Oeuf d'ascaris Suum : Approches structurales et environnementales

Sandrine Capizzi

▶ **To cite this version:**

Sandrine Capizzi. Oeuf d'ascaris Suum : Approches structurales et environnementales. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2000. Français. NNT : 2000NAN12002 . tel-01747560

HAL Id: tel-01747560
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747560

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy 2000/2
Double/2

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY

2000

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

BIBLIOTHEQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 26 janvier 2000

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

par

Sandrine CAPIZZI

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

Sujet :

Oeuf d'*Ascaris suum* : Approches structurales et environnementales

MEMBRES DU JURY

Juges :	Dr KARPEL (Chargée de recherche, ESIP, Poitiers)
	Pr BONALY (Faculté de Pharmacie, Nancy)
	Pr SCHWARTZBROD (Faculté de Pharmacie, Nancy)
Rapporteurs :	Dr HARF-MONTEIL (Faculté de Pharmacie, Ilkirch)
	Pr BOUCHET (Faculté de Pharmacie, Reims)

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2000

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

BIBLIOTHEQUE NANCY PHARMACIE ODONTOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement

le 26 janvier 2000

DB 19745

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

par

Sandrine CAPIZZI

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

Sujet :

Oeuf d'*Ascaris suum* : Approches structurales et environnementales

MEMBRES DU JURY

Juges : Dr KARPEL (Chargée de recherche, ESIP, Poitiers)
Pr BONALY (Faculté de Pharmacie, Nancy)
Pr SCHWARTZBROD (Faculté de Pharmacie, Nancy)

Rapporteurs : Dr HARF-MONTEIL (Faculté de Pharmacie, Ilkirch)
Pr BOUCHET (Faculté de Pharmacie, Reims)

BU PHARM. ODONTOL.
D 104 050103 3

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. FINANCE
Vice Doyen : A. ROVEL

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mle BESSON Suzanne
Mle GIRARD Thérèse
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mle	FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme	FUZELLLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratiques officinales

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais

Remerciements

A mon directeur de thèse

Madame le Professeur J. Schwartzbrod, vous m'avez accueillie au sein de votre laboratoire et encadrée tout au long de ces trois années de recherche. Votre pédagogie et votre rigueur scientifique ont su développer chez moi des qualités que je saurai dorénavant mettre à profit au cours de ma vie professionnelle. De plus, je rajouterai que vous m'avez apportée trois bagages pour y ranger le savoir, le savoir-faire et le "faire savoir", je vous en remercie pleinement.
Veuillez trouver dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde gratitude pour la confiance et l'aide précieuse que vous avez su m'apporter.

A mes rapporteurs

Madame le Professeur F. Bouchet, qui avez accepté de juger cette thèse, vous avez toujours manifesté beaucoup d'intérêt pour les œufs de Nématodes, que vous avez agréablement mariés à la Paléontologie.
Veuillez trouver ici, le témoignage de mes plus sincères remerciements.

Madame le Docteur C. Harf-Monteil, qui me fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail.
Grâce à votre regard critique et vos remarques pertinentes, j'ai pu mettre à profit la période de corrections pour améliorer ce travail.
Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A mes juges

Monsieur le Professeur R. Bonaly, qui a accepté la lourde tâche de juger ce travail, veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect. Je souhaiterais vous remercier plus particulièrement pour l'accueil, l'aide et les conseils apportés sur les analyses biochimiques. Vos qualités et compétences scientifiques m'ont été d'un grand secours, veuillez trouver dans ces quelques lignes une marque de respect et de reconnaissance.

Madame N. Karpel, Chargée de Recherche
Je vous adresse ici mes plus vifs remerciements pour l'honneur que vous me faites d'accepter d'apporter votre jugement sur ce travail.

Pour les conseils scientifiques concernant la biochimie

A Monsieur J. Coulon, Maître de Conférence
Je souhaiterais vous témoigner ma gratitude pour les appuis techniques et scientifiques dont j'ai bénéficié. Je voudrais également remercier toute l'équipe du laboratoire de biochimie bactérienne, qui a su répondre à toutes mes questions et mes attentes.

A Madame le professeur D. Bagrel de l'Université de Metz
Pour vos conseils concernant l'analyse des protéoglycannes, je voudrais vous remercier pour le temps que vous m'avez accordé et pour l'aide apportée au démarrage de ce travail.

A Madame le Docteur E. Payan
Je vous remercie pour m'avoir permis de réaliser dans le laboratoire de Monsieur le Professeur Netter, les analyses des glycosaminoglycannes. Vos conseils et votre expérience m'ont permis de régler les problèmes rencontrés lors des dosages.
A Madame le Docteur F. Quilès, Chargée de Recherche
Je vous adresse mes remerciements pour l'aide fournie dans la réalisation des analyses infrarouges. Vos connaissances dans ce domaine m'ont permis de pallier aux difficultés rencontrées, soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

Pour les phénomènes d'adhésion et les propriétés d'amphiphilie

Je remercie Monsieur le professeur J.C. Block, Monsieur F. Jorand, Maître de conférence, et toute l'équipe du laboratoire. L'adhésion est un phénomène complexe que le professeur J.C. Block sait expliquer avec des mots simples tout en mettant en avant la complexité du monde bactérien.

Pour les expérimentations sur l'irradiation,

A Madame A. Chevalier, pour l'aide, les conseils et le soutien apportés, je vous remercie pour la marque de confiance et l'intérêt que vous aviez pour ce travail. Vos remarques m'ont toujours été très utiles pour l'avancement de cette thèse.

A Monsieur M. Letournel, Directeur de la société Vivirad, pour m'avoir permis d'accéder à l'accélérateur d'électron et pour vos conseils judicieux, veuillez trouver dans ces mots une vive reconnaissance.

Pour les études réalisées dans les eaux résiduaires,

Je voudrais témoigner ma gratitude à Monsieur J-C. Orain, chef d'exploitation de Sogea-Est lors de cette étude, pour m'avoir permis d'accéder à toute heure du jour et de la nuit à la station de traitement. De plus, je vous remercie pour les données que vous m'avez confiées. Vous avez toujours répondu à mes demandes, je vous en suis très reconnaissante.

A Monsieur A. Hammouda, pour les données météorologiques et les informations concernant les eaux pluviales, je souhaite vous remercier pour tout l'aide que vous m'avez apporté.

A Monsieur P. Auchet, Ingénieur en chef à la Communauté Urbaine du Grand Nancy, pour les autorisations me permettant d'accéder aux bassins de rétention des eaux pluviales de la ville de Nancy, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Pour l'approvisionnement en parasite,

Je tiens tout particulièrement à témoigner ma reconnaissance à Monsieur J-P. Paytra, de l'abattoir Cooperl à Lamballe, sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu. Vous m'avez envoyé fréquemment ces vers, cette matière première sans laquelle je ne pouvais effectuer mes recherches. Si les quelques chocolats et friandises lorraines vous ont réjoui, elles ne sont qu'un mince remerciement face à l'agrément que vous m'apportiez par les envois fréquents de ces charmants vers.

Pour les personnes de mon laboratoire d'accueil

A Monsieur le Professeur L. Schwartzbrod, dont l'énergie et les conseils pertinents ont participé à l'achèvement de ce travail. C'est avec joie que j'accepte le titre "d'ange gardien" du laboratoire dont vous m'avez qualifié. Soyez assuré de mon profond respect.

A Madame M. Albert, Maître de Conférence, mémoire du laboratoire
J'exprime ma reconnaissance pour le soutien, les conseils que vous m'avez apportés durant ces années.

A Monsieur C. Gantzer, maître de conférence, qui a réponse à tout problème
Pour les conseils et l'esprit critique qui le qualifient et dont le professionnalisme sait faire place, s'il le faut, à une bonne humeur tout aussi communicative, qu'il soit assuré de mon respectueux attachement.

A Madame S. Lemoine, une vraie perle
Pour son aide logistique et sa bonne humeur, qu'elle trouve ici l'expression de mes vifs remerciements.

A Messieurs F. Marin et D. Santilli
Pour vos aides quotidiennes et votre gentillesse, je vous remercie vivement. Vous avez toujours été présents lorsque j'avais besoin d'aide. Pour ne citer qu'un exemple, je dirais que les muscles de Monsieur Marin ont été mis à rude épreuve par le prélèvement de 240 échantillons de 20 litres d'eaux usées.

J'exprime toute mon amitié à l'équipe des deux laboratoires de Bactériologie-Parasitologie et de Virologie et plus particulièrement à Bérangère à qui je souhaite bon courage pour la rédaction de sa thèse.

A Samira, pour son réconfort et son amitié, je tiens à la remercier. Je n'oublierais jamais les petits gâteaux marocains, tant attendus, qui ont été rapportés après chacun de ses voyages.

Je remercie mon comité de lecture et de soutien : Benoît, Mélinda, Thierry, Sylvain et Sophie pour leur soutien, leur aide et leur encouragement. Je vous en suis très reconnaissante et je vous préparerai un repas gastronomique avec des spécialités lorraines pour vous remercier de toutes les actions que vous avez engagées pour m'aider.

Pour les autres personnes de la faculté

Pour Madame J. Collomb, Maître de Conférence, pour vos encouragements, vos conseils et votre patience lors de la rédaction et de la présentation orale, soyez assurée de ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier Monsieur Humbert, Monsieur Godfroy et Monsieur Mathieu pour leur aide technique indispensable à la réalisation de ce travail. Pour tous les petits ennuis nécessitant un bricolage ou une réparation, vous avez toujours été présents. Soyez sûrs que j'en suis redevable.

Pour ma famille et mon futur époux

Pour mes parents qui m'ont soutenue durant ces 27 années, il m'est impossible d'écrire en quelques mots les sentiments qui m'animent, je dirai donc tout simplement merci. Soyez fiers de votre fille, comme elle est fière de ses parents.

Pour ma sœur et Frédérique, ce n'est pas la fin de mes études qui me rendra plus facile à vivre. Le titre de Docteur n'est pas un aboutissement, mais un début vers une vie professionnelle naissante. Je vous remercie de vous préoccuper des problèmes que j'ai pu croiser. Trouvez ici toute ma reconnaissance et mon affection.

A Damien, mon futur époux, si tu as réussi à passer en ma compagnie les mois pénibles de la rédaction, tu es prêt pour le mariage. Bientôt Docteur, ensuite Madame, puis maman, la vie nous réserve des surprises. Trouve dans ces quelques mots qui ne peuvent égaler tout l'aide que tu m'as apporté dans mes recherches, un témoignage de ma reconnaissance et de mon amour.

Liste des abréviations

1,9-DMB : 1,9-diméthylméthylène blue
A % : potentiel d'hydrophobicité
AMPS : mucopolysaccharide acide
ATBF : solution antibactérienne et antifongique
BCA : acide bicinchoninique
BSA : sérum d'albumine bovine
C0S, C4S, C6S : chondroïtine 0, 4 ou 6 sulfate
CIH : chromatographie d'interaction hydrophobe
D_{90}, $D_{99,9}$, D_{100} : dose d'inactivation de 90, 99,9 ou 100% de la population
DMI : dose minimale infectieuse
ECZ : électrophorèse capillaire zonale
EMIG : electromicroscopie par immuno-gold
EPA : environmental protection agency
Gal : galactose
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GlcAc : acide D-glucuronique
GlcNAc : N-acétylglucosamine
HA : acide hyaluronique
IA-CZE : ion association- capillary zone electrophoresis
IdAc acide L-iduronique
IR : infrarouge
MAC : mesure de l'angle de contact
MES : matière en suspension
MIA : monoiodoacétate
MS : matière sèche
ND : non-déterminé
NPPUC : nombre le plus probable d'unités formant colonies
PAS : acide périodique de Schiff
PBS : solution de tampon phosphate
PEG : polyéthylène glycol
PUM : tampon phosphate, urée et magnésium
SDS-PAGE : sodium dodécyle sulfate- électrophorèse en gel de polyacrylamide
TAMH : test d'adhésion des microorganismes aux hydrocarbures
TAS : test d'agrégation saline
TFMS : acide trifluorométhanesulfonique
TPP : test de partage de phase

Table des matières

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

L'œuf d'Ascaris

1 DONNÉES SUR LE PARASITE 26

1.1 DESCRIPTION DU PARASITE 26
1.2 CYCLE PARASITAIRE 27
1.3 EPIDÉMIOLOGIE 28
1.3.1 Réservoir de germes 28
1.3.2 Modes de transmission 29
1.3.2.1 Transmission par des légumes contaminés 29
1.3.2.2 Transmission par des sols souillés avec des eaux contaminées 30
1.3.2.3 Transmission liée aux modes de vie 30

2 RÉSISTANCE ET DEVENIR DES ŒUFS DANS L'ENVIRONNEMENT 30

2.1 RÉSISTANCE À LA TEMPÉRATURE ET AUX AGENTS CHIMIQUES 30
2.1.1.1 Perte de viabilité de l'œuf d'Ascaris 30
2.1.1.2 Destruction de l'œuf d'Ascaris 31
2.1.2 Résistance aux agents chimiques 32
2.1.2.1 Composés chimiques classiquement utilisés en désinfection 32
2.1.2.2 Autres composés chimiques 33
2.2 DEVENIR DANS L'ENVIRONNEMENT 33
2.3 ŒUFS D'ASCARIS DANS LES BOUES RÉSIDUAIRES 35
2.3.1 Concentration parasitaire 35
2.3.2 Impact des traitements 36

3 DÉTERMINATION DU CARACTÈRE VIABLE 37

3.1 DÉFINITION DE LA VIABILITÉ 37
3.2 MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA VIABILITÉ 39

4 ETUDE DE LA STRUCTURE DE L'ŒUF D'*ASCARIS* 40

4.1 MORPHOLOGIE DE L'ŒUF D'ASCARIS 40
4.2 FORMATION DE L'ŒUF D'ASCARIS 41
4.2.1 Formation de l'oocyte 41
4.2.2 Fertilisation 41
4.2.3 Formation de la coque 41
4.2.3.1 Membrane vitelline 41
4.2.3.2 Formation de la couche chitineuse 41
4.2.3.3 Formation de la couche lipidique 41
4.2.3.4 Formation de la couche externe utérine 42
4.3 STRUCTURE DE LA COQUE DE L'ŒUF D'ASCARIS 42
4.3.1 Hypothèses de formation 42
4.3.2 Structure des différentes couches 45
4.3.2.1 Couche lipidique interne 45
4.3.2.2 Couche chitineuse 45
4.3.2.3 Membrane vitelline 46
4.3.2.4 Couche externe utérine 46

