

Référence: BAFU-217.23-64634/7

20 Décembre 2022

Rapport final

Concerne la demande B21003 : Dissémination expérimentale d'entérovirus humains dans le lac Léman par l'Institut d'Ingénierie de l'Environnement de l'Ecole polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL).

1. Déroulement effectif de l'essai

1.1 Installation et test du site d'amarrage

Les chambres étaient amarrées sur le site de la plateforme LÉXPLORE, plateforme expérimentale flottante dans le lac Léman (<https://lexplore.info/fr/accueil/>). La plate-forme est ancrée à 570 m du rivage et flotte au-dessus d'une colonne d'eau de 110 m de profondeur. Le périmètre de la plate-forme est délimité par des bouées sur un diamètre de 70 m (Figure 1 A). Chaque chambre était amarrée à une bouée du périmètre avec des cordages résistant à des forces équivalentes à 1600 kg, et lestée de 10 kg de plomb ou de briques, distante d'au moins cinq mètres de la chambre la plus proche. Les chambres étaient attachées à la corde à une profondeur de 6 m ou 15 m avec des manilles métalliques en deux points, de manière à ce que la tension du poids ne s'applique pas sur la chambre (voir Figure 1 D).

Pour tester si les chambres pouvaient supporter d'être amarrées cinq jours dans l'eau, une chambre a été remplie de 25 mg.L⁻¹ de bleu de méthylène dans l'eau du lac, et amarrée à 2 m ou 20 m de profondeur pendant 5 jours. Au bout de 5 jours, la chambre a été collectée et examinée visuellement pour détecter les dommages potentiels à la chambre ou à la membrane.

