. (2008). Comparative genomics of the coxsackie B viruses and related enteroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 323, 33–47.

Pipas, J.M. (2009). SV40: Cell transformation and tumorigenesis. *Virology* 384, 294–303.

Prangishvili, D., Vestergaard, G., Häring, M., Aramayo, R., Basta, T., Rachel, R., and Garrett, R.A. (2006). Structural and genomic properties of the hyperthermophilic archaeal virus ATV with an extracellular stage of the reproductive cycle. *J. Mol. Biol.* 359, 1203–1216.

Reed, S.E. (1975). An investigation of the possible transmission of Rhinovirus colds through indirect contact. *J. Hyg. (Lond.)* 75, 249–258.

Roberts, C., and Antonoplos, P. (1998). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1, hepatitis A virus, respiratory syncytial virus, vaccinia virus, herpes simplex virus type 1, and poliovirus type 2 by hydrogen peroxide gas plasma sterilization. *Am. J. Infect. Control* 26, 94–101.

Rochat, R.H., Liu, X., Murata, K., Nagayama, K., Rixon, F.J., and Chiu, W. (2011). Seeing the Portal in Herpes Simplex Virus Type 1 B Capsids. *J. Virol.* 85, 1871–1874.

De Roda Husman, A.M., Bijkerk, P., Lodder, W., Van Den Berg, H., Pribil, W., Cabaj, A., Gehringer, P., Sommer, R., and Duizer, E. (2004). Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer-wavelength [UV]) and ionizing (gamma) radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5089–5093.

Rombaut, B., Verheyden, B., Andries, K., and Boeyé, A. (1994). Thermal inactivation of oral polio vaccine: contribution of RNA and protein inactivation. *J. Virol.* *68*, 6454–6457.

Rosaspina, S., Salvatorelli, G., Anzanel, D., and Bovolenta, R. (1994). Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios* *78*, 55–59.

Ross, L.J., Wildy, P., and Cameron, K.R. (1971). Formation of small plaques by herpes viruses irradiated with ultraviolet light. *Virology* *45*, 808–812.

Sagripani, J.-L., and Lytle, C.D. (2011). Sensitivity to ultraviolet radiation of Lassa, vaccinia, and Ebola viruses dried on surfaces. *Arch. Virol.* *156*, 489–494.

Sanborn, M.R., Wan, S.K., and Bulard, R. (1982). Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl. Environ. Microbiol.* *44*, 960–964.

Sattar, S.A., Karim, Y.G., Springthorpe, V.S., and Johnson-Lussenburg, C.M. (1987). Survival of human rhinovirus type 14 dried onto nonporous inanimate surfaces: effect of relative humidity and suspending medium. *Can. J. Microbiol.* *33*, 802–806.

Sattar, S.A., Springthorpe, vs, and rochon, M. (1998). A product based on accelerated and stabilized hydrogen peroxide: Evidence for broad-spectrum germicidal activity. *Can. J Infect Control* 123–130.

Sauerbrei, A., and Wutzler, P. (2009). Testing thermal resistance of viruses. *Arch. Virol.* *154*, 115–119.

Savolainen-Kopra, C., and Blomqvist, S. (2010). Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev. Med. Virol.* *20*, 358–371.

Schaffer, F.L., Soergel, M.E., and Straube, D.C. (1976). Survival of airborne influenza virus: effects of propagating host, relative humidity, and composition of spray fluids. *Arch. Virol.* *51*, 263–273.

Scheible, O.K., Casey, M.C., and Forndran, A. (1985). Ultraviolet disinfection of wastewaters from secondary effluent and combined sewer overflows (Water Engineering Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency).

Scheuplein, R.J., and Morgan, L.J. (1967). “Bound water” in keratin membranes measured by a microbalance technique. *Nature* *214*, 456–458.

Seo, K., Lee, J.E., Lim, M.Y., and Ko, G. (2012). Effect of temperature, pH, and NaCl on the inactivation kinetics of murine norovirus. *J. Food Prot.* *75*, 533–540.

Shah, K., and Nathanson, N. (1976). Human exposure to SV40: review and comment. *Am. J. Epidemiol.* *103*, 1–12.

Sharp, D.G., and Kim, K.S. (1966). Multiplicity reactivation and radiation survival of aggregated vaccinia virus. Calculation of plaque titer based on MR and particle aggregation seen in the electron microscope. *Virology* *29*, 359–366.

Shechmeister, I.L. (1950). Studies on the experimental epidemiology of respiratory infections. III. Certain aspects of the behavior of type A influenza virus as an air-borne cloud. *J. Infect. Dis.* *87*, 128–132.