4.3.2.4.1 Etudes morphologiques 46
4.3.2.4.2 Les sécrétions des cellules utérines 46
4.3.2.4.3 Les modifications de la couleur externe : le "tanning" 47
4.3.2.4.4 Biochimie de la couche externe 47
4.3.2.4.5 Propriétés chimiques 48
4.4 PERMÉABILITÉ DE LA COQUE DE L'ŒUF D'ASCARIS 48
4.5 COMPARAISON AVEC D'AUTRES NÉMATODES 48

5 BIOCHIMIE DE L'ŒUF D'*ASCARIS* 50

5.1 ETUDE DES DIFFÉRENTS COMPOSÉS BIOCHIMIQUES 50
5.1.1 Lipides *50*
5.1.1.1 Ascarosides 50
5.1.1.2 Stérols 51
5.1.2 Polysaccharides *51*
5.1.2.1 Glycogène 51
5.1.2.2 Tréhalose 51
5.1.2.3 Chitine 51
5.1.2.4 Ascarylose 52
5.2 EVOLUTION BIOCHIMIQUE DURANT EMBRYOGENÈSE 52
5.2.1 Diminution des teneurs des composés biochimiques *52*
5.2.2 Echanges entre les glucides et les lipides *52*

6 RESPIRATION DE L'EMBRYON 53

Biochimie de la couche externe de l'œuf d'Ascaris

1 PRÉSENTATION BIBLIOGRAPHIQUE DES MUCOPOLYSACCHARIDES 56

1.1 TERMINOLOGIE 56
1.2 NOMENCLATURE 57
1.3 PROTÉOGLYCANNES ET GLYCOPROTÉINES 57
1.3.1 Différences entre protéoglycannes et glycoprotéines 57
1.3.2 Rôle biologique 58
1.4 STRUCTURE DES PROTÉOGLYCANNES 58
1.5 GLYCOSAMINOGLYCANNES : STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS 60
1.5.1 Structure gélatineuse 60
1.5.2 Propriétés biophysiques 61
1.5.2.1 Viscosité 61
1.5.2.2 Densité de charge 61
1.5.3 Structure biochimique des principaux glycosaminoglycannes 61
1.5.3.1 Acide hyaluronique ou hyaluronate 62
1.5.3.2 Chondroïtine et chondroïtine sulfate 63
1.5.3.3 Dermatan sulfate 64
1.5.3.4 Héparine 64
1.5.3.5 Kératan sulfate 65

2 EXTRACTION ET DE QUANTIFICATION DES MUCOPOLYSACCHARIDES 66

2.1 EXTRACTION DES PROTÉOGLYCANNES DES ÉCHANTILLONS 66
2.1.1 Dissolution à la guanidine-HCl 66
2.1.2 Digestion enzymatique 66
2.2 ISOLEMENT DES PROTÉOGLYCANNES ET DES DIFFÉRENTS GLYCOSAMINOGLYCANNES 66
2.2.1 Précipitation des ammoniums quaternaires 66
2.2.2 Chromatographie gel-filtration 66
2.2.3 Gradient de densité 67
2.2.4 Electrophorèse à gel d'agarose-polyacrylamide 67
2.3 DÉGLYCOSILATION DES PROTÉOGLYCANNES 67
2.3.1 Glycosaminoglycannes N-liés 67
2.3.2 Glycosaminoglycannes O-liés 67
2.3.2.1 β-élimination 68
2.3.2.2 Acide trifluorométhanesulfonique 68
2.4 CARACTÉRISATION DES POLYSACCHARIDES PAR LA SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE 68
2.4.1 Moyen infrarouge 68
2.4.1.1 Applications analytiques 68
2.4.1.2 Traitements des échantillons 69
2.4.2 Spectrométrie à transformée de Fourrier 70
2.5 DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DES PROTÉOGLYCANNES 70
2.5.1 Détermination du poids moléculaire 70

2.5.1.1 Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 70
2.5.1.2 Chromatographie HPSEC (High-Performance Size-Exclusion Chromatography) 70
2.5.2 Détermination du point isoélectrique *70*
2.6 DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS DES GLYCOSAMINOGLYCANNES 70
2.6.1 Electrophorèse sur gel d'agarose *70*
2.6.2 Spectrométrie *71*
2.6.3 Chromatographie liquide à haute pression *71*
2.6.4 Electrophorèse capillaire zonale *71*
2.7 DOSAGES DES MUCOPOLYSACCHARIDES CHEZ L'ASCARIS ADULTE 71

3 OBJECTIFS 73

4 MATÉRIELS ET MÉTHODES 74

4.1 TESTS PRÉLIMINAIRES AVEC COLORATIONS HISTOLOGIQUES 74
4.1.1 Matériels *74*
4.1.1.1 Œufs d'Ascaris 74
4.1.1.2 Réactifs 74
4.1.1.2.1 Coloration au Bleu de Toluidine Phéniqué 74
4.1.1.2.2 Coloration au Bleu d'Alcian 74
4.1.1.2.3 Coloration à l'Acide Périodique - Fuchsine Basique 74
4.1.1.2.4 Coloration au Bleu d'Alcian - PAS 74
4.1.1.3 Outils 75
4.1.2 Méthodes *75*
4.1.2.1 Obtention des suspensions d'œufs d'Ascaris 75
4.1.2.2 Méthodes de coloration des œufs 76
4.1.2.2.1 Coloration au Bleu de Toluidine Phéniqué 76
4.1.2.2.2 Coloration au Bleu d'Alcian 77
4.1.2.2.3 Coloration à l'Acide Périodique - Fuchsine Basique 77
4.1.2.2.4 Coloration au Bleu d'Alcian - PAS 77
4.2 CARACTÉRISATION DES CONSTITUANTS DE LA COUCHE EXTERNE PAR INFRAROUGE 77
4.2.1 Matériel *77*
4.2.1.1 Chondroïtine sulfate 77
4.2.1.2 Suspensions d'œufs d'Ascaris 78
4.2.1.3 Spectromètre 78
4.2.2 Méthodes *78*
4.2.2.1 Lyophilisats d'œufs d'Ascaris 78
4.2.2.2 Pastillage 78
4.3 DOSAGE DES PROTÉINES ET DES ACIDES AMINÉS 78
4.3.1 Dosage des protéines *78*
4.3.1.1 Choix et principe du dosage 78
4.3.1.2 Matériels 79
4.3.1.2.1 Réactifs 79
4.3.1.2.2 Echantillons 79
4.3.1.2.3 Outils 79
4.3.1.3 Méthodes de microtitration 80
4.3.1.3.1 Gamme d'étalonnage 80
4.3.1.3.2 Dosage 80
4.3.2 Dosage des acides aminés *80*
4.3.2.1 Choix et principe du dosage 80
4.3.2.2 Matériels 81

4.3.2.2.1 Outils ... 81
4.3.2.2.2 Réactifs ... 81
4.3.2.2.3 Echantillons lyophilisés ... 81
4.3.2.3 Méthodes ... 81
4.3.2.3.1 Gamme d'étalonnage ... 81
4.3.2.3.2 Dosage ... 82
4.4 DOSAGE DE L'ACIDE HYALURONIQUE ... 82
4.4.1 Matériels ... *82*
4.4.2 Préparations des réactifs ... *82*
4.4.2.1 Solutions et réactif pour les traitements de purification avant dosage ... 82
4.4.2.2 Solutions pour le dosage ... 83
4.4.3 Détermination de la quantité d'enzyme à utiliser ... *84*
4.4.4 Obtention des coques des œufs d'Ascaris ... *85*
4.4.5 Traitements sur les broyats de coques d'œufs d'Ascaris ... *86*
4.4.5.1 Guanidine-HCl ... 86
4.4.5.2 Trypsine ... 86
4.4.5.3 Acide chlorhydrique ... 86
4.4.5.4 Acide sulfurique ... 87
4.4.6 Méthode de dosage ... *87*
4.4.6.1 Protocole de dosage ... 87
4.4.6.2 Gamme d'étalonnage ... 88
4.5 DOSAGE DES GLYCOSAMINOGLYCANNES ... 88
4.5.1 Essais d'interférence sur la chitine ... *88*
4.5.1.1 Préparation des solutions ... 88
4.5.1.2 Protocole de digestion de la chitine ... 89
4.5.2 Préparation des échantillons ... *89*
4.5.2.1 Sections d'utérus ... 89
4.5.2.2 Œufs ... 89
4.5.3 Dosage des glycosaminoglycannes par colorimétrie ... *90*
4.5.3.1 Préparation des solutions et réactifs pour le dosage des chondroïtines sulfates ... 90
4.5.3.2 Préparation des gammes d'étalonnage de la chondroïtine 4-Sulfate ... 91
4.5.3.3 Hydrolyse à la papaïne ... 91
4.5.3.4 Dosage des chondroïtines sulfates dans les échantillons ... 91
4.5.4 Dosage des chondroïtines sulfates par électrophorèse capillaire zonale ... *91*
4.5.4.1 Etalon interne ... 91
4.5.4.2 Gamme d'étalonnage des chondroïtines 0S, 4S et 6S ... 91
4.5.4.3 Préparation des échantillons par électrophorèse capillaire zonale ... 92
5 RÉSULTATS DES ANALYSES BIOCHIMIQUES ... 93
5.1 TESTS PRÉLIMINAIRES : LES COLORATIONS HISTOLOGIQUES ... 93
5.1.1 Coloration au bleu de Toluidine phéniqué ... *93*
5.1.2 Coloration au bleu d'Alcian ... *93*
5.1.3 Coloration à l'Acide Périodique - Fuchsine Basique ... *93*
5.1.4 Coloration à l'Acide Périodique de Schiff - bleu d'Alcian ... *94*
5.1.5 Interprétation de l'ensemble des colorations ... *94*
5.2 RÉSULTATS DE L'ÉTUDE PAR SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE ... 96
5.2.1 Spectres infrarouges de la chondroïtine sulfate ... *96*
5.2.2 Spectrométrie infrarouge à partir des suspensions d'œufs lyophilisés ... *97*
5.3 DOSAGE DES PROTÉINES ET DES ACIDES AMINÉS ... 100

5.3.1 Résultats des gammes d'étalonnage *100*
5.3.2 Résultats obtenus à partir des œufs lyophilisés *101*
5.3.2.1 Résultats des dosages des protéines 101
5.3.2.2 Résultats des dosages des acides aminés 102
5.3.3 Résultats obtenus à partir des lyophilisats des sections de l'utérus *103*
5.4 DOSAGE DE L'ACIDE HYALURONIQUE 104
5.4.1 Droite de calibration *104*
5.4.2 Dosage de l'acide hyaluronique *105*
5.4.2.1 Validation du protocole de dosage 105
5.4.2.2 Dosages à partir des suspensions de coques de l'œuf d'Ascaris 107
5.4.2.3 Résultats des essais avec des hydrolyses acides ou enzymatiques préliminaires 108
5.4.2.3.1 Guanidine-HCl 108
5.4.2.3.2 Trypsine 108
5.4.2.3.3 Acide chlorhydrique 108
5.4.2.3.4 Acide sulfurique 108
5.4.3 Conclusion *108*
5.5 DOSAGE DE LA CHONDROÏTINE SULFATE 109
5.5.1 Droite de calibration *109*
5.5.2 Résultats du dosage des suspensions de chitine *109*
5.5.3 Résultats des dosages des échantillons *110*

6 CONCLUSION 112

6.1 MISE EN ÉVIDENCE DES MUCOPOLYSACCHARIDES PAR DES COLORATIONS HISTOLOGIQUES 112
6.2 ANALYSES PAR SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE 112
6.2.1 Chondroïtines sulfates *112*
6.2.2 Lyophilisats d'œufs d'Ascaris *113*
6.3 DOSAGE DES PROTÉINES ET DES ACIDES AMINÉS 115
6.3.1 Lyophilisats d'œufs *115*
6.3.1.1 Dosage des protéines 115
6.3.1.2 Dosage des acides aminés 115
6.3.2 Sections des utérus *116*
6.3.2.1 Dosage des protéines 116
6.3.2.2 Dosage des acides aminés 116
6.4 DOSAGE DES CONSTITUANTS DES PROTÉOGLYCANNES 116
6.4.1 Acide hyaluronique *116*
6.4.1.1 Rendement de la méthode 116
6.4.1.2 Dosage de l'acide hyaluronique dans les coques purifiées 117
6.4.1.3 Hydrolyses enzymatiques et acides avant dosage 117
6.4.2 Glycosaminoglycannes *117*
6.4.2.1 Suspensions de chitine 118
6.4.2.2 Dosage colorimétrique 118
6.4.3 Conclusion sur les constituants des protéoglycannes *118*

Tests de détermination du caractère hydrophile et hydrophobe de la surface de l'œuf d'Ascaris

1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'HYDROPHILIE ET DE L'HYDROPHOBIE DE SURFACES BIOLOGIQUES 120

1.1 DIFFÉRENTS TYPES DE LIAISON IMPLIQUÉES DANS LES INTERACTIONS 120
1.2 VOIE DIRECTE : TESTS DE MESURE POUR L'ÉVALUATION DES CARACTÉRISTIQUES DE SURFACE 121
1.2.1 Méthodes de mesure du caractère hydrophobe 121
1.2.1.1 Mesure de l'angle de contact 122
1.2.1.2 Test de partage de phase 123
1.2.1.3 Chromatographie d'interaction hydrophobe 123
1.2.1.4 Sondes moléculaires hydrophobes 123
1.2.1.5 Test d'adhésion des microorganismes aux hydrocarbures 124
1.2.1.6 Adhésion à des solides hydrophobes 125
1.2.1.7 Test d'agrégation en milieu salin 125
1.2.2 Méthodes cumulées 125
1.3 VOIE INDIRECTE : INHIBITION DE L'ADHÉSION 126