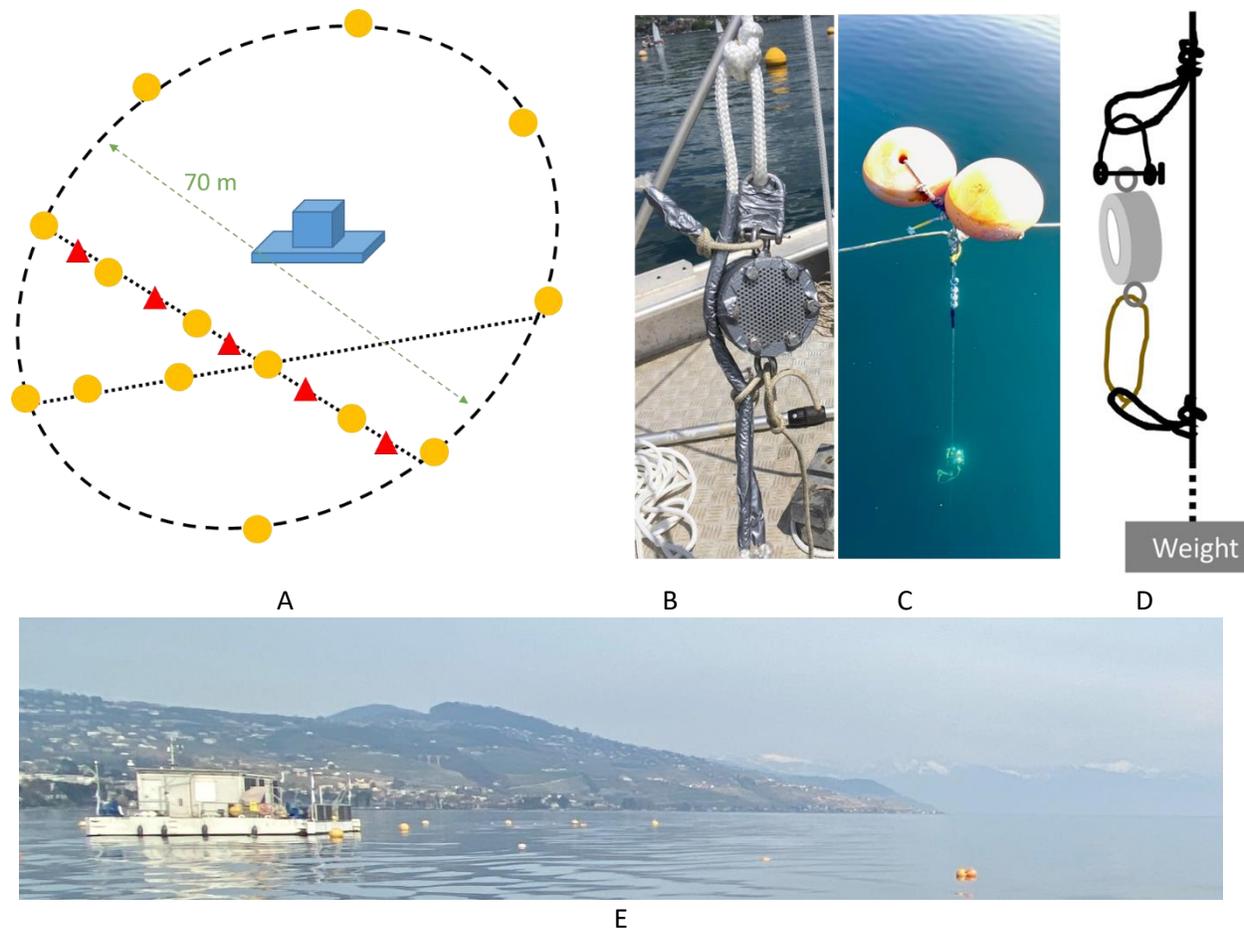


Figure 1 : Configuration sur le terrain. (A) schéma du site d'amarrage des chambres à la plate-forme Lexplore, les cercles jaunes sont les bouées principales des périmètres de la plate-forme, et les triangles rouges sont les bouées retenant les chambres, attachées aux chaînes entre les bouées principales. (B) protection de la chambre et de la corde avant déploiement, pour éviter la détérioration par frottement. (C) Image d'une chambre d'essai déployée à 2 m de profondeur. Cette profondeur a été sélectionnée à des fins de test uniquement. Dans les expériences, des profondeurs de 6 m et 15 m ont été utilisées. (D) fixation de la chambre à la corde pour éviter les tensions dues au poids. (E) Image de la plateforme LÉXPLORE.

1.2 Déroulement des expériences : préparation des échantillons et amarrage des chambres

Trois expériences d'inactivation dans le lac Léman ont été réalisées : les expériences « hivernales » ont duré du 1er au 3 mars 2022 (expérience 1) et du 9 au 14 mars 2022 (expérience 2). L'expérience de « printemps » s'est déroulée du 15 au 20 juin 2022 (expérience 3). Les huit sérotypes d'entérovirus ont été mélangés dans une solution à des concentrations égales 6 à 45 heures avant le début de l'expérience et ont été stockés à 4 °C. Un jour avant l'expérience, l'eau du lac a été recueillie sur la plate-forme, à la profondeur à laquelle les chambres seraient amarrées. L'eau du lac a été ramenée au laboratoire dans un récipient réfrigéré. Une partie a été stérilisée en la chauffant pendant une heure à 65°C. Les échantillons d'eau stérilisés et biologiquement actifs ont été stockés à 4°C pendant un maximum de 24 heures avant utilisation. Le jour de l'expérience, la solution d'entérovirus a été ajoutée dans l'eau du lac biologiquement active à une concentration finale de 8.2×10^4 , 1.1×10^5 , 2.5×10^5 MPN.L⁻¹ par sérotype dans les expériences 1, 2 et 3 respectivement. 20 ml de la solution virale dans l'eau du lac ont été immédiatement remplis dans chaque chambre et les chambres ont été scellées et placées dans une boîte de transport de sécurité biologique sur de la glace. Elles ont ensuite été transportées jusqu'à la plate. Une fois sur le site d'amarrage, les chambres ont été sorties de leur boîte, attachées à une corde et immédiatement immergées dans le lac. Une corde maintenait soit une chambre à 15 m de profondeur (expériences 1 et 2), soit une chambre à 6 m de profondeur et une à 15 m de profondeur (expérience 3). Les cordes ont été retirées du lac après 48 heures ou cinq jours, et les chambres ont été détachées, placées dans une boîte de transport individuelle de sécurité biologique dans de la glace, et ont été ramenées au laboratoire. Le volume d'échantillon dans chaque chambre a été mesuré à la fin de l'expérience pour évaluer la dilution due à l'échange avec le milieu lacustre à travers les membranes. Ensuite, les échantillons ont été congelés à -20 °C dans les 4 heures suivant le prélèvement. Des chambres en double ou en triple ont été déployées pour chaque combinaison de profondeur et de temps d'exposition.