Simon-Loriere, E., and Holmes, E.C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 617–626.

Simons, C., Walsh, S. e., Maillard, J.-Y., and Russell, A. d. (2000). A NOTE: Ortho-Phthalaldehyde: proposed mechanism of action of a new antimicrobial agent. *Lett. Appl. Microbiol.* *31*, 299–302.

Sirikanchana, K., Shisler, J.L., and Mariñas, B.J. (2008). Effect of exposure to UV-C irradiation and monochloramine on adenovirus serotype 2 early protein expression and DNA replication. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 3774–3782.

Sizun, J., Yu, M.W., and Talbot, P.J. (2000). Survival of human coronaviruses 229E and OC43 in suspension and after drying on surfaces: a possible source of hospital-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* *46*, 55–60.

Smirnov, Y.A., Kapitulets, S.P., Amitina, N.N., Ginevskaya, V.A., and Kaverin, N.V. (1991). Effect of UV-irradiation on rotavirus. *Acta Virol.* *35*, 1–6.

Smith, G.L., Vanderplassen, A., and Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* *83*, 2915–2931.

Sobsey, M.D., and Meschke, J.S. (2003). Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin.

http://www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/001/WHO_VirusSurvivalReport_21Aug2003.pdf.

Sommer, R., Weber, G., Cabaj, A., Wekerle, J., Keck, G., and Schauburger, G. (1989). [UV-inactivation of microorganisms in water]. *Zentralblatt Für Hyg. Umweltmed. Int. J. Hyg. Environ. Med.* *189*, 214–224.

Songer, J.R. (1967). Influence of Relative Humidity on the Survival of Some Airborne Viruses. *Appl. Microbiol.* *15*, 35–42.

Stumbo, C.R. (1973). *Thermobacteriology in Food Processing* (Academic Press).

Sweet, B.H., and Hilleman, M.R. (1960). The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 105, 420–427.

Thevenin, T., Lobert, P.E., and Hober, D. (2013). Inactivation of coxsackievirus B4, feline calicivirus and herpes simplex virus type 1: unexpected virucidal effect of a disinfectant on a non-enveloped virus applied onto a surface. *Intervirology* 56, 224–230.

Thomas, Y., Vogel, G., Wunderli, W., Suter, P., Witschi, M., Koch, D., Tapparel, C., and Kaiser, L. (2008). Survival of influenza virus on banknotes. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3002–3007.

Thompson, S.S., Jackson, J.L., Suva-Castillo, M., Yanko, W.A., El Jack, Z., Kuo, J., Chen, C.-L., Williams, F.P., and Schnurr, D.P. (2003). Detection of infectious human adenoviruses in tertiary-treated and ultraviolet-disinfected wastewater. *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* 75, 163–170.

Thurston-Enriquez, J.A., Haas, C.N., Jacangelo, J., Riley, K., and Gerba, C.P. (2003). Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 577–582.

Tree, J.A., Adams, M.R., and Lees, D.N. (2005). Disinfection of feline calicivirus (a surrogate for Norovirus) in wastewaters. *J. Appl. Microbiol.* 98, 155–162.

Wang, Y., and Casadevall, A. (1994). Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3864–3866.

Wang, C.H., Tschen, S.Y., and Flehmig, B. (1995). Antigenicity of hepatitis A virus after ultra-violet inactivation. *Vaccine* 13, 835–840.

Wang, J., Mauser, A., Chao, S.-F., Remington, K., Treckmann, R., Kaiser, K., Pifat, D., and Hotta, J. (2004). Virus inactivation and protein recovery in a novel ultraviolet-C reactor. *Vox Sang.* 86, 230–238.

Ward, R.L., and Ashley, C.S. (1979). pH modification of the effects of detergents on the stability of enteric viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 314–322.

Webb, S.J., Bather, R., and Hodges, R.W. (1963). The Effect of Relative Humidity and Inositol on Air-Borne Viruses. *Can. J. Microbiol.* 9, 87–92.

Weiss, M., and Horzinek, M.C. (1986). Resistance of Berne virus to physical and chemical treatment. *Vet. Microbiol.* 11, 41–49.

Welt, B.A., Tong, C.H., Rossen, J.L., and Lund, D.B. (1994). Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 482–488.

Whitley, R.J., and Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357, 1513–1518.

Wichelhaus, A., Bader, F., Sander, F.G., Krieger, D., and Mertens, T. (2006). Effective disinfection of orthodontic pliers. *J. Orofac. Orthop. Fortschritte Kieferorthopädie Organ Official J. Dtsch. Ges. Für Kieferorthopädie* 67, 316–336.

Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., and Kohn, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12069–12078.