2 OBJECTIFS 127

3 MATÉRIELS ET MÉTHODES 128

3.1 MATÉRIELS 128
3.1.1 Outils 128
3.1.2 Vers d'Ascaris 128
3.1.3 Boues résiduaires 128
3.1.4 Support hydrophile 128
3.1.5 Composés hydrophobes 128
3.1.6 Composés hydrophobes/hydrophiles 129
3.1.6.1 Test de partage de phase 129
3.1.6.2 Chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophile en batch 129
3.1.6.3 Test d'adhésion sur microsphères de latex hydrophiles et hydrophobes 130
3.1.6.3.1 Microsphères de latex 130
3.1.6.3.2 Préparation des solutions tamponnées et des détergents 131
3.1.6.3.3 Solutions salines 132
3.2 MÉTHODES 134
3.2.1 Œufs d'Ascaris 134
3.2.1.1 Obtention des œufs d'Ascaris par rinçage des vers 134
3.2.1.2 Obtention des œufs d'Ascaris par dissection 134
3.2.1.3 Obtention des œufs d'Ascaris à partir de boues résiduaires contaminées 134
3.2.1.4 Titrage des suspensions d'œufs d'Ascaris 135
3.2.2 Etude du caractère hydrophile 135
3.2.2.1 Réalisation de témoins d'adhésion au tube 136
3.2.2.2 Etude de l'adhésion des œufs à la poudre de verre 136
3.2.3 Etude du caractère hydrophobe 137

3.2.3.1 Protocole du test d'adhésion aux hydrocarbures 137
3.2.3.2 Test statistique 138
3.2.4 Etude du caractère amphiphile 139
3.2.4.1 Test de partage de phase 139
3.2.4.1.1 Protocole de préparation des gels 139
3.2.4.1.2 Protocole du test de partage de phase 139
3.2.4.2 Chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophile en batch 139
3.2.4.2.1 Protocole de lavage et de préparation du gel 139
3.2.4.2.2 Protocole de chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophile en batch 140
3.2.4.3 Test d'adhésion sur des microsphères de latex hydrophobes et hydrophiles 141

4 RÉSULTATS DES ÉTUDES D'HYDROPHILIE ET D'HYDROPHOBIE DE LA SURFACE DES ŒUFS D'*ASCARIS* 142

4.1 RÉSULTATS DES MESURES DE L'HYDROPHILIE SUR POUDRE DE VERRE 142
4.1.1 Evaluation de l'adhésion au niveau des tubes 142
4.1.2 Choix du matériel minimisant l'adhésion 143
4.1.3 Adhésion sur support hydrophile : la poudre de verre 143
4.1.3.1 Etude des paramètres pH et temps 144
4.1.3.1.1 Variation du pH 144
4.1.3.1.2 Variation du temps de contact 144
4.1.3.2 Influence du degré de maturation des œufs d'Ascaris 145
4.2 RÉSULTATS DES MESURES DE L'HYDROPHOBIE 147
4.2.1 Test d'adhésion des œufs d'Ascaris aux hydrocarbures 147
4.2.1.1 Suspensions d'œufs d'Ascaris récupérés après la ponte 147
4.2.1.1.1 Pourcentage d'hydrophobie des œufs récupérés après la ponte 147
4.2.1.1.2 Distribution des œufs avec couche externe 149
4.2.1.2 Suspensions d'œufs récupérés à partir de boues 150
4.2.1.2.1 Pourcentage d'hydrophobie avec des œufs récupérés de boues 150
4.2.1.2.2 Distribution des œufs avec couche externe 150
4.2.1.3 Suspensions d'œufs d'Ascaris provenant de dissection 151
4.2.1.3.1 Pourcentage d'hydrophobie des œufs provenant de la partie distale de l'utérus 151
4.2.1.3.2 Pourcentage d'hydrophobie des œufs provenant de la partie centrale de l'utérus 152
4.2.2 Caractérisation des interactions électrostatiques et acido-basiques à la surface de l'œuf d'Ascaris 152
4.2.2.1 Caractérisation des interactions électrostatiques à la surface de l'œuf d'Ascaris 152
4.2.2.1.1 Suspension d'œufs récupérés après la ponte 152
4.2.2.1.2 Suspension d'œufs récupérés à partir de boues 153
4.2.2.2 Caractérisation des interactions acido-basiques à la surface de l'œuf d'Ascaris 154
4.2.2.2.1 Suspension d'œufs récupérés après la ponte 154
4.2.2.2.2 Suspension d'œufs récupérés à partir de boues 155
4.3 RÉSULTATS DES MESURES DE L'AMPHIPHILIE 155
4.3.1 Test de partage de 2 phases 155
4.3.2 Chromatographie d'interaction hydrophile et hydrophobe en batch 156
4.3.3 Test d'adhésion sur microsphères de latex hydrophiles et hydrophobes 157
4.3.3.1 Détermination du protocole expérimental 158
4.3.3.1.1 Détermination de la quantité de particules dans la suspension 158
4.3.3.1.2 Choix du tampon 158
4.3.3.1.3 Action de détergents sur l'adhésion 159
4.3.3.1.4 Effets des concentrations des solutions salines sur l'adhésion 160
4.3.3.2 Adhésion des particules sur des suspensions d'œufs d'Ascaris 162
4.3.3.2.1 Expérimentations avec des suspensions d'œufs fraîchement émis 162

4.3.3.2.2 Expérimentations avec des suspensions d'œufs extraits de boues résiduaires 163

5 DISCUSSIONS ET CONCLUSION 164

5.1 CARACTÈRE HYDROPHILE 164
5.2 CARACTÈRE HYDROPHOBE 165
5.2.1 Détermination du potentiel d'hydrophobie des œufs d'Ascaris 165
5.2.2 Propriétés de la couche externe de l'œuf d'Ascaris 167
5.2.3 Interactions acido-basiques et électrostatiques 167
5.3 CARACTÈRE AMPHIPHILE 168
5.3.1 Chromatographie d'interaction hydrophobe en batch 169
5.3.2 Microsphères de latex hydrophiles et hydrophobes 169
5.3.3 Test de partage de phases 170
5.4 CONCLUSIONS 170

Inactivation des œufs d'Ascaris par irradiation

1 INTRODUCTION SUR LA PROBLÉMATIQUE DES BOUES 174

1.1 PROBLÉMATIQUE DES BOUES 174
1.2 RÉGLEMENTATION FRANÇAISE 176
1.3 ETUDE DES DIFFÉRENTES FILIÈRES DE TRAITEMENT DES BOUES 177
1.3.1 Traitements physiques 177
1.3.2 Traitements biologiques 178
1.3.3 Traitements chimiques 179
1.4 PROCÉDÉS RÉDUISANT ENCORE DAVANTAGE LES GERMES PATHOGÈNES (PFRP) 180
1.4.1 Digestion aérobie thermophile 180
1.4.2 Compostage 181
1.4.3 Séchage thermique, traitement thermique et pasteurisation 181
1.4.4 Irradiation 181
1.5 PROCÉDÉS RÉDUISANT SIGNIFICATIVEMENT LES GERMES PATHOGÈNES (PSRP) 181
1.5.1 Digestions aérobie et anaérobie 181
1.5.2 Séchage à l'air 181
1.5.3 Compostage 181
1.5.4 Stabilisation 182

2 L'UTILISATION DE L'IRRADIATION EN ENVIRONNEMENT 182

2.1 CARACTÉRISTIQUES DE L'IRRADIATION 182
2.1.1 Rayonnements γ et β 182
2.1.1.1 Rayonnement γ 182
2.1.1.2 Rayonnement β 183
2.1.2 Paramètres 183
2.1.2.1 Dose 183
2.1.2.2 Pénétration 183
2.1.2.3 Efficacité 184
2.2 ACTION DE L'IRRADIATION SUR LES ORGANISMES VIVANTS 184
2.2.1 Irradiation d'une population de cellules 184
2.2.1.1 Effets directs 185
2.2.1.2 Effets indirects 185
2.2.2 Effets variables sur les organismes 185
2.2.2.1 Variabilité en fonction de l'organisme 185
2.2.2.2 Variabilité en fonction du taux d'hydratation 186
2.2.2.3 Variabilité selon le stade de développement et le sexe 186
2.2.3 Effet de la dose de radiation sur les œufs de parasites 187
2.3 IRRADIATION DANS LE TRAITEMENT DES BOUES ET EAUX USÉES 189

3 OBJECTIFS 190

4 MATÉRIELS ET MÉTHODES 192

4.1 MATÉRIELS 192

4.1.1 Outils *192*
4.1.2 Réactifs *192*
4.1.2.1 Dissection des vers d'Ascaris 192
4.1.2.2 Protocole de détermination de la concentration parasitaire 192
4.1.3 Accélérateur d'électron *192*
4.1.4 Ascaris *193*
4.1.5 Boues résiduaires *193*
4.2 MÉTHODES 193
4.2.1 Récupération des œufs d'Ascaris *193*
4.2.1.1 Obtention des œufs d'Ascaris avec et sans couche externe par rinçage des vers 193
4.2.1.2 Obtention des œufs d'Ascaris par dissection 194
4.2.1.3 Détermination des concentrations en œufs d'Ascaris des boues résiduaires 194
4.2.1.4 Contamination parasitaire de la boue 194
4.2.2 Irradiation des œufs d'Ascaris *195*
4.2.2.1 Irradiation des œufs d'Ascaris dans de l'eau désionisée 195
4.2.2.2 Irradiation des œufs d'Ascaris dans les boues résiduaires 195
4.2.3 Extraction des œufs d'Ascaris à partir d'échantillons de boues irradiées *195*
4.2.4 Détermination du pourcentage d'œufs viables *196*
4.2.5 Détermination de la D_{90} et D_{100} *197*
4.2.5.1 Détermination graphique 197
4.2.5.2 Détermination statistique 197

5 RÉSULTATS DES EXPÉRIMENTATIONS SUR LES ŒUFS D'*ASCARIS* 198

5.1 ESSAIS PRÉLIMINAIRES D'IRRADIATION DES ŒUFS D'ASCARIS EN EAU DÉSIONISÉE 198
5.1.1 Effets des irradiations sur les concentrations et sur la viabilité des œufs *198*
5.1.1.1 Effet de l'irradiation sur la population d'œufs d'Ascaris 198
5.1.1.2 Effet de l'irradiation sur la viabilité des œufs d'Ascaris 198
5.1.1.2.1 Détermination de la dose d'irradiation provoquant 100% d'inactivation des œufs d'*Ascaris* ou D_{100} 199
5.1.1.2.2 Détermination de la dose d'irradiation provoquant 90% d'inactivation des œufs d'*Ascaris* ou D_{90} 200
5.1.2 Effet de l'irradiation sur la couche externe de l'œuf d'Ascaris *200*
5.2 RÉSULTATS DES IRRADIATIONS DES ŒUFS DANS DES BOUES RÉSIDUAIRES 201
5.2.1 Boues contaminées avec des œufs obtenus après dissection *201*
5.2.2 Boues contaminées à partir d'œufs extraits de boues résiduaires *203*

6 CONCLUSION 205

6.1 EFFET SUR LA STRUCTURE ET SUR LA VIABILITÉ DE L'ŒUF D'ASCARIS 205
6.1.1 Conséquence visible de l'irradiation sur la structure de l'œuf d'Ascaris *205*
6.1.2 Conséquence de l'irradiation sur la viabilité de l'œuf d'Ascaris *205*
6.1.2.1 Selon le milieu subissant l'irradiation 206
6.1.2.2 Selon le type d'œufs d'Ascaris 206
6.1.2.2.1 Œufs provenant de dissection ou récupérés à partir de boue 206
6.1.2.2.2 Œufs avec et sans couche externe 206
6.2 EFFICACITÉ D'UN PROCÉDÉ HYGIÉNISANT 207
6.3 DOSES PRÉCONISÉES 207

Etude métrologique du flux d'œufs d'helminthes dans les eaux usées

1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES ŒUFS D'HELMINTHES ET LA POLLUTION DES EAUX PLUVIALES 210

1.1 ŒUFS D'HELMINTHES DANS LES EAUX RÉSIDUAIRES 210
1.1.1 Législation 210
1.1.2 Pathologie et épidémiologie des œufs de Nématodes et Cestodes 210
1.1.2.1 Classification 210
1.1.2.2 Pathologie et épidémiologie 210
1.1.2.2.1 Taenia 211
1.1.2.2.2 Hymenolepis 211
1.1.2.2.3 Ascaris 211
1.1.2.2.4 Toxocara 212
1.1.2.2.5 Trichuris 212
1.1.2.2.6 Capillaria 212
1.1.3 Concentration en œufs d'helminthes dans les eaux usées 213
1.1.3.1 Données quantitatives 213
1.1.3.2 Données qualitatives 214
1.1.4 Variations temporelles des concentrations 214
1.2 EAUX PLUVIALES 215
1.2.1 Flux d'eaux pluviales et résiduaires 215
1.2.2 MES dans les eaux pluviales 216
1.2.2.1 Concentration des MES dans les eaux pluviales 216
1.2.2.2 Apports massiques des MES 216
1.2.2.2.1 Apport des MES selon l'intensité orageuse 216
1.2.2.2.2 Apports annuels des MES 217
1.2.3 Comparaison entre MES et œufs d'Ascaris 218
1.2.3.1 Granulométrie des MES 218
1.2.3.2 Dimension des oeufs d'Ascaris 218

2 OBJECTIFS 219

3 MATÉRIELS ET MÉTHODES 220

3.1 MATÉRIELS 220
3.1.1 Outils 220
3.1.2 Réactifs 220
3.2 MÉTHODES 220
3.2.1 Prélèvements 220
3.2.1.1 Prélèvements mensuels 220
3.2.1.2 Prélèvements journaliers 220
3.2.1.3 Prélèvements des eaux de curage 221
3.2.2 Traitement des échantillons 221
3.2.2.1 Echantillons d'eaux usées 221

3.2.2.2 Echantillons d'eaux de curage du réseau d'assainissement 222
3.2.3 Critères de détermination de la viabilité 223
3.2.4 Autres données 223

4 RÉSULTATS 226

4.1 CARACTÉRISTIQUES DE LA STATION D'ÉPURATION DE NANCY-MAXÉVILLE 226
4.2 PARAMÈTRES STATISTIQUES 228
4.2.1 Loi de Poisson 228
4.2.2 Performance de la méthode de concentration/purification 228
4.3 DISTRIBUTION DES GENRES ET ÉVOLUTION DE LA VIABILITÉ DES ŒUFS DE NÉMATODES 229
4.3.1 Fréquences relatives des différents genres 229
4.3.2 Evolution de la viabilité des œufs de Nématodes 230
4.4 MESURE DU FLUX D'HELMINTHES DANS LES EAUX BRUTES 231
4.4.1 Variations mensuelles des concentrations et des flux d'œufs d'helminthes 231
4.4.1.1 Variations mensuelles des concentrations en œufs d'helminthes 231
4.4.1.2 Variations mensuelles des flux d'œufs d'helminthes 232
4.4.2 Variations journalières des concentrations en œufs d'helminthes 233
4.4.2.1 Fluctuations des concentrations en absence de précipitations 233
4.4.2.1.1 Variations horaires des concentrations en œufs d'helminthes 233
4.4.2.1.2 Flux journalier des œufs d'helminthes 234
4.4.2.2 Fluctuations des concentrations lors de précipitations 235
4.4.2.2.1 Variations des débits d'entrée lors d'épisodes pluvieux 235
4.4.2.2.2 Flux journaliers des œufs d'helminthes 238
4.4.2.2.3 Variations horaires des concentrations en œufs d'helminthes 240
4.5 RÔLE DU PARAMÈTRE MES ET DES PRÉCIPITATIONS SUR LE NOMBRE D'ŒUFS D'HELMINTHES 245
4.5.1 Corrélation entre les MES et le nombre d'œufs d'helminthes 245
4.5.2 Relation entre les précipitations et le nombre d'œufs d'helminthes 246
4.5.3 Analyses des eaux de dessablage, de curage d'égouts, de rinçage de bassin d'eaux pluviales 247

5 CONCLUSION 249

5.1 DISTRIBUTION ET VIABILITÉ DES ŒUFS D'HELMINTHES DANS LES EAUX USÉES BRUTES 249
5.2 MESURE DU FLUX D'HELMINTHES DANS LES EAUX BRUTES 249
5.2.1 Variations mensuelles des concentrations et des quantités en œufs d'helminthes 249
5.2.2 Variations journalières des concentrations en œufs d'helminthes 249
5.2.2.1 Absence de précipitation 249
5.2.2.2 Présence de précipitation 250
5.2.2.2.1 Fluctuations des concentrations en œufs d'helminthes 250
5.2.2.2.2 Dilution ou concentration de la charge parasitaire 250
5.2.3 Flux journalier des œufs d'helminthes 251
5.3 RELATION ENTRE LES PRÉCIPITATIONS, LES MES ET LE NOMBRE D'ŒUFS D'HELMINTHES 253
5.4 DISCUSSION 253

Conclusion 256

Références bibliographiques 262

Table des illustrations 282

Introduction

BIBLIOTHEQUE NANCY

La présence d'œufs d'helminthes dans les effluents et les boues est rapportée par de très nombreux auteurs (Stien, 1989; Rosaz, 1993; Gaspard, 1995). L'intérêt porté à ces microorganismes est double :

- D'une part, leur grande résistance dans l'environnement associée à une faible Dose Minimale Infectieuse (DMI) font que ces microorganismes sont considérés dans l'échelle évaluant les risques sanitaires liés à l'utilisation d'eaux usées en agriculture et aquaculture comme les plus susceptibles d'être transmis par ces voies (WHO, 1989). De plus des enquêtes épidémiologiques ont parfaitement démontré ce risque lors d'épidémies liées à la présence d'oeufs d'helminthes au cours de réutilisation agricole d'eaux usées non traitées (Shuval *et al.*, 1986).

- D'autre part, ces œufs représentent un des microorganismes les plus résistants à de nombreux paramètres utilisés en traitement des boues (pH, température,...) mais également dans les sols ou sur les végétaux. (Rose, 1986; Stien, 1989).

Concernant les données sur les helminthiases d'origine humaine, il faut noter que pour les pays européens, la prévalence des helminthiases est faible avec des valeurs indiquées inférieures à 1% (Golvan, 1983; Schuh *et al.*, 1985). Aux USA, les prévalences sont légèrement supérieures avec un pourcentage de 2% pour l'ascaridiose (Rose, 1993). Au niveau mondial ce type de pathologie est très commune avec une estimation du nombre d'individus infectés de 700 Millions pour *Trichuris* (Franceys *et al.*, 1994) et de 1 Milliard pour *Ascaris*. (Crompton, 1989).

L'œuf d'*Ascaris* a été choisi comme modèle étant donné sa grande résistance aux conditions environnementales. En effet, ces œufs résistent au froid, à la dessiccation, à divers désinfectants. Si dans des sols ombragés, humides à basse température la survie peut être longue (quelques mois voire quelques années) (Hannan & Collins, 1983) sur sol présentant une faible capacité de rétention d'eau les survies sont plus courtes, quelques semaines (Richards, 1993). Les propriétés de résistance de ces œufs seraient dues à la présence d'une enveloppe ou coque entourant l'œuf : la couche externe. Cette couche serait responsable d'une perméabilité tout à fait sélective. En effet ces œufs sont faiblement perméables à la vapeur d'eau, imperméables à la plupart des substances (eau, solutions hyper ou hypoosmotiques) à l'exception des gaz et des solvants lipidiques (Clarke et Perry, 1988). Pour Wharton (1980) la coque de l'œuf serait la plus résistante des structures biologiques. Par ailleurs, au niveau de sa composition chimique et de sa capacité d'adhésion, les données bibliographiques sont rares et souvent assez anciennes.

Dans ces conditions, il pouvait être intéressant :

- d'étudier la composition chimique de cette couche externe,
- de déterminer les propriétés de surface de ces œufs car elles sont fortement impliquées dans les phénomènes d'adhésion très importants dans l'environnement.

A partir des informations ainsi acquises, une application sur le terrain peut être envisagée.

Ce travail s'articule autour de deux thèmes :

- la structure et les propriétés de la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*,
- le comportement des œufs dans l'environnement (boues et eaux usées).

La première partie vise à mieux connaître la composition biochimique de la couche externe et ensuite à déterminer les caractéristiques de surface notamment à travers la mesure des interactions hydrophobes et hydrophiles.

Pour atteindre ces objectifs, un travail méthodologique doit être développé car la plupart des techniques (colorimétriques, enzymatiques, spectrométrie IR) ont été décrites pour des microorganismes présentant des caractéristiques très différentes comme les bactéries.

La composition biochimique de cette couche est étudiée avec le dosage de plusieurs composés comme les mucopolysaccharides acides, les glycosaminoglycannes, les protéines, les acides aminés et l'acide hyaluronique. Les caractéristiques de surface sont établies avec la détermination du potentiel d'hydrophobicité, des propriétés hydrophiles et/ou amphiphiles vis à vis de divers supports.

La deuxième partie permet d'étudier le rôle de la couche externe dans deux environnements particuliers, dans des boues résiduaires et des eaux usées.

Au niveau des boues soumises à un traitement par irradiation ß, leur comportement en terme de devenir de l'œuf et de viabilité donc d'infectiosité est étudié.

Enfin, dans un réseau d'eaux usées, les œufs d'helminthes, du fait de leur taille et de leurs caractéristiques de surface ont tendance à sédimenter voire à adhérer aux canalisations. Une étude réalisée lors d'épisodes pluvieux et non pluvieux doit permettre d'évaluer l'influence des précipitations sur une éventuelle remise en circulation des œufs d'helminthes dans le flux d'eaux usées.

L'oeuf d'Ascaris

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

L'OEUF D'ASCARIS

Ce chapitre sur l'étude de l'œuf d'*Ascaris* se divise en 6 parties :

1 Données sur le parasite 26

2 Résistance et devenir des œufs dans l'environnement 30

3 Détermination du caractère viable 37

4 Etude de la structure de l'œuf d'*Ascaris* 40

5 Biochimie de l'œuf d'*Ascaris* 50

6 Respiration de l'embryon 53

1 Données sur le parasite

L'ascaridiose est une parasitose cosmopolite très fréquente dans les pays tropicaux, plus rare dans les pays tempérés. On estime sa fréquence à 900 millions de cas au niveau mondial et 4 millions de cas aux USA (Bourée & Nozais, 1996). D'un point de vue clinique, l'ascaridiose évolue en 2 étapes :

- la première correspondant au stade de migration larvaire est caractérisée notamment par une toux sèche, quinteuse.

- la deuxième coïncidant avec la présence de vers adultes dans l'intestin grêle se traduit par des troubles digestifs avec diarrhées, ballonnements, douleurs abdominales, nausées ou vomissements.

1.1 Description du parasite

Le ver adulte est un nématode de grande taille : les femelles mesurent de 20 à 25 cm de long sur 5 mm de diamètre, et les mâles de 15 à 17 cm sur 2 à 4 mm de diamètre, les mâles sont plus fins que les femelles et présentent une partie terminale en forme de crochet où se situent les spicules copulatoires. Les adultes vivent dans l'intestin de l'homme avec une durée moyenne de vie de 1 à 2 ans. La production d'œufs par femelle et par jour, émise dans la lumière intestinale, est estimée entre 130 000 et 350 000 (Sinniah, 1982). Ils sont ensuite éliminés dans les selles.

Ces œufs se rencontrent sous trois formes morphologiques dans l'environnement :

- les œufs fertiles mamelonnés sont ellipsoïdes de 50 à 75 µm de long sur 40 à 60 µm de large et sont entourés d'une membrane brune et mamelonnée. Ils sont unicellulaires lors de la ponte, et embryonnent dans l'environnement lorsque les conditions de température et d'humidité sont favorables,

- les œufs fertiles décortiqués qui ont perdu leur couche externe dans le tractus digestif ou dans l'environnement,

- les œufs non fertiles qui n'ont pas été fécondés dans l'appareil génital femelle, ils prédominent quand des jeunes femelles adultes sont présentes (Janssens, 1985) ou quand le nombre de mâles est réduit dans l'intestin grêle par rapport au nombre de femelles (Seo *et al.*, 1979).

L'ensemble de ces caractéristiques (nombre d'œufs, capacité de ponte) permet une adaptation associant une grande résistance dans l'environnement de l'œuf grâce à la structure de la coque et une grande dissémination du fait de la ponte d'une grande quantité d'œufs.

1.2 Cycle parasitaire

Les vers adultes vivent dans l'intestin grêle (Figure n°1), où les femelles fécondées pondent des œufs qui sont disséminés dans l'environnement avec les selles La quantité d'œufs rejetés quotidiennement dans les matières fécales est estimée entre 10^6 et 10^8 œufs.

Dans l'environnement et en deux à quatre semaines environ, l'œuf atteint sa maturité et contient une larve enroulée sur elle même. Par contre, si les conditions de température ne sont pas idéales, l'œuf peut mettre jusqu'à 11-12 semaines pour passer à son stade larvaire à une température de 17°C (Wagner & Polley, 1999). Les œufs contenant la larve infestante peuvent souiller les sols et par voie de conséquence les légumes, les fruits et eaux, qui sont consommés par l'homme.

La Dose Minimale Infectieuse (DMI) s'échelonne de 1 à 10 œufs embryonnés. Les œufs éclosent dans l'intestin et les larves libérées entreprennent une longue migration au terme de laquelle elles donnent naissance à des vers adultes. La première étape est le foie, les larves gagnent ensuite le coeur puis le poumon et remontent jusqu'au carrefour aérodigestif où elles sont dégluties et deviennent adultes dans l'intestin. L'ensemble du cycle dure 50 à 80 jours.

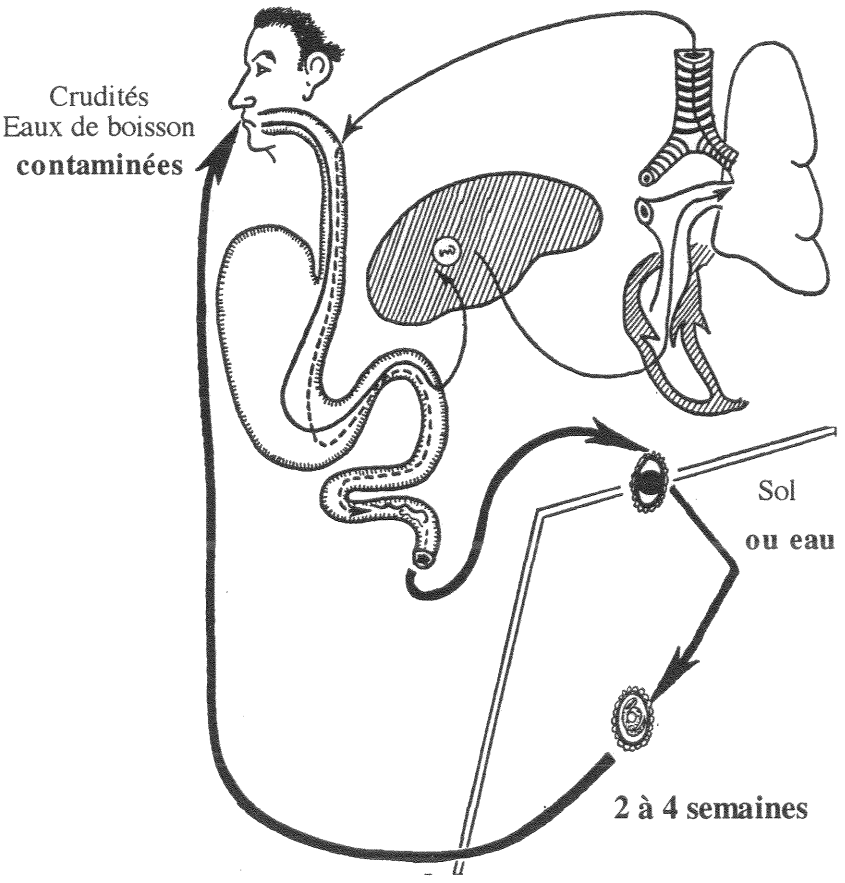


Figure n°1: Cycle d'*Ascaris lumbricoïdes* (Golvan, 1983).

1.3 Epidémiologie

1.3.1 Réservoir de germes

Ascaris lumbricoïdes est un parasite strictement humain, mais surtout fréquent chez l'enfant et en région tropicale. L'Homme est le réservoir de germes, le taux d'infestation peut dépasser 90% dans certaines régions, la prévalence mondiale est de 16% soit de 900 à 1 000 millions de personnes atteintes (Bourée & Nozais, 1996) (Tableau n°1).

Tableau n°1 : Exemples de prévalence humaine de l'ascaridiose au niveau mondial (Schwartzbrod & Schwartzbrod, 1999).

Pays	Prévalence	Nombre de cas (en millions)
Japon	0,6 %	0,73
USA	2 %	4
Caraïbes	3,8 %	1
Afrique	25-70 %	> 200
Mexique	26 %	21,5
Chine	40-80 %	~600
Inde, Pakistan et Sri Lanka	41,4 %	400
Brésil	55 %	80,8
Indonésie	72 %	131

En fait, les prévalences sont variables d'une pays à l'autre, elles s'échelonnent de 0,6 à 80%. Une étude épidémiologique concernant les infections à *Ascaris lumbricoïdes* réalisée sur des enfants et leurs mères au Brésil signale des prévalences de :

- 3,3% pour des enfants de moins de 1 an,
- 30,7% pour des enfants de 1an,
- 42,3% pour les mères d'enfants de moins de 1 an.

Ces données confirment que l'ascaridiose est une maladie infantile et maternelle (Costa-Macedo *et al.*, 1999).

Les œufs, bien protégés par leur double coque séjournant dans le milieu tellurique, résistent aux intempéries et sont facilement transportés par le vent, la poussière et la boue. Dans les zones hyperendémiques, on estime qu'il peut y avoir jusqu'à 100 œufs d'*Ascaris* par gramme de terre.

L'importance de l'endémie varie en fonction de la densité humaine, de l'importance des activités agricoles, du niveau d'hygiène général, enfin des conditions climatiques. Les pluies abondantes diluant les matières fécales accentuent encore la dissémination des œufs.

1.3.2 Modes de transmission

L'infestation de l'homme résulte de l'ingestion d'œufs embryonnés à partir de légumes ou de fruits souillés de terre ou d'eaux contaminées

1.3.2.1 Transmission par des légumes contaminés

Le tableau n°2 indique les niveaux de contamination de différents végétaux comestibles.

Tableau n°2 : Présence d'œufs d'*Ascaris* sur des végétaux comestibles.

Références	Pays ou ville	Légumes	Echantillons positifs (%) ou Concentration (œuf/kg)
Marzochi (1977)	Brésil	Légumes verts	21,2 %
Anuar & Ramachandran (1977)	Malaisie	Laitues	100 %
Rude *et al.* (1984)	USA	Choux	0,0 %
		Concombres	2,0 %
		Radis	2,1 %
		Carottes	2,1 %
		Tomates	6,3 %
		Epinards	9,8 %
Ogunda & Adedeji (1986)	Nigéria	Tomates	9,6 %
		Laitues	25,6 %
Tsuji *et al.* (1997)	Mexico	Carottes	1,9 %
		Epinards	6,1 %
		Coriandres	6,9 %
		Champignons	9,1 %
		Pommes de terre	20 %
Amahmid *et al.* (1999)	Marrakech	Pommes de terre	0,18 œufs/kg
		Navets	0,27 œufs/kg
		Carottes	0,7 œufs/kg
		Coriandres	1,64 œufs/kg
		Menthe	2,7 œufs/kg
		Radis	4,63 œufs/kg

Les niveaux de contamination s'échelonnent de 0 à 100%. Aucune corrélation avec le type de légumes (plantes aériennes ou racinaires) ne peut être faite. Concernant les végétaux comestibles de Marrakech, l'étude réalisée par Amahmid *et al.* (1999) porte sur l'impact de l'irrigation de cultures maraîchères par des eaux usées. Ils démontrent que l'irrigation par des eaux usées brutes entraîne une contamination parasitaire des légumes.

1.3.2.2 Transmission par des sols souillés avec des eaux contaminées

Trois exemples de contamination sont présentés, ils concernent des études parasitologiques réalisées dans le sud de la Thaïlande, dans une plantation de thé au Sri Lanka et dans une communauté villageoise au Vietnam :

- La première étude estime le taux de contamination des sols à 1 œuf/g de sol (*Ascaris, Trichuris* et *Toxocara*) dans le sud de la Thaïlande (Uga *et al.*, 1997).

- La seconde étude relève des taux de contamination importants en helminthes au niveau d'échantillons de sol (Edirisinghe & Weilgama, 1997). De 10,5 à 40% des échantillons de sols contiennent des œufs d'helminthes (*Ascaris, Necator, Trichuris* et *Toxocara)* avec une prévalence de 77,7% des helminthiases chez les personnes résidant autour de la plantation. Les analyses coprologiques démontrent la présence d'œufs d'*Ascaris* (54%), de *Trichuris* (28%) et de *Necator* (22%).

- La troisième étude concerne une population âgée de 1 à 88 ans utilisant de façon traditionnelle leurs excréments comme apport fertilisant au sol. L'analyse de leurs selles indique des pourcentages d'infestation respectivement de 83% et 94% pour *Ascaris lumbricoïdes* et *Trichuris trichiuria* (Needham *et al.*, 1998).

Muller *et al.* (1989) montrent une relation entre la présence des œufs d'*Ascaris lumbricoïdes* dans les sols et l'état sanitaire de la population; ils préconisent d'utiliser la présence de l'œuf d'*Ascaris* comme indicateur de pollutions parasitaires.

1.3.2.3 Transmission liée aux modes de vie

Curtale *et al.* (1998) étudient la prévalence des infections helminthiques sur de jeunes travailleurs de moins de 20 ans résidant en zone urbaine, dans un village "industrialisé" et un village traditionnel près d'Alexandrie en déterminant le nombre d'œufs par gramme de selle. La plus forte prévalence et l'intensité d'infection la plus élevée sont détectées dans la population résidant en ville comparée à celles des zones rurales. Les œufs majoritairement retrouvés sont *Trichuris trichuria* et *Ascaris lumbricoïdes*. L'augmentation des infections parasitaires semblerait être due à la détérioration des conditions de vie et à l'état sanitaire de la ville d'Alexandrie.

2 Résistance et devenir des œufs dans l'environnement

2.1 Résistance à la température et aux agents chimiques

Résistance à la température

Pour évaluer la résistance des œufs d'*Ascaris* à la température, certains auteurs retiennent le critère perte de viabilité, d'autres observent la destruction de l'œuf.

2.1.1.1 Perte de viabilité de l'œuf d'Ascaris

Fairbain (1957) indique que l'œuf d'*Ascaris sp.* fertile perd sa viabilité après 30 minutes à -78°C, par contre :

- l'œuf non-embryonné survit à des températures proches de 0°C,
  et plusieurs semaines en milieu anaérobie à température ambiante,

- l'œuf partiellement embryonné poursuit son développement après 2 mois à 0°C, et après 24 heures à 27°C.

D'autres études (Barnard *et al.* 1987) déterminent un temps de 6,5 minutes pour une perte de viabilité totale de l'œuf d'*Ascaris lumbricoïdes* à 55°C dans un bouillon nutritif. Ghiglietti *et al.* (1993) établissent des températures de létalité pour les œufs d'*Ascaris suum* et d'*Ascaris lumbricoïdes* (Figure n°2).

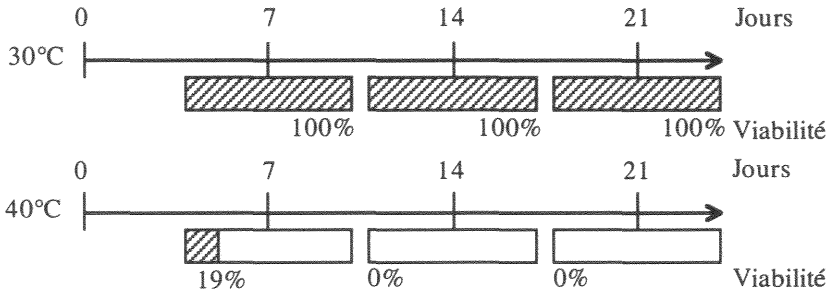


Figure n°2 : Effet de la température sur le pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris suum* (Ghiglietti *et al.*, 1993).

Pour les œufs d'*Ascaris suum*, une température de 30°C n'a aucune action sur la viabilité dans une solution saline à pH neutre. Par contre, une température de 40°C provoque une perte importante de la viabilité dès le 7ème jour, avec seulement 19% d'œufs viables. Au 14ème jour, aucun œuf viable n'est observé.

Pour les œufs d'*Ascaris lumbricoïdes*, les pourcentages de viabilité sont identiques pour les températures de 30°C et 40°C, excepté au 7ème jour, où la viabilité est de 10% au lieu de 19% pour les œufs d'*Ascaris suum*.

2.1.1.2 Destruction de l'œuf d'Ascaris

Feachem *et al.* (1983) illustrent la résistance des œufs *d'Ascaris* en la comparant à celle des virus entériques, de bactéries comme *Vibrio cholerae*, *Salmonella, Shigella*, de parasites comme *Taenia* et *Entamoeba histolytica* (Figure n°3). Ils déterminent la destruction des œufs d'*Ascaris* en fonction du couple de paramètres température/durée dans les boues et les gadoues.

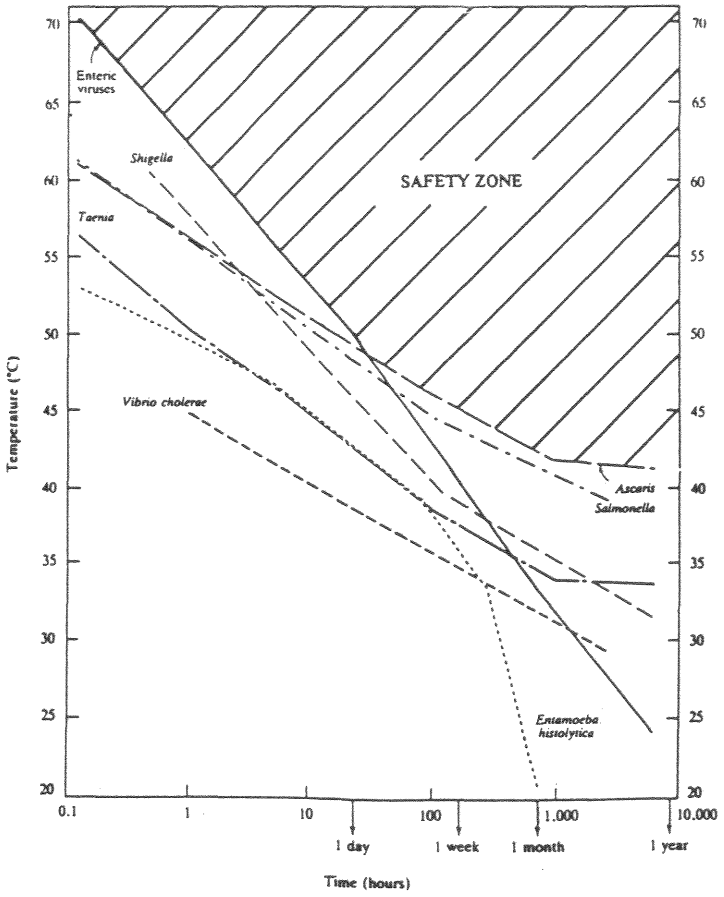


Figure n°3 : Influence du temps et de la température sur la survie des microorganismes dans les gadoues et les boues (les lignes représentent les limites requises pour inactiver différents agents pathogène).

Hormis la grande résistance des virus entériques pendant les vingt-quatre premières heures, les œufs d'*Ascaris* se révèlent les plus résistants des microorganismes.

Il faut cependant noter que la destruction de l'œuf est un paramètre indicateur de présence/absence et non un indicateur de viabilité, des œufs détectés dans certaines conditions de température peuvent avoir cependant perdu leur caractère viable. Cette différence aura pour conséquence une certaine surestimation de la zone de sécurité avec une forte probabilité que des œufs comptabilisés (ou présents) soient en effet non viables pour des conditions de température et de durée extrêmes.

2.1.2 Résistance aux agents chimiques

2.1.2.1 Composés chimiques classiquement utilisés en désinfection

L'œuf d'*Ascaris* est un microorganisme résistant à différents composés chimiques classiquement utilisés en désinfection comme le résume le tableau n°3.

Tableau n°3 : Temps nécessaire pour une perte totale de la viabilité des œufs d'*Ascaris* sous l'action d'agents chimiques (Reimers *et al.*, 1998).

Réactif	Concentration	Temps de contact pour une inactivation de 100%
Acide acétique	10%	42 à 49 jours
Formol	15%	49 jours
Phénol	0,6%	8 à 18 jours

Les œufs d'*Ascaris* perdent leur viabilité après un temps de contact supérieur à 42 jours dans une solution à 10% d'acide acétique ou à 15% de formol. Ce sont des organismes résistants aux traitements chimiques de part la structure de leur coque.

2.1.2.2 Autres composés chimiques

Ghiglietti *et al.* (1993) pour étudier l'effet du couple température/pH, déterminent les pourcentages de viabilité pour les œufs d'*Ascaris suum* à pH 11,9 dans une solution à 30% de NH_4OH (Figure n°4).

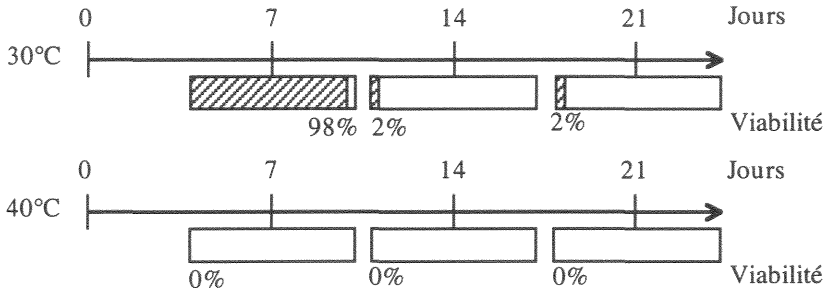


Figure n°4 : Effet de la température sur le pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris suum* dans une solution à 30% d'hydroxyde d'ammonium (Ghiglietti *et al.*, 1993).

Pour une température de 30°C, les pourcentages de viabilité varient de 98% au 7ème jour à 2% au 14ème jour. A 40°C, il n'y a plus d'œufs d'*Ascaris* viables dès le 7ème jour.

Enfin, tout récemment, Mielke & Hiepe (1998) testent l'efficacité d'un nouveau désinfectant dont le principe actif est du p-chloro-m-crésol, le Neopredisan 140. Ils obtiennent une activité ovicide et larvicide de 100% dans une solution à 3% après 15 minutes de temps de contact.

2.2 Devenir dans l'environnement

Globalement les œufs d'*Ascaris* possèdent une large survie à échelonnement de quelques semaines à plusieurs années. Cependant, les résultats sont très variables en fonction de divers paramètres comme la température, l'ensoleillement, l'humidité , la nature du sol, le type de végétal. Les conditions idéales pour l'embryogenèse sont un sol ombragé, une température de 22 à 33°C, une humidité au moins égale à 80%.

L'action de la température est d'autant plus manifeste si les œufs sont directement exposés, leur survie est plus longue en cas de protection par différents substrats (selles, paille). Pour Fairbain (1957), la perte de viabilité est essentiellement due aux effets combinés d'une température élevée et d'une faible humidité. Le soleil exerce une action létale rapide sur les œufs, surtout en milieu sec. L'action combinée de la lumière solaire et de la dessiccation tue les œufs en 4 heures.

Au niveau de la nature des sols, la propriété des sols qui influence le plus fortement et le plus directement le développement et la survie des œufs d'helminthes est la capacité de rétention de l'eau (Stien, 1989). C'est la texture du sol qui détermine la rétention plus ou moins importante d'eau, ainsi les sols argileux (particules inférieures à 2 µm) retiennent beaucoup plus d'eau que les sols sableux (particules de 50 µm à 2 mm). La survie des œufs d'*Ascaris* est donc plus longue sur sol argileux.

Dans l'environnement, la résistance des œufs d'*Ascaris* est variable selon les caractéristiques du sol analysé (Tableau n°4).

Tableau n°4 : Survie des œufs d'*Ascaris* sur les sols.

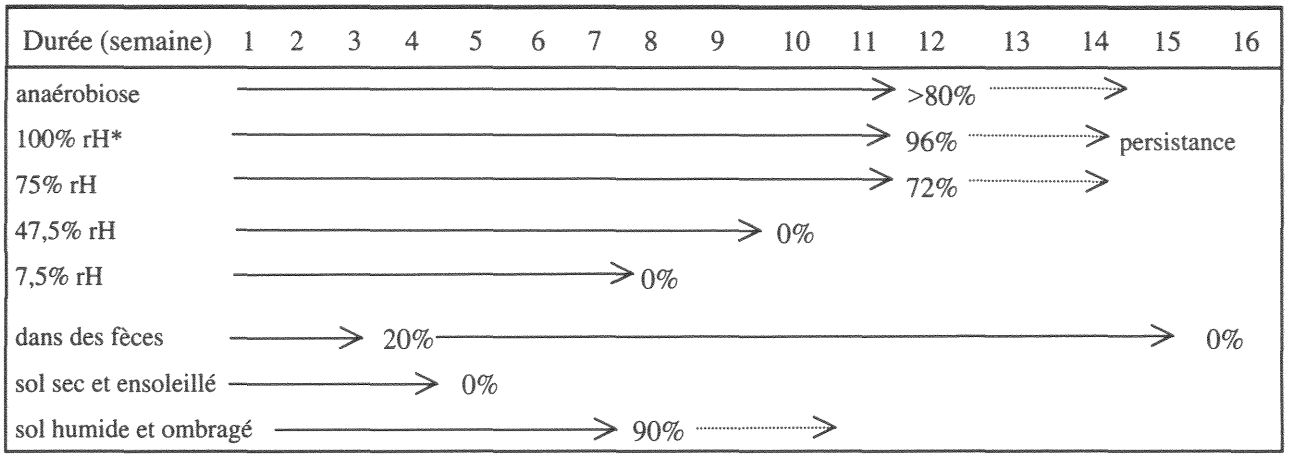
Auteurs	Caractéristiques des sols	Viabilité
Drozdova *et al* (1973)*	sol limoneux en surface	< 1 mois
	sol limoneux à 10-20 cm de profondeur	12 à 36 mois
Bergstrom *et al.* (1981)	sol nu	Embryogenèse entre 7 à 15 semaines
		Disparition entre 0 et 3 ans
Hannan & Collins (1983)	sol avec végétaux	Présence au delà de 3 ans
	sol humide de 5 à 20°C	24 mois
Storey & Phillips (1985)	sol argilo-limoneux	1 à 2 mois (hiver)
Katakura *et al.* (1986)	sol ensoleillé	100% d'œufs dégénérés
	sol ombragé	54 à 99% d'œufs embryonnés

* : citée dans Feachem *et al.* (1983)

Katakura *et al.* (1986) retrouvent 100% d'œufs dégénérés en surface de sol au soleil et de 54 à 99% d'œufs embryonnés à une profondeur de 4 cm. Cette observation est confirmée par Drozdova *et al.* (1973) et par Bergström *et al.* (1981) qui signalent également la présence de nombreux œufs morts en surface. Toutefois au delà d'une certaine profondeur, un effet néfaste sur la viabilité est constaté qui serait sans doute à relier aux conditions anaérobies.

Le tableau n°5 indique la viabilité des œufs d'*Ascaris* suivie pendant 16 semaines dans différentes conditions.

Tableau n°5 : Pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris* sous différentes conditions (en anaérobiose humidité, dans des fèces de porc, sur des sols) (Gaasenbeek & Borgsteede, 1998).



* : Pourcentage d'humidité relative

❖ *In vitro* en anaérobiose, 80% des œufs d'*Ascaris* sont viables au bout de 12 semaines. Les différentes humidités relatives testées en laboratoire montrent l'impact du pourcentage d'humidité sur la viabilité des parasites, néanmoins à 7,5% d'humidité relative, des œufs ne sont plus viables au bout de 8 semaines.

❖ Sur le terrain, les conditions de destruction maximale sont observées sur sol sec et ensoleillé, il faut alors un minimum de 5 semaines pour atteindre un pourcentage de viabilité de 0%.

2.3 Œufs d'Ascaris dans les boues résiduaires

2.3.1 Concentration parasitaire

La comparaison des données reste difficile, en effet les modes d'expression sont multiples (en litre, en gramme de matière sèche ou en gramme de boues), le type de boues est également rarement affiché (boues liquides, déshydratées, digérées, fraîches). Les résultats sont exprimés en œufs d'helminthes et les pourcentages des différents types d'œufs (*Ascaris, Trichuris, Toxocara, Hymenolepis)* ne sont pas toujours indiqués. La détermination de la présence des œufs d'helminthes dans les eaux et les boues donne des concentrations différentes d'une étude à l'autre (Tableau n°6).

Tableau n°6 : Concentration en œufs d'helminthes dans les boues (Horàk, 1992; Schwartzbrod & Schwartzbrod, 1999).

	Boues Nombre d'œufs d'helminthes.
USA	203 - 14 000 / 100 g de MS
France	67 - 380 / 100 g de MS
Grande Bretagne	3 - 85 / 100 g de MS
Grande Bretagne	21 - 167 / L de boues
République Tchèque	24 à 105 /100 g de MS

Dans le tableau n°6, les concentrations dans les boues varient de 3 à 380 œufs d'helminthes / 100 g de MS en Europe et de 203 à 14 000 œufs d'helminthes/100g de MS aux Etats Unis. Ces valeurs hétérogènes reflètent les situations variables en terme de type et taille de station, de l'état sanitaire de la population, des raccordements à des abattoirs ou des fermes.

2.3.2 Impact des traitements

Les traitements des eaux usées restent peu efficaces sur la viabilité des œufs d'*Ascaris*. Johnson *et al.* (1998), dans le tableau n°7, ont réalisé des expérimentations en contamination artificielle avec des œufs d'*Ascaris* non-embryonnés provenant de fèces de porc et des œufs d'*Ascaris* embryonnés (après une incubation de 3 semaines en laboratoire) et exposés à divers procédés de traitement.

Tableau n°7 : Viabilité des œufs d'*Ascaris suum* exposés à différents procédés de traitement (Johnson *et al.*, 1998).

Traitement	Stade des œufs	Nombre de semaines	Viabilité*
Digestion anaérobie mésophile	non-embryonné	1	96%
	non-embryonné	5	51%
	embryonné	5	45%
Lagunage des boues	non-embryonné	29	>98%
	embryonné	29	>90%

* : Viabilité contrôlée par observation de la larve mobile à l'intérieur de l'œuf

❖ Pour des œufs non-embryonnés, une digestion mésophile anaérobie permet une réduction de la viabilité de 45% en 5 semaines, passant de 96% à 51%. Il existe peu de différence entre les pourcentages d'œufs viables non-embryonnés et embryonnés obtenus après 5 semaines de traitement. Il est intéressant de remarquer que les pourcentages sont encore élevés après 5 semaines de digestion, alors que les traitements courants de digestion anaérobie mésophile sont en général de 3 semaines.

❖ Suite à des traitements par lagunage, Johnson *et al.* (1998) trouvent des pourcentages de viabilité encore très importants au bout de 6 mois.

De même, Reimers *et al.* (1998) déterminent des temps de rétention pour une complète inactivation des œufs d'*Ascaris* (pourcentage de viabilité nul) au cours de procédés de digestion aérobie et anaérobie en fonction de la température (Tableau n°8).

Tableau n°8 : Prévision des temps de rétention de digestion en fonction des températures pour une perte totale de la viabilité des œufs d'*Ascaris* (Reimers *et al.*, 1998)

Température (en °C)	Temps de rétention (en jours)	
	Digestion aérobie	Digestion anaérobie
25	130	74
35	90	53
45	50	30
55	10	9
60	< 1 heure	< 1 heure
70	< 1 heure	< 1 heure

Nous remarquons que pour des températures de 25°C, les digestions aérobie ou anaérobie ont peu d'impact sur la diminution de la viabilité des œufs d'*Ascaris*. Les temps nécessaires pour obtenir un pourcentage de viabilité nul sont de 74 jours de rétention pour une digestion anaérobie et de 130 jours pour une digestion aérobie, soit un effet létal plus marqué en digestion anaérobie. Seule la température semble affecter la viabilité des œufs d'*Ascaris* avec pour une température de 60°C, un temps de rétention faible inférieur à une heure.

O'Donnell *et al.* (1984) indiquent des temps encore plus importants avec 16 mois à 25°C pour inactiver les œufs d'*Ascaris* lors d'un stockage de boues provenant de digestion anaérobie. Ces études confirment la résistance des œufs d'*Ascaris* dans les boues.

3 Détermination du caractère viable

3.1 Définition de la viabilité

L'œuf subit un développement interne chez l'Homme et une embryogenèse externe dans l'environnement tellurique, il passe de l'état d'œuf fertile OF à l'état d'œuf infectieux (O1, O2) puis se transforme en une larve (L1 à L4) (Tableau n°9). La détermination de la viabilité peut se décrire par la formation de la larve, par l'éclosion et par la migration du parasite dans l'organisme de l'hôte.

Tableau n°9 : Cycle d'un *Ascaris lumbricoïdes* (Caceres *et al.*, 1982).

	Stade de développement	Activités principales	Localisation	Evolution (jours)	Relations numériques
HOMME	Larves invasives (L2 et L3)	Invasion Migration	Foie et poumon	14 jours	O2 > L2 L2 > L3
	Larves L4 Jeunes vers (J)	Croissance et développement Installation Croissance et développement	Petit intestin	61 jours	L3 > L4 L4 > J
	Adultes femelles (F) et mâles (M)	Croissance Survie et reproduction	Petit intestin	environ 1 an	J > F* + M OF*
ENVIRONNEMENT	Œufs fertiles (OF) Œufs avec larves L1 (O1)	Survie Développement embryonnaire	Sol et eau	> 10 jours	OF > O1
	Œufs infectieux avec larves L2 (O2)	Survie Transmission passive à un nouvel hôte	Sol Main Nourriture	Quelques semaines à plusieurs années	O1 > O2

* une femelle *Ascaris* (F) produit 6,5 X 10^7 œufs fertiles (OF)

Plusieurs critères ou caractéristiques des œufs permettent de définir la viabilité :

- *un stade embryonnaire* avec 2, 4, 8 ou 16 cellules (Stien, 1989; Johnson *et al.*, 1998)
- *un stade larvaire* avec le développement d'une larve à l'intérieur de l'œuf, certains critères vont jusqu'à l'observation de la mobilité de la larve (EPA, 1992a). Son temps d'incubation pour l'embryogenèse varie de 18 à 30 jours selon les auteurs, mais la larve est mobile et vermiforme dès le neuvième jour (Fairbain, 1957).
- *la capacité d'éclosion* de la larve in vitro après l'embryogenèse
  1. Clarke & Perry (1988) disposent les œufs au stade larvaire sous une atmosphère d'azote gazeux à 95% et de dioxyde de carbone à 5%, entre 34 et 40°C dans un milieu contenant NaCl, $NaHSO_3$, $NaHCO_3$,
  2. Urban *et al.* (1981) introduisent les œufs au stade larvaire dans une solution d'hypochlorite de sodium à 37°C 3 minutes.
- *l'infectiosité à l'animal* avec une ingestion des œufs au stade larvaire par des rats, puis autopsie après 8 jours et prélèvement des poumons, foie, cerveau pour la mise en évidence des larves aux stades L3 et L4 (O'Donnell *et al.*, 1984; Arene, 1986).

3.2 Méthodes de détermination de la viabilité

Ces techniques utilisent les caractéristiques du cycle des Nématodes avec notamment le passage du stade œuf unicellulaire au stade œuf larvaire. En effet, la majorité des œufs de Nématodes retrouvés dans les boues est rejetée dans les selles à l'état de zygote unicellulaire. L'objectif de ces techniques consiste donc à tester la capacité de ces œufs, à évoluer au stade larvaire après leur avoir fourni les conditions favorables à leur développement.

Pour ce faire, l'incubation des œufs peut être réalisée :

- en milieu solide sur gélose (Hubert & Kerboeuf, 1984) en utilisant de l'extrait de levure entre 20 et 25°C pendant 21 jours,
- en milieu liquide, cette technique est la plus utilisée (Tableau n°10).

Tableau n°10 : Conditions de temps et température utilisées pour déterminer la viabilité.

Référence	Milieu	Température (en °C)	Durée d'incubation (en jours)
Arther *et al.* (1981)	Formaldéhyde à 1,5%	22-25	21-28
Black *et al.*, (1982)	Eau et antibiotique et antifongique	25	30
Pike *et al.* (1988)	Eau acidifiée	22	21
Barbier *et al.* (1990)	Solution formolée à 2%	30	24
Massara *et al.* (1991)	H_2SO_4 0,1N + agitation	28	8
EPA (1992a)	H_2SO_4 0,1N	26	35
Gaspard (1995)	H_2SO_4 0,1N	30	30

L'incubation en milieu liquide contenant H_2SO_4 pH 1 est la plus fréquemment utilisée. Elle peut être effectuée à différentes températures avec des temps d'incubation variables, Boisvenue (1990) regroupe les combinaisons possibles délai d'incubation/température dans le tableau n°11.

Tableau n°11 : Température et temps d'incubation pour l'obtention de 50% de larve L1 (Boisvenue, 1990).

Délai d'incubation en jours	Température (en °C)
18,5	20
11,0	23
7,6	26
7,2	28
5,3	30
5,7	32

4 Etude de la structure de l'œuf d'*Ascaris*

4.1 Morphologie de l'œuf d'Ascaris

Plusieurs études se sont attachées à déterminer les caractéristiques volumétriques et massiques de l'œuf d'*Ascaris*, il est ellipsoïde de 50 à 75 µm de long sur 40 à 60 µm de large et est entouré d'une membrane brune et mamelonnée (Fairbain, 1957).

Tableau n°12 : Répartition volumétrique de l'œuf d'*Ascaris lumbricoïdes* (Fairbain & Passey, 1957).

	Volume	
Œuf embryonné	59 500 μm^3	100 %
Coque	23 100 μm^3	39 %
Embryon	21 500 μm^3	36 %
Fluide périvitellin	14 900 μm^3	25 %

Fairbain & Passey (1957) en assimilant l'œuf à une sphère, ont estimé son volume total à 59 500 μm^3, le volume du fluide périvitellin avec l'embryon représente 61%, et donc par différence, le volume de la coque représente 39% de l'œuf. Le tableau n°12 indique les volumes et les pourcentages respectifs des différentes parties de l'œuf d'*Ascaris lumbricoïdes* embryonné (Fairbain & Passey, 1957).

Ces données montrent que la coque occupe une place importante dans la structure de l'œuf d'*Ascaris*. Pour 100 g d'œufs (poids sec) sans couche externe et non-embryonnés, le fluide périvitellin représente un volume de 54 mL, celui de l'embryon atteint 77 mL (Fairbain & Passey, 1957).

Magat *et al.* (1972) déterminent masses, densités et volumes d'œufs non-embryonnés, embryonnés et au stade larvaire (Tableau n°13).

Tableau n°13 : Analyse quantitative des œufs et des larves d'*Ascaris suum* (Magat *et al.*, 1972).

	Œuf non-embryonné	Œuf embryonné	Larve
Poids sec (ng)	52,9	22,3	9,7
Masse[a] (ng)	95,1	71,3	
Densité relative	1,104	1,059	
Volume (μm^3)	86 200	67 300	

[a] : Masse = Densité relative x Volume

4.2 Formation de l'œuf d'Ascaris

4.2.1 Formation de l'oocyte

Chaque ovaire de 200 à 250 cm de long pour Schmidt & Roberts (1989) et de 1 mètre environ pour Chitwood & Chitwood (1974), permet aux oogonies d'évoluer en oocytes par des divisions mitotiques successives. L'oviducte contient les oocytes rattachés radicalement à un axe central appelé rachis.

Durant leur migration à travers l'ovaire, l'oocyte augmente de taille en raison de l'accumulation d'hydrates de carbone, de lipides et probablement de protéines (Fairbain, 1957). Foor (1967) conforte ces observations en démontrant que l'oocyte accumule pour une large part du glycogène et des esters d'ascaroside durant son développement, cette réserve énergétique sera utilisée lors de la formation de la coque.

Les oocytes se développent progressivement jusqu'à ce qu'ils soient libérés du rachis, près de la jonction oviductes utérus où ils seront fertilisés (Foor, 1967).

4.2.2 Fertilisation

La fertilisation intervient plus ou moins simultanément avec la formation de la coque (Foor, 1967). Les événements s'enchaînent ensuite de la façon suivante :

- formation de l'enveloppe primaire de l'œuf par des substrats endogènes,
- pénétration du gamète mâle accompagnée de l'arrondissement de l'oocyte,
- déplacement de granules réfringents du centre vers la périphérie,
- maturation de l'oocyte et formation de la couche lipidique et chitineuse,
- formation de l'enveloppe externe de l'œuf par des sécrétions utérines,
- apparition du fluide périvitellin,
- fusion du pronucleus mâle et femelle.

4.2.3 Formation de la coque

4.2.3.1 Membrane vitelline

Elle est formée par l'ovaire lors de la formation de l'oogonie, elle est la première protection de l'œuf d'*Ascaris*.

4.2.3.2 Formation de la couche chitineuse

Après la fertilisation, entre la membrane vitelline et le cytoplasme, se crée une structure pellucide qui devient rapidement dense, elle est rapidement transformée en couche chitineuse (Foor, 1967; Sromova & Lysek, 1990). Simultanément à la formation de la couche chitineuse, une couche lipidique interne et une couche externe utérine commencent à se former.

4.2.3.3 Formation de la couche lipidique

Il existe 2 hypothèses sur l'élaboration de la couche lipidique :

* pour Foor (1967), sa synthèse est simultanée à celle de la couche chitineuse. La couche lipidique est formée à partir des granules réfringents dans lesquels sont notés des changements jusqu'à ce que la couche chitineuse

soit bien formée. Ces granules se dirigent vers la périphérie de l'œuf, noircissent et fusionnent. Ils se dissolvent dans le fluide périvitellin et sont utilisés dans la formation de la couche lipidique, ces complexes contiennent 75% d'ascaroside associé à un hexose et à une chaîne d'acide gras.

* pour Sromova & Lysek (1990), sa synthèse débute après la formation complète de la couche chitineuse.

4.2.3.4 Formation de la couche externe utérine

L'œuf acquiert une morphologie de surface lors de sa progression à travers l'utérus. Cette couche externe ou couche utérine augmente considérablement les dimensions de l'œuf, elle est constituée à partir des sécrétions utérines.

4.3 Structure de la coque de l'œuf d'Ascaris

Quatre couches sont synthétisées séquentiellement. De l'intérieur vers l'extérieur sont observées :

- une couche lipidique interne
- une couche chitineuse
- une membrane vitelline
- une couche externe.

4.3.1 Hypothèses de formation

La formation des couches lipidiques et chitineuses est endogène, par contre la membrane vitelline est sécrétée exogènement par le tissu éphitélial de l'ovaire. La quatrième couche provient des sécrétions des cellules utérines (Foor, 1967). Concernant la structure de la coque, 2 hypothèses sont émises.

• ***Première hypothèse***

La couche externe est un dépôt régulier à la surface de la couche chitineuse irrégulière (Foor 1967, Ubelaker & Allison 1975). La figure n°5 représente cette structure hypothétique d'une coupe de coque de l'œuf d'*Ascaris* : la coque est constituée d'une couche utérine externe (*ut.*), d'une membrane vitelline (*vi.*), d'une couche chitineuse centrale (*ch.*) et d'une couche lipidique interne (*li.*).

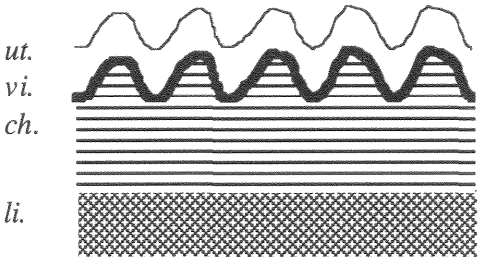


Figure n°5 : Représentation de la coque de l'œuf d'*Ascaris* avec une couche chitineuse mamelonnée et irrégulière.

Foor (1967) montre que la couche chitineuse d'*Ascaris lumbricoïdes* n'est pas lisse et forme ces irrégularités externes que recouvre la couche utérine (Figure n°6). Ubelaker & Allison (1975) suggèrent que la morphologie finale de l'œuf est due à l'activité synchrone de ces cellules utérines. La surface de la couche chitineuse forme une surface spécifique sculptée durant la polymérisation, donnant des crêtes et des dépressions.

Cette surface mamelonnée apparaît collante en microscopie électronique, car de nombreux débris sont observés à la surface de cette couche externe. Ubelaker & Allison (1975) montrent par microscopie électronique, que la région de l'opercule qui permet l'émergence de la larve n'est pas recouverte par ces sécrétions utérines. Cette découverte argumente l'hypothèse selon laquelle les reliefs de surface ne sont pas dus à un procédé de dépôt au hasard lorsque l'œuf passe à travers l'utérus. Le facteur responsable pour cette détermination du modèle architectural est inconnu. Une possibilité a été émise par Ubelaker & Allison (1975) d'une éventuelle interaction du développement de la structure externe avec le matériel présent dans le fluide utérin.

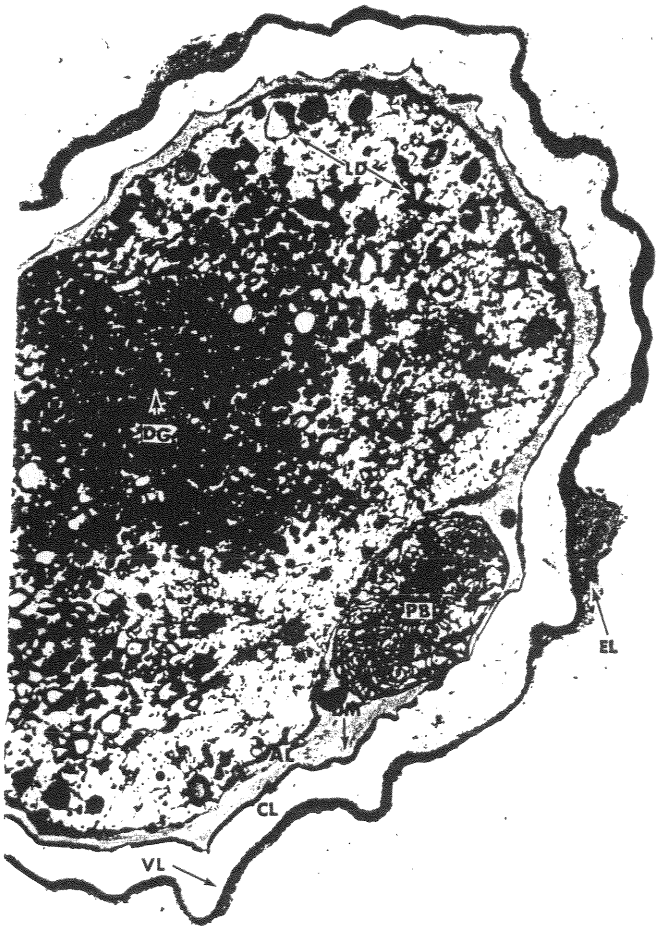


Figure n°6 : Photographie en microscopie électronique à transmission : le corps polaire (PB), la couche lipidique (AL), les granules denses (DG), la couche externe (EL), la membrane vitelline (VL), et la couche chitineuse (CL), × 3500 (Foor, 1967).

• ***Seconde hypothèse***

La couche chitineuse est régulière, la couche externe est responsable de la forme mamelonnée (Christenson *et al.* 1950, Monné & Hönig 1954, Lysek *et al.* 1985). La figure n°7 représente cette structure hypothétique d'une coupe de coque de l'œuf d'*Ascaris* : la coque est constituée d'une couche utérine externe (*ut.*), d'une membrane vitelline (*vi.*), d'une couche chitineuse centrale régulière (*ch.*) et d'une couche lipidique interne (*li.*).

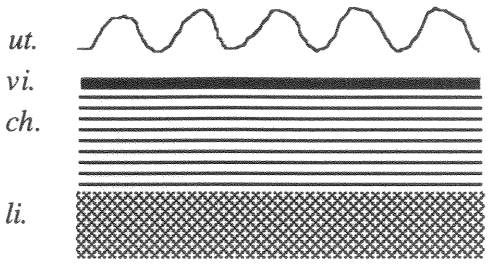


Figure n°7 : Représentation de la coque de l'œuf d'*Ascaris* avec une couche externe mamelonnée et irrégulière (d'après Wharton, 1980).

Pour expliquer ces irrégularités, Christenson *et al.* (1950) proposent l'existence de propriétés de tension de surface au niveau des agrégats protéiques présents dans la couche externe. Cette structure serait due pour Monné & Hönig (1954) aux sécrétions utérines et non à la couche chitineuse régulière.

Lysek *et al.* (1985) montrent en étudiant l'ultrastructure des œufs d'*Ascaris lumbricoïdes*, que l'épaisseur de la couche chitineuse ne varie pas sur l'ensemble de la surface, par contre la couche externe forme une surface typique irrégulière (Figure n°8).

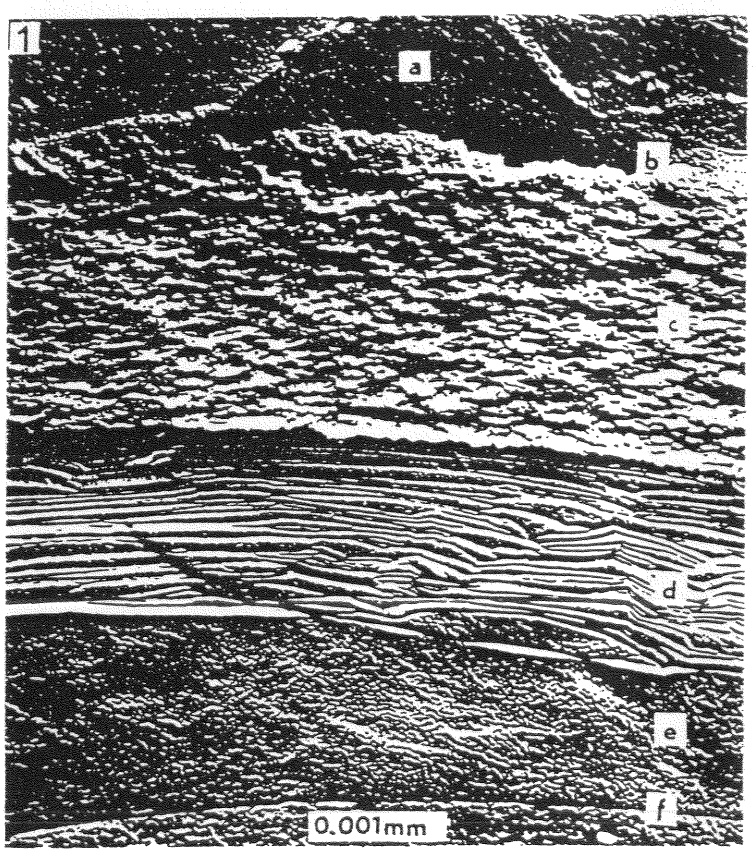


Figure n°8 : Ultrastructure de l'œuf d'*Ascaris* en microscopie à balayage : couche externe (a), membrane vitelline (b), structure fibreuse et irrégulière de la couche chitineuse (c), structure lamellaire de la couche lipidique (d), espace périvitellin (e), membrane cytoplasmique de l'embryon (f), Lysek *et al.*, 1985).

• ***interprétation***

Selon Bouchet (2000), la photographie effectuée en microscopie électronique à transmission par Foor (1967) représenterait un artéfact du à la qualité de la résine déformant les structures lors de la coupe. De plus, la seconde hypothèse semble correspondre aux différentes observations réalisées en microscopie.

4.3.2 Structure des différentes couches

4.3.2.1 Couche lipidique interne

La couche lipidique interne de structure lamellaire adhère à la surface de la couche chitineuse, elle a une épaisseur de 0,8 à 1 µm (Lysek *et al.*, 1985). Elle est responsable de l'extrême imperméabilité de la coque externe de l'œuf, mais elle rend l'œuf sensible à l'action des solvants. Elle est constituée de 25% de protéines et de 75% de lipides, la fraction lipidique contient un complexe d'α-glycosides nommé ascaroside (Wharton 1980, Bartley *et al.* 1996).

4.3.2.2 Couche chitineuse

Sa forme est discutée selon les auteurs (Figures n°5 et 7), elle serait régulière ou donnerait une forme mamelonnée à l'œuf. La couche chitineuse est la plus épaisse de la coque de l'œuf avec 1,64 µm pour Meng *et al.* (1981) et 2 µm pour Lysek *et al.* (1985). Elle apparaît homogène, hyaline et non-structurée, les microfibrilles de chitine sont disposées régulièrement de façon parallèle ou au hasard (Lysek *et al.*, 1985) et mesurent 2,8 nm (Neville, 1975 cité dans Wharton, 1980). Elle contient des protéines servant de matrice aux microfibrilles de chitine.

Meng *et al.* (1981) subdivisent la couche chitineuse en 3 parties, en incluant la membrane vitelline:

- une membrane limitante externe (ou membrane vitelline)
- une zone chitineuse centrale
- une membrane limitante interne

Selon Wharton (1980), le mécanisme de résistance est augmenté par un système d'interconnexions rigides, formé par une variation dans l'épaisseur de la couche chitineuse. Les liaisons covalentes entre la chitine et les protéines, sont responsables de la résistance à différents produits chimiques. La couche chitineuse est soluble à chaud dans des solutions concentrées d'acides minéraux, mais elle est insoluble dans des solutions à forte alcalinité.

Des protéines comme la tyrosine phosphatase et la tyrosine kinase sont présentes dans cette structure lorsque l'œuf est fertilisé, alors qu'elles sont retrouvées dans la membrane vitelline avant la fertilisation (Wimmer *et al.*, 1998). Ces 2 enzymes impliquées dans les phosphorylations de protéines ont un rôle dans les mécanismes de régulation intracellulaires en réponse aux stress environnementaux comme la température, la dessiccation, les rayonnements ultraviolets.

4.3.2.3 Membrane vitelline

Elle a une épaisseur de 0,5 µm (Foor, 1967) et est formée de lipoprotéines. Elle est également responsable de la haute imperméabilité de l'œuf et d'une résistance à une grande variété de solutions chimiques. Par contre, elle peut être détruite d'une part, par certains solvants organiques, qui pénètrent et dissolvent la membrane vitelline et d'autre part, à une température de 70°C (Fairbain & Passey, 1955).

4.3.2.4 Couche externe utérine

Elle joue le rôle de barrière sélective : elle ne permet pas le passage de bactéries et de molécules comme les détergents (Jaskoski, 1952), mais autorise le passage de l'oxygène. Elle a une épaisseur de 1,5 µm pour Lysek *et al.* (1985), par contre elle varie de 1,83 à 8,06 µm pour Meng *et al.* (1980).

4.3.2.4.1 Etudes morphologiques

La couche externe utérine étudiée par différents auteurs (Jaskoski, 1952; Jaskoski, 1962; Foor, 1967; Ubelaker & Allison, 1975; Wharton, 1980; Meng *et al.*, 1981; Lysek & Ondrus, 1992) a des appellations différentes :

- couche albumineuse,
- couche externe,
- couche gélatineuse,
- couche mucoïde,
- couche protéique,
- couche utérine.

Elle est responsable de l'apparence mamelonnée de l'œuf, les origines de cette sculpture irrégulière ont fait l'objet de différentes études. Ainsi Ubelaker & Allison (1975) en microscopie électronique, ont montré que la surface des œufs fertiles des 2 espèces d'*Ascaris* (*A. suum* et *A. lumbricoïdes)* est surmontée de dépressions et d'arêtes, qui sont plus marquées généralement chez *Ascaris suum* que chez *Ascaris lumbricoïdes.*

Meng *et al.* (1981) confirment cette observation avec des œufs fertiles et infertiles des 2 espèces. L'œuf est entouré d'une couche externe mamelonnée avec de 12 à 16 mamelons disposés sur la périphérie. De plus en superficie, la couche utérine externe serait recouverte de fibres filamenteuses (de 540 à 1080 Å de diamètre) formant un réseau de 10 nm de hauteur.

4.3.2.4.2 Les sécrétions des cellules utérines

Foor en 1967, a étudié les cellules utérines produisant les sécrétions que nous retrouvons sur la membrane vitelline des œufs fertiles et non-fertiles. La structure des cellules utérines ressemble à des cellules de sécrétions comme les chondroblastes et les fibroblastes, en ce qui concerne le réticulum endoplasmique granuleux, les complexes de Golgi, les vésicules de sécrétions. Dans les cellules utérines, le contenu des vésicules de sécrétion quitte la cellule vers la lumière de l'utérus.

Polyakova-Krusteva *et al.* (1985) ont étudié l'ultrastructure de l'œuf d'*Ascaris* en microscopie à transmission durant la fertilisation. Les caractéristiques des cellules utérines supposent un métabolisme actif et une synthèse de protéines. Ces cellules ont un réticulum endoplasmique fortement développé et des mitochondries denses aux

électrons avec une activité succinate déshydrogénase. Des produits de nature protéique formant la couche externe, sont transportés par un système de microtubules ouverts sur le lumen utérin.

Lysek & Ondrus (1992) décrivent en microscopie à balayage des sécrétions mérocrines pour les cellules utérines glandulaires. Sur le sommet des cellules, un lobe apical proéminent signale une intense activité de sécrétions dans le lumen de l'utérus. Le matériel dense aux électrons, sécrété par les cellules utérines adhère à la surface externe de l'œuf, sur sa couche chitineuse, et forme la couche externe. En conditions normales, elles durcissent durant le passage dans l'intestin de l'hôte.

4.3.2.4.3 Les modifications de la couleur externe : le "tanning"

La couche externe, présente seulement chez quelques Ascaridés, est transparente et incolore lors de la ponte, puis devient brune sur la périphérie de l'œuf. Ces modifications de couleur accroissent des propriétés d'insolubilité de la couche externe (Monné & Hönig, 1954). Ces auteurs pensent que des protéines de type quinone seraient responsables du brunissement de la coque, ils emploient le terme de "quinone-tanning" pour décrire ces protéines, terme également employé par Wharton (1980).

La couche externe serait constituée selon Meng *et al.* (1981) d'un complexe de mucopolysaccharides et de protéines tannées à caractère acide. Ce phénomène pourrait également provenir de transformations liées à la présence de la bile dans l'intestin.

4.3.2.4.4 Biochimie de la couche externe

Malgré de nombreux travaux décrivant l'œuf d'*Ascaris,* la composition de la couche externe n'est pas connue avec précision, elle serait constituée :

- de mucopolysaccharides (Foor, 1967; Ubelaker & Allison, 1975)
- ou d'un complexe mucopolysaccharides-protéines (Lee, 1961; Meng *et al.,* 1981)
- ou de glycoprotéines (Zulauf & Gut, 1978; Clarke & Perry 1988)
- ou de mucoïdes (Chitwood & Chitwood, 1974).

Cette structure se colore en violet par le bleu de toluidine et en rose-violet par la méthode à l'acide périodique de Schiff PAS démontrant qu'elle est constituée de mucopolysaccharides et de protéines (Monné & Hönig, 1954).

Jaskoski (1962) en analysant différentes fractions de l'œuf d'*Ascaris* (coque, embryon, fluide périvitellin), identifie par chromatographie sur papier 16 acides aminés dans la couche externe de l'œuf (cystine, lysine, histidine, acide aspartique, glycine, sérine, acide glutamique, thréonine, proline, tyrosine, méthionine, valine, leucine, tryptophane, phénylalanine et isoleucine).

Zulauf & Gut (1978) isolent une protéine d'un poids moléculaire d'environ 10 000 par une dénaturation partielle de la couche externe en présence de dodécylsulfate et d'urée. Sous ces fortes conditions, les auteurs remarquent que la protéine n'est pas entièrement dénaturée.

4.3.2.4.5 Propriétés chimiques

Sa résistance à différentes solutions chimiques a été étudiée par Yanagisawa (1955), la couche externe devient molle, se contracte puis se dissout en présence de différents acides (nitrique, sulfurique ou chlorhydrique). En présence d'une solution d'hydroxyde de potassium à 30%, la couche externe coagule et adhère à la membrane vitelline.

La couche externe des œufs provenant de l'utérus a des propriétés différentes selon sa couleur, qui traduirait donc des modifications de propriétés de la couche externe:

1. lorsqu'elle est transparente et incolore (lors de la ponte) :
   - ⇒ elle se dissout pour des pH 1,5-3
   - ⇒ elle s'agglutine et se transforme en fibrilles à pH 9-12
   - ⇒ elle précipite dans l'alcool absolu
   - ⇒ elle est détruite par la pepsine et la papaïne
2. lorsqu'elle est brune (sur des œufs récupérés des selles de l'hôte) :
   - ⇒ elle n'est pas altérée par les variations de pH et par les enzymes cités auparavant
   - ⇒ elle disparaît en présence d'hypochlorite de sodium qui semble être le seul agent capable de détruire cette protection brune.

4.4 Perméabilité de la coque de l'œuf d'Ascaris

Quant à la perméabilité des œufs d'*Ascaris* à différentes substances, les travaux de Barrett (1976) et Clarke & Perry (1988) montrent que l'œuf d'*Ascaris* est capable de s'embryonner normalement dans des solutions hypoosmotiques et hyperosmotiques, et qu'il serait imperméable à l'eau.

Par contre, pour Wharton (1980) la coque de l'œuf serait la plus résistante des structures biologiques, faiblement perméable à la vapeur d'eau, et imperméable à la plupart des substances à l'exception des gaz et des solvants lipidiques.

Selon Mei *et al.* (1997), des protéines nommées As-p18 apparaissent dans le fluide périvitellin à partir du 3ème jour de développement. Elles sont présentes à des concentrations maximales lors de la formation du 1er stade larvaire et pourraient être impliquées dans l'imperméabilité de la couche lipidique. Cette propriété d'imperméabilité accroît les capacités de résistance de l'œuf d'*Ascaris*.

4.5 Comparaison avec d'autres Nématodes

Des études réalisées par Lee (1961) sur les origines de la couche externe avec d'autres Nématodes (*Thelastoma bulhõesi*), montrent que ces œufs possèdent également une couche externe constituée de mucopolysaccharides acides qui sont sécrétés par les cellules utérines.

Des structures similaires sont observées pour d'autres œufs de Nématodes comme *Ascaridia galli* (Simonov & Shigina, 1972) et comme *Heterakis gallinarum* (Lee & Lestan, 1971) qui possèdent une couche interne lipidique, une couche chitineuse, une membrane vitelline et une couche utérine externe.

Chez *Porrocaecum ensicaudatum* (Nématoda: Ascaridia), la couche chitineuse forme la structure externe irrégulière grâce à des variations d'épaisseur et de fines particules sont attachées à la membrane vitelline, la couche externe est absente (Wharton, 1979b). Cette structure de la coque accroît, selon cet auteur, la solidité des couches et augmente la protection de la larve ou de l'embryon enfermé à l'intérieur. Les différentes couches sont représentées dans le tableau n°14 :

Tableau n°14 : Structure de la coque de différents Nématodes avec présence ou absence d'une couche externe.

Parasite	**couches**				**Auteur**
	lipidique	chitineuse	vitelline	utérine	
œufs avec couche externe					
Ascaris suum et *Ascaris lumbricoïdes*	présente en lamelle	complexe protéine-chitine en fibres parallèles	présente	complexe de protéines et mucopolysaccharides	Lysek *et al.* (1985)
Heterakis gallinarum	présente	complexe protéine-chitine non-hélicoïdal	présente	structure fibreuse de nature mucoprotéique	Lee & Lestan (1971)
Oxyuridés	présente	sans protéine	présente	structure fibreuse et granuleuse de nature lipoprotéique	Wharton