Une solution tampon (PBS) et de l'eau de lac stérile (dans les expériences 2 et 3 uniquement) ont été dopées à la même concentration de virus que les chambres. Des réacteurs scellés à l'abri de la lumière contenant la solution de virus dans du PBS et de l'eau du lac stérile ont été placés au réfrigérateur à 4° pour l'expérience 1 et 2, et dans une pièce thermorégulée à 20°C pour l'expérience 3. Ces réacteurs ont servi comme témoins pour l'inactivation thermique (PBS) et pour l'inactivation thermique plus chimique (eau de lac stérile). Tous les échantillons de lac et de contrôle ont été stockés pendant un maximum de quatre mois avant d'être analysés.

2. Mesures de sécurité

Les protocoles suivants de sécurité ont été suivis durant les expériences afin de limiter les risques d'infection. À noter que nous n'avons à aucun moment été confrontés à une membrane percée/chambre endommagée bien qu'un protocole pour ces situations soit présenté ici.

Les chambres sont fermées par des membranes retenant les virus et une grille protégeant les membranes. C'est la première couche de confinement. Elles sont ensuite enfermées dans des récipients individuels de transport homologués pour le transport de matériel biologique et n'en sont sorties qu'au dernier moment lors de l'amarrage. Lors de la manipulation des chambres, nous portons une blouse de biosécurité pour protéger nos vêtements, des lunettes, ainsi que des gants, au cas où il resterait des traces de virus et pour bien distinguer l'environnement potentiellement contaminé (la chambre) du reste. Nous gardons les gants pour descendre et remonter la corde, puis les gants sont retirés pour manipuler le matériel « propre ». Nous nous désinfectons les mains après manipulation des chambres, et le matériel que nous

avons touché avec les gants. Les blouses sont jetables afin de pouvoir être jetées après le travail de terrain. Une poubelle contenant un sac à déchets biologique pouvant être scellé est toujours présente sur le terrain afin de pouvoir y jeter les blouses ou le matériel contaminé. Dans le cas extrême d'un relargage de virus (ex : choc, la membrane se perce) lors de la pose, on endigue le relargage : pose de la chambre dans son container ou sur le sol dans un premier temps. Pour les surfaces, essuyer le liquide, puis désinfecter les surfaces qui ont été en contact avec les virus avec de la javel. Retirer les vêtements qui ont été souillés et les mettre dans le sac poubelle de confinement P2. S'il y a eu contact avec la peau, essuyer et désinfecter avec le désinfectant à mains, ou essuyer et rincer abondamment si c'est une zone qui ne peut pas être désinfectée.

Lors de la récupération, nous procédons comme si l'on considérait que la chambre s'était ouverte. Nous plaçons la corde sortie de l'eau et les chambres directement dans une caisse, afin de définir une zone potentiellement contaminée qui permet un endiguement et une désinfections faciles dans le cas où la chambre s'est ouverte dans l'eau. Une fois la chambre sortie, détachée et séchée, elle est enfermée dans un récipient individuel de transport homologué pour le transport de matériel biologique. Dans le cas où la chambre est ouverte, on sèche ce qui coule, on enferme la chambre dans sa boîte de transport, on désinfecte la corde et la caisse avec de la javel, ainsi que le matériel et les surfaces potentiellement souillés (démanteleur, pinces, mousqueton, etc...), on jette les blouses, les gants et tout consommable souillé et on se désinfecte bien les mains. Il faut garder en tête que si la chambre s'est ouverte dans le lac, une bonne partie des virus s'est déjà diffusée dans le lac au moment où on la remonte sur le bateau, il y a beaucoup de dilution.