Willwand, K., Baldauf, A.Q., Deleu, L., Mumtsidu, E., Costello, E., Beard, P., and Rommelaere, J. (1997). The minute virus of mice (MVM) nonstructural protein NS1 induces

nicking of MVM DNA at a unique site of the right-end telomere in both hairpin and duplex conformations in vitro. *J. Gen. Virol.* 78, 2647–2655.

Wolff, M.H., and Schneeweis, K.E. (1973). [UV inactivation of Herpes simplex viruses, types 1 and 2]. *Zentralblatt Für Bakteriol. Parasitenkd. Infekt. Hyg. Erste Abt. Orig. Reihe Med. Mikrobiol. Parasitol.* 223, 470–477.

Yang, W., Elankumaran, S., and Marr, L.C. (2012). Relationship between humidity and influenza A viability in droplets and implications for influenza's seasonality. *PloS One* 7, e46789.

Závodová, Z., and Libíková, H. (1975). Comparison of the sensitivity to ultraviolet irradiation of reovirus 3 and some viruses of the Kemerovo group. *Acta Virol.* 19, 88–90.

ANNEXES

Annexe 1 : article publié par “Microbes and Environments”

Viruses Contained in Droplets Applied on Warmed Surface Are Rapidly Inactivated

SWAN FIRQUET, SOPHIE BEAUJARD, PIERRE-EMMANUEL LOBERT, FAMARA SANÉ, DELPHINE CALOONE, DANIEL IZARD and DIDIER HOBER.

Abstract

Heat inactivation of viruses was reported, however, the thermal resistance of viruses in droplets has not been studied. The aim of this study was to evaluate the pattern of heat resistance of minute virus of mice (MVM), coxsackievirus B4 (CVB4), influenza A virus (H1N1), and herpes simplex virus type 1 (HSV-1) contained in droplets.

Four μL droplets containing viruses ($> 10^{4.5}$ TCID₅₀) were applied onto warmed surface obtained by using a self-made heating device. Viral suspensions were exposed to temperatures ranging from 70 to 130°C for 0 to 90 min depending on the virus, and then the recovered viral preparations were tittered. Inactivation rates were calculated from curves that were analysed according to the first order kinetics model.

Full inactivation was obtained for MVM in 90 min at 80°C and in 2 s at 130°C, for H1N1 in 14 s at 70°C and in 1s at 110°C, for CVB4 and HSV-1 in 5s and 7s respectively at 70°C and in 1 s at 100°C. Clearly, MVM was more resistant than H1N1 that was more resistant than HSV-1 and CVB4, which was reflected by increasing inactivation rates.

The impact of short time exposure to heat onto the infectivity of viruses contained in a small volume of suspension has been determined. For the first time, the inactivation of viral particles contained in drops exposed to temperatures higher than 100°C has been investigated. It appears that heating can have an unexpected faster virucidal effect than previously described.

Annexe 2 : Article en révision favorable

Survival of Enveloped and Non-Enveloped Viruses on Surface

SWAN FIRQUET, SOPHIE BEAUJARD, PIERRE-EMMANUEL LOBERT, FAMARA SANÉ, DELPHINE CALOONE, DANIEL IZARD and DIDIER HOBER.

Abstract

In the present study we evaluated the viability on surface of non-enveloped viruses, minute virus of mice (MVM), and coxsackievirus B4 (CVB4), and enveloped-viruses, influenza A virus (H1N1), and herpes simplex virus type 1 (HSV-1). The impact of initial concentration of proteins and sodium chloride onto the persistence of infectious CVB4 on surface has been investigated. Fifty μL of viral suspension ($> 10^{4.5}$ TCID₅₀), were applied onto petri dish lids and dried under air flow of biosafety cabinet. The recovered viral preparations were titered on appropriate cell lines. Enveloped viruses persisted for less than 5 days while CVB4 and MVM persisted for weeks. However, repetitive cycles of drying and resuspension had more virucidal effect on CVB4 than on H1N1 and HSV-1. No effect of these repetitive cycles on infectious titer of MVM was recorded. When exposed to drying, initial concentrations of bovine serum albumin (from 0 to 90mg/mL), foetal calf serum (from 0 to 100%) and sodium chloride (from 0 to 300 mg/mL) had an impact on viability of CVB4. In a protein rich medium, CVB4 was more likely inactivated by drying whereas in presence of sodium chloride the impact of drying was reduced. In conclusion the resistance of viruses toward drying, as suggested by iterative drying, is not due to a heterogeneity of viral subpopulations, but it can be influenced by media composition and component concentrations, as illustrated in the model of CVB4.