



## ➤ Coronavirus et procédés de biotechnologies environnementales

Ariane Bize

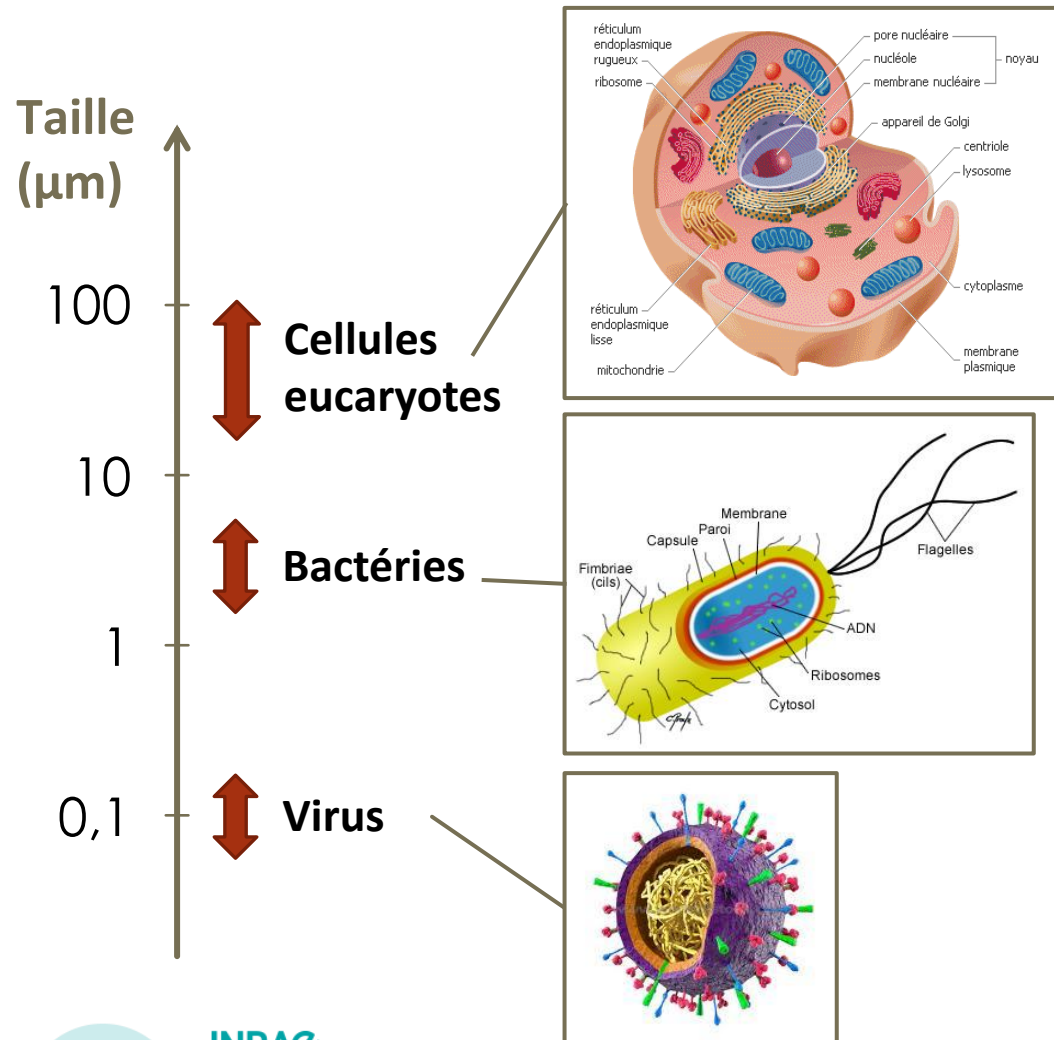
Unité PROSE (Procédés biotechnologiques au service de l'environnement)

Antony, 92

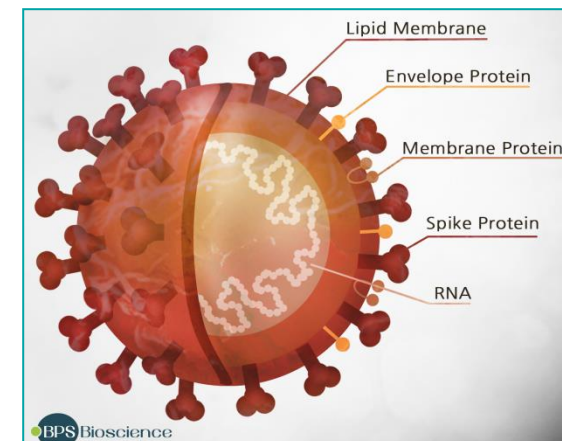
[ariane.bize@inrae.fr](mailto:ariane.bize@inrae.fr)

# ➤ Fondamentaux des virus

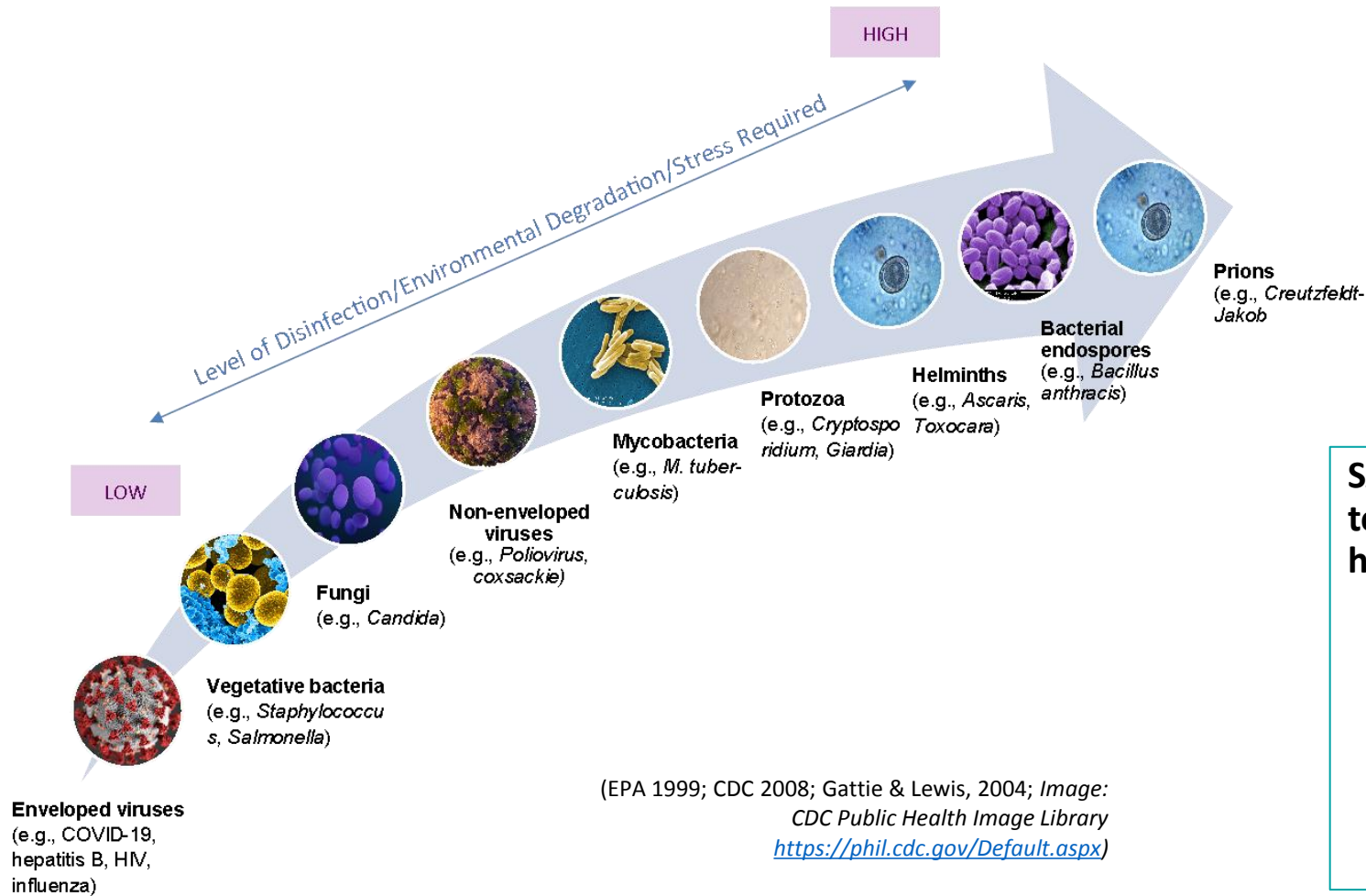
Basé sur des diapositives de Marianne de Paepe



- Virus = entités biologiques de petite taille (~20-150 nm)
- Particule virale composée :
  - du matériel génétique
  - d'une coque contenant des protéines, appelée capside
- Les virus ont besoin d'un hôte cellulaire pour se reproduire
- SARS-CoV-2, le virus responsable du COVID-19
  - Appartient à la famille Coronaviridae
  - Diamètre d'environ 120 nm
  - Matériel génétique sous forme d'ARN
  - Les particules virales sont enveloppées
  - Taux de mutation relativement faible



## ➤ Les virus enveloppés sont parmi les moins stables des pathogènes



**SARS-CoV-2 est par exemple sensible à la température, aux détergents et aux désinfectants habituels**

- Temps caractéristique de persistance du caractère infectieux (TCID<sub>50</sub>) selon la température (*Chin et al, 2020*):
  - 4°C → 2 semaines,
  - 20°C → quelques jours à 1 semaine
  - 70°C → une à quelques minutes

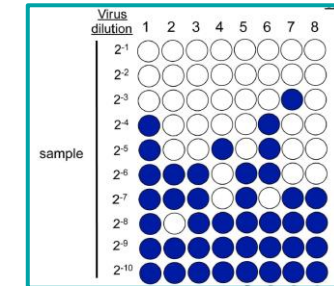
# ➤ Méthodes de quantification

Basé sur des diapositives de Marianne de Paepe

- **Méthodes de quantification**

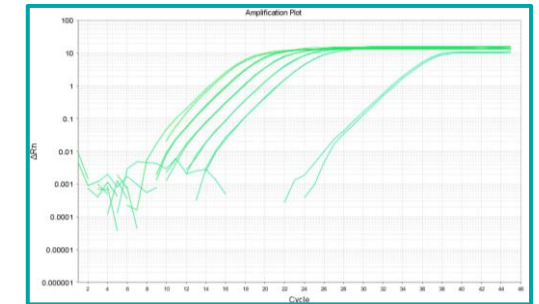
- **Nombre de particules virales infectieuses**

- Unité :  $TCID_{50}$  = nombre de virus nécessaire pour infecter 50% des cultures cellulaires (nécessite un laboratoire de très haut niveau de sécurité)



- **Nombre de copies d'ARN viral**

- Méthode : Transcription inverse suivie d'une PCR quantitative (RT-qPCR)



- **Attention, ces deux méthodes ne sont pas équivalentes**

- Pour le SARS-COV-2, les dénombrements rapportés par  $TCID_{50}$  ont tendance à être beaucoup plus faibles que les mesures par RT-qPCR
- En effet, un composant d'une particule virale peut être endommagé, si bien que l'ARN est détecté mais que la particule virale n'est plus infectieuse

## ➤ Concentrations chez un malade

Basé sur des diapositives de Marianne de Paepe

### Concentration

valeurs maximales observées après diagnostic  
(Woelfel et al. 2020; Kim et al. 2020; Pan et al. 2020)

Rhinopharynx :  $10^6$ - $10^9$  ARN/frottis

Gorge :  $10^4$ - $10^8$  ARN/frottis

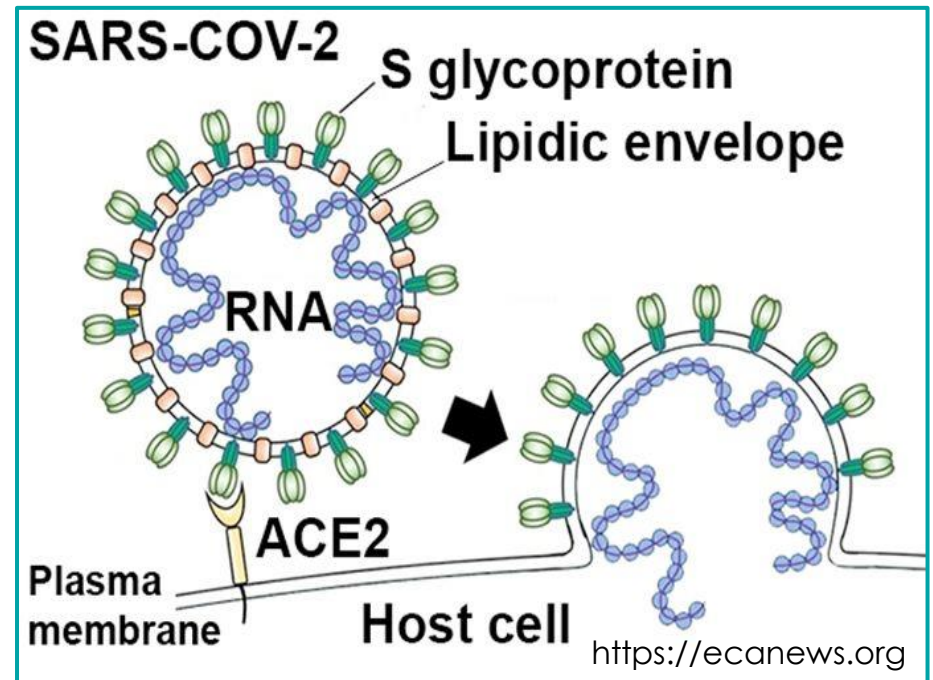
Selles :  $10^4$ - $10^8$  ARN/g

(Gupta et al, 2020; Zhang et al 2020; Wang et al, 2020)

Expectorations :  $10^6$ - $10^{11}$  ARN/mL

Le comptage d'ARN peut sensiblement surestimer la quantité de virions infectieux

SARS-CoV-2 peut se répliquer dans des cellules de l'intestin grêle, appelées entérocytes (étude en laboratoire sur des organoïdes de l'intestin grêle) (Lamers et al, 2020)



ACE2= Angiotensin-converting enzyme 2

## ➤ Présence du génome de SARS-CoV-2 dans les eaux usées

Plusieurs études préliminaires attestent de la présence d'ARN viral dans les eaux usées

- Plusieurs études préliminaires dans différents pays rapportent la présence d'ARN de SARS-CoV-2 dans les eaux usées (qRT-PCR), par exemple en Australie ([Ahmed et al, 2020](#)), en Espagne ([Randazzo et al, 2020](#)), aux Etats-Unis ([Wu et al, 2020](#)), aux Pays-Bas ([Medema et al, 2020](#)), en Italie ([La Rosa et al, 2020](#)) et en France ([Wurtzer et al, 2020](#)).
- Pour la région parisienne ([Wurtzer et al, 2020](#)), des concentrations maximales de l'ordre de  $10^6$  -  $10^7$  copies de génome mL<sup>-1</sup> ont été mesurées, et de l'ordre de  $10^3$  -  $10^4$  copies de génome mL<sup>-1</sup> après le pic épidémique.
- L'un des intérêts/objectifs d'une partie de ces études est de réfléchir à la mise en place d'une surveillance épidémiologique à partir des eaux usées, afin d'anticiper d'éventuelles reprises de l'épidémie.
- Ceci pose aussi la question des risques :
  - Pour les personnes travaillant au sein des stations d'épuration ou avec des boues et effluents issus de station d'épuration ;
  - Associés à l'épandage des boues de station d'épuration.

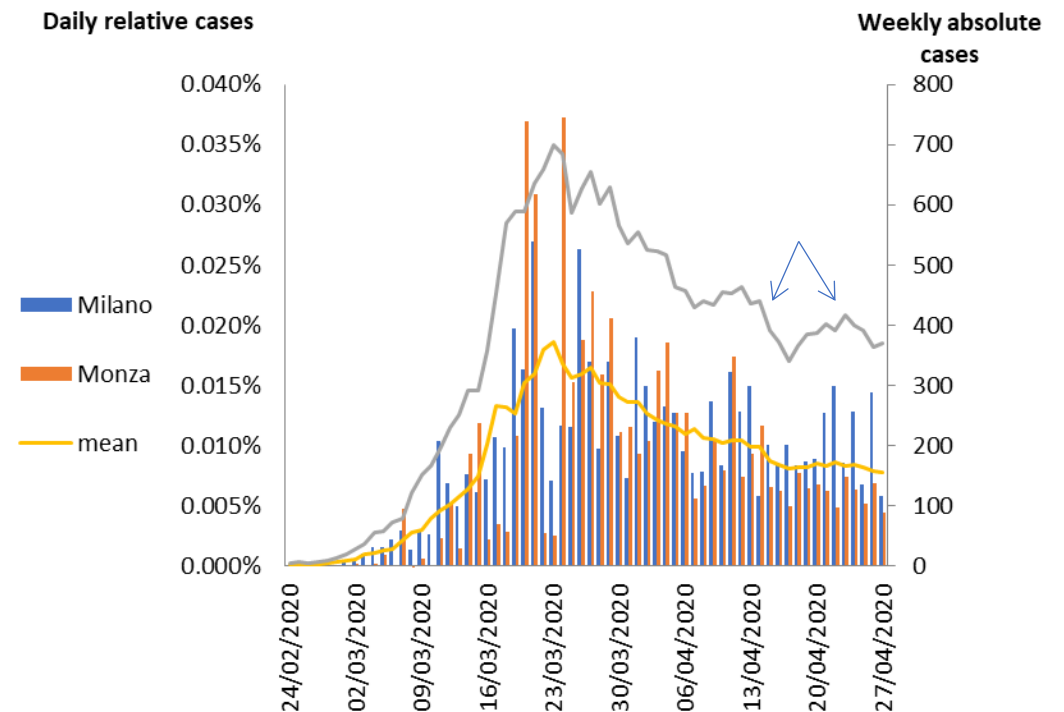
➔ Y-a-t-il présence de particules virales infectieuses dans les eaux usées ? ➔ Très peu de données actuellement.



## ➤ Caractère infectieux de SARS-CoV-2 dans les eaux usées ?

Quelques données préliminaires sont disponibles, plus d'études seraient nécessaires

- Des résultats préliminaires sont disponibles pour la région de Milan (*Rimoldi et al, 2020*), dans le Nord de l'Italie (un des endroits du pays les plus touchés par l'épidémie).
  - 3 STEP couvrant la totalité de l'agglomération
  - Eaux usées brutes, eaux traitées, eaux de rivières en aval de l'agglomération
  - 8 échantillons par point de temps, et 2 points de temps (14 avril 2020, 22 avril 2020)
  - Des détections positives par RT-qPCR dans les eaux usées brutes et les eaux de rivières, pas dans les eaux traitées.
  - Aucun caractère infectieux observé sur des cultures cellulaires**
  - Mais nombre limité d'échantillons et de points de temps**



## ➤ Stabilité de SARS-CoV-2 dans les eaux usées ?

Des données sont disponibles pour d'autres coronavirus

- Une persistance des particules infectieuses de SARS-CoV-1 de seulement 2 jours à 20°C dans des eaux usées domestiques (au moins 7 jours pour le génome, [Wang et al, 2005](#))
- Une persistance des particules infectieuses pendant 2 à 4 jours (T99.9) pour d'autres coronavirus à 23°C ([Gundy et al, 2009](#))
  - Feline infectious peritonitis virus (FIPV)
  - Human coronavirus 229E (HCoV)



## ➤ Présence et stabilité de SARS-CoV-2 et d'autres coronavirus au sein des procédés de biotechnologie environnementale ?

Etudes de détection de génome, manque d'études sur le caractère infectieux des particules virales

### **Boues de STEP, pour SARS-CoV-2**

- $\sim 10^3 - 5 \times 10^5$  copies ARN/mL détectées dans des boues primaires (RT-qPCR, preprint [Peccia et al, 2020](#))
- $\sim 10^4 - 4 \times 10^4$  copies ARN/L détectées dans des boues primaires et secondaires (preprint de [Kokameni et al, 2020](#))
- Après un traitement secondaire (boues activées), 11% d'échantillons positifs, et 100% de négatif après un traitement tertiaire, contre 83% d'échantillons positifs en entrée (total de 72 échantillons analysés dans cette étude) (RT-qPCR, preprint de [Randazzo et al, 2020](#))

**Après méthanisation mésophile, pour d'autres coronavirus**, cela dépend des études.

- Génomes de HCoV-229E and HCoV-HKU1 détectés ([Bibby et al. 2011](#)) dans des boues de STEP digérées (35-37 °C, temps de séjour de 15 jours, déshydratation mécanique) (métagénomique shotgun)
- Génome de HCoV-HKU1 à nouveau détecté dans une étude ultérieure ([Bibby and Peccia, 2013](#))
- Analyse des entrées et sorties de 7 méthaniseurs localisés aux Etats-Unis, dont 5 à la ferme ([Burch et al, 2018](#)). Par RT-qPCR, le coronavirus bovin est détecté dans 59% des échantillons d'entrée (total de 118) et n'est jamais détecté dans les échantillons de sorties (total de 116)

**Etude en laboratoire du compostage** de carcasses de porcelets infectées par le le PEVD (porcine epidemic diarrhea virus, Alphacoronavirus) ([Vitosh-Sillman et al, 2017](#)) → génome viral non détecté par RT-qPCR à l'issue de chaque cycle de compostage

## ➤ Recommandations très récentes sur le stockage des boues de STEP en Italie

Italie, Istituto Superiore di Sanità, INIH :

durée de stockage recommandée en fonction de la température de stockage

$$\text{MRT} = 0.4 \times T^2 - 55 \times T + 1800$$

MRT = temps minimum de rétention en heures

T = température en °C

- 30°C → ~ 21 jours
  - 35°C → ~ 15 jours
- Ceci peut correspondre aux temps de séjours pratiqués lors de la méthanisation mésophile
- 10°C → ~ 54 jours !!
  - 50°C → ~ 2 jours

*INIH, 2020. Interim indications on the management of sewage sludge for the prevention of the spread of the SARS-CoV-2 virus (In Italian). Rome, Italy.*

## ➤ Take-home messages

- SARS-CoV-2 est un virus enveloppé
- Moins stable que les virus non-enveloppés
- Présence du génome  $\neq$  présence de particules virales infectieuses
- SARS-CoV-2 présent dans les selles des malades → peut être présent dans les eaux usées
- Concernant les procédés de biotechnologies environnementales, quelques études préliminaires sur la présence du génome de SARS-CoV2
- Mais manque d'étude sur le caractère infectieux des particules virales en sortie de procédé
- La stabilité des coronavirus dans les eaux usées semble limitée
- Certains pays commencent à émettre des recommandation concernant les bonnes pratiques de stockage des boues de STEP susceptibles de contenir des particules virales de SARS-CoV-2