À noter que les souches d'entérovirus utilisées se transmettent principalement par l'ingestion de virus (ingestion d'eau contaminée ou contact main-bouche avec des mains souillées). On limite donc énormément les contaminations en se lavant et désinfectant bien les mains et en étant conscients de la localisation des surfaces contaminées.

Toutes ces mesures ont pu être mises en place et ont été efficaces. La seule amélioration à faire est l'attention au risque lié à la chaleur lors du travail sur le lac avec des blouses de sécurité. Il est préférable de travailler à des horaires durant lesquels il ne fait pas trop chaud. Si ce n'est pas possible, il est peut-être préférable de porter des vêtements que l'on peut changer et confiner immédiatement après l'expérience plutôt qu'une blouse pour éviter les coups de chaleur.

3. Écarts par rapport au déroulement prévu de l'essai

Les écarts par rapport au déroulement prévu de l'essai et leur évaluation du point de vue du risque ont été les suivants :

Calendrier pour la récupération des chambres

Au lieu de récupérer une ligne chaque jour pendant 4 jours, nous avons récupéré deux ou trois lignes à la fois après 48 h et 5 jours. Cela n'a pas eu d'influence sur le risque, puisque les tests de résistance de la chambre dans le lac avaient été réalisés sur 5 jours.

Profondeur d'amarrage

Il était prévu d'amarrer les chambres à 2 m et 15 m de profondeur. Néanmoins, plusieurs tests réalisés avec des chambres contenant du bleu de méthylène ont montré qu'à 2 m de profondeur, les membranes étaient susceptibles d'être endommagées, notamment par temps venteux. L'amarrage a donc été fait à 6 m de profondeur plutôt que 2 m, afin de se situer sous la ligne des vagues tout en permettant un gradient

de température entre les deux profondeurs étudiées. Nous avons donc réduit le risque par rapport au déroulement prévu. Il serait probablement possible de placer les chambres plus proches de la surface, à 3 ou 4 m de profondeur, moyennant des tests préalables sans virus, mais nous avons préféré être conservateurs.

4. Résultats et conclusions de la surveillance

L'inactivation a été observée pour tous les sérotypes au cours d'au moins une saison, mais des différences dans les schémas d'inactivation ont été observées entre les saisons (Figure 3). Lorsqu'ils sont immergés dans la colonne d'eau à 15 m de profondeur, les coxsackievirus A9, B3, B4 et B5 (CVA9, CVB3, CVB4 et CVB5) sont plus facilement inactivés au printemps, tandis que les échovirus 25 et 30 (E25 et E30) sont plus facilement inactivés en hiver. La température moyenne de l'eau à 15 m de profondeur était d'environ 7 °C en hiver et de 13 °C au printemps. À ces températures, l'activité microbienne devrait être faible, bien que les contrôles de l'eau stérile du lac aient montré que, à quelques exceptions près, peu de l'inactivation observée pouvait être attribuée à l'inactivation thermique ou chimique (Figure 2 vs Figure 3), ce qui suggère que l'inactivation est principalement microbienne.

Des différences de persistance du virus ont également été observées en fonction de la profondeur de l'eau (Figure 4). Au printemps, l'inactivation à 6 m de profondeur était égale ou supérieure à l'inactivation à 15 m de profondeur pour tous les sérotypes, même si les différences observées étaient pour la plupart subtiles et non significatives statistiquement. Tout comme dans l'eau plus profonde, l'inactivation à 6 m ne peut pas être expliquée par une inactivation chimique ou thermique (Figure 2 vs Figure 4), et est donc probablement médiée par des micro-organismes dans le lac. L'inactivation plus importante à 6 m de profondeur peut alors s'expliquer soit par l'augmentation attendue de l'activité microbienne de 13 °C à une moyenne de 18 °C, soit par des différences dans la composition de la communauté microbienne à différentes profondeurs d'eau, ou une combinaison des deux. Nos résultats montrent que globalement, une température plus élevée - due à la saison ou à la profondeur du mouillage - a entraîné une inactivation accrue pour la plupart des sérotypes.

Nous avons trouvé une large plage d'inactivation parmi les sérotypes, à la fois au printemps et en hiver (Figure 5). Fait intéressant, les sensibilités relatives des différents sérotypes variaient entre l'hiver et le printemps. Intuitivement, cela suggérerait un changement dans les principales causes environnementales de l'inactivation, avec un passage d'une inactivation plus chimique en hiver à une inactivation microbienne au printemps. Cependant, nos résultats ont montré que seule l'inactivation de CVB1 pouvait être expliquée par une inactivation chimique et thermique en hiver (Figure 2). Des tests supplémentaires sont nécessaires pour comprendre l'effet des saisons sur les différents sérotypes. La cause sous-jacente peut être associée à des changements dans la composition de la population microbienne entre les deux saisons.

Cette étude montre que la saison est un facteur important régissant l'inactivation des entérovirus dans le lac. Elle montre en outre que la persistance des différents sérotypes varie fortement, mais que la persistance relative des sérotypes dépend de la saison. En conséquence, les populations d'entérovirus dans le lac devraient être dominées par différents sérotypes selon la saison (bien que la composition finale de la population soit également déterminée par les taux d'excrétion spécifiques au sérotype et l'efficacité d'élimination pendant le traitement des eaux usées). Indépendamment de la saison, l'inactivation observée dans le lac s'est avérée être principalement microbienne.

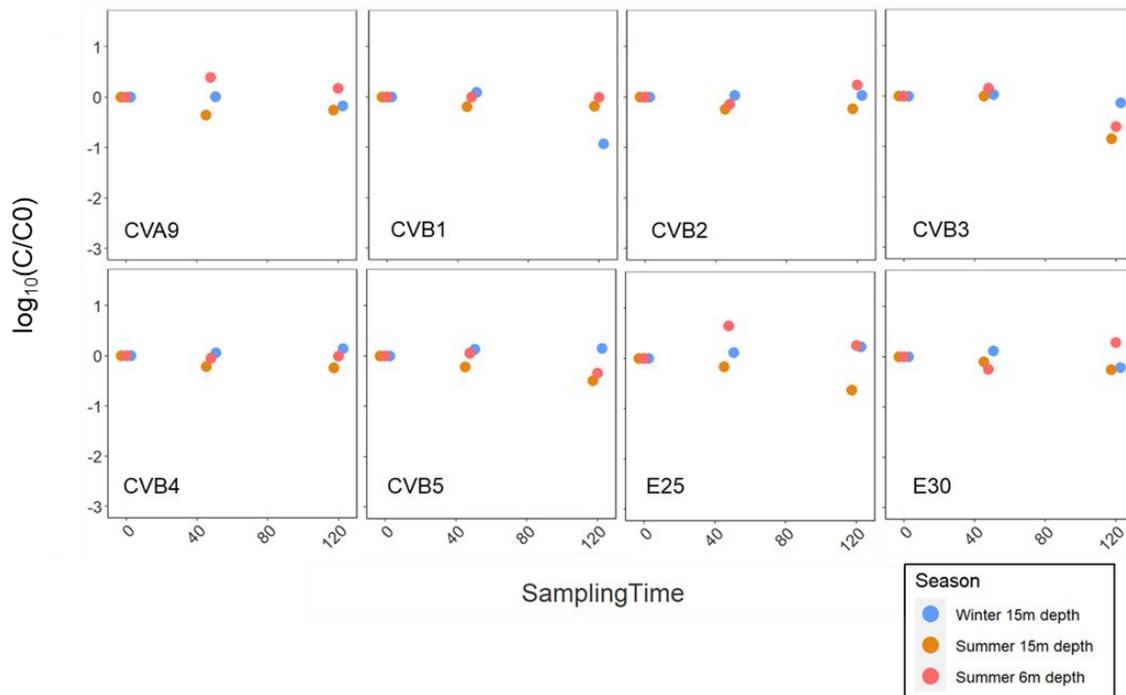


Figure 2 : Inactivation (mesurée en $\log_{10}(C/C_0)$) des huit sérotypes dans des contrôles d'eau de lac stérile pour les expériences de lac. En hiver, les contrôles ont été placés au réfrigérateur à 4 °C ; au printemps, le témoin est placé dans une pièce thermorégulée à 20 °C. Pour l'hiver, le contrôle du lac stérile n'a été fait que pour l'expérience 2.

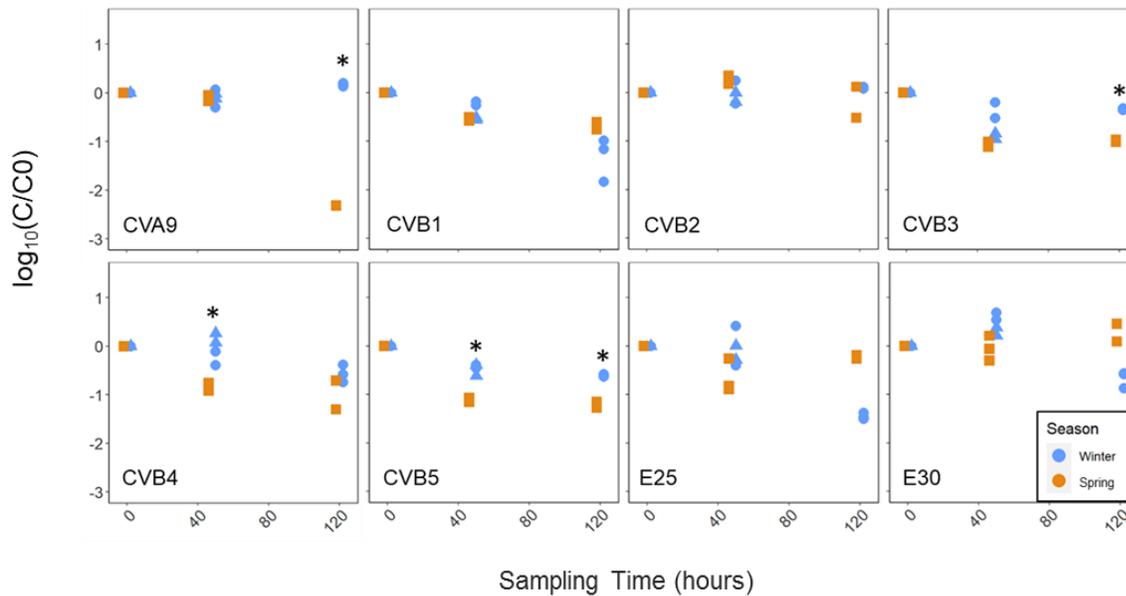


Figure 3 : Inactivation (mesurée en $\log_{10}(C/C_0)$) hiver vs printemps de chaque sérotype dans les chambres à 15 m de profondeur. Les carrés correspondent à l'expérience 3 (campagne de printemps), tandis que les triangles et les points correspondent respectivement aux expériences 1 et 2 (campagne d'hiver). Les étoiles noires indiquent une différence significative (à la fois statistiquement et biologiquement) entre l'inactivation au printemps et en hiver.

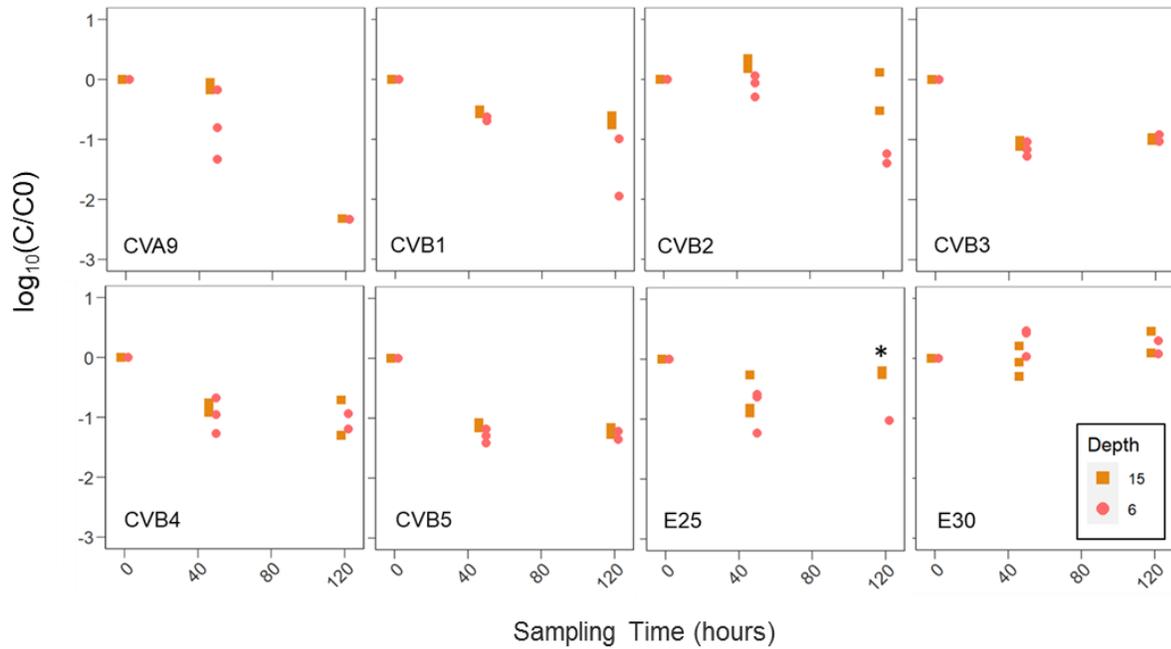


Figure 4 : Inactivation (mesurée en $\log_{10}(C/C_0)$) à 15 m de profondeur (carrés oranges) vs 6 m de profondeur (points rouges) lors de la campagne de printemps. L'étoile noire indique une différence statistiquement significative entre l'inactivation à 6 et 15 m.

	Spring		Winter			Inactivation ($\log_{10}(C/C_0)$)
	chamber 1	chamber 2	chamber 1	chamber 2	chamber 3	
CVA9	-2.3	-2.3	0.2	0.2	0.1	-2.3
CVB1	-0.8	-0.6	-1.0	-1.2	-1.8	-1.8
CVB2	-0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	-1.3
CVB3	-1.0	-1.0	-0.3	-0.3	-0.4	-0.8
CVB4	-0.7	-1.3	-0.6	-0.7	-0.4	-0.3
CVB5	-1.3	-1.2	-0.6	-0.6	-0.6	0.2
E25	-0.3	-0.2	-1.4	-1.5	-1.5	0.7
E30	0.5	0.1	-0.6	-0.9	-0.6	

Figure 5 : Degré d'inactivation (mesuré en $\log_{10}(C/C_0)$) de chaque sérotype après 5 jours à 15 m de profondeur, au printemps et en hiver.

5. Autres résultats et éléments obtenus grâce à l'essai

En plus des résultats principaux obtenus grâce à ces expériences, d'autres informations ont pu être obtenues :

- Nous avons validé l'utilisation des chambres de diffusion pour ce type d'expérience ainsi que leur installation. Des itérations ont été faites pour trouver la meilleure configuration sur site (distance du lest, protection de la chambre, profondeur d'amarrage...) pour assurer la sécurité de cette installation. De plus, l'étanchéité de la chambre a été validée en laboratoire. Les tests se sont bien déroulés sans incident ni relargage à déplorer. C'est un instrument qui a beaucoup de potentiel pour étudier l'inactivation des virus in-situ.
- Les tests de diffusion en laboratoire et sur site avec du bleu de méthylène ont montré la probable variabilité existant entre les différentes membranes. Cela pourrait avoir un impact sur l'inactivation des virus à l'intérieur de la chambre. Malgré cela, des échanges entre le milieu lacustre et la chambre ont eu lieu, au vu des variations de volumes observés dans les chambres. De plus, les chambres en répliques montrent une inactivation similaire.
- Nous avons obtenu des résultats d'inactivation dans le lac pour huit entérovirus, durant deux saisons. Ceux-ci peuvent permettre d'estimer des constantes d'inactivations pour ces virus, qui pourront être utilisées dans des modèles de risque par exemple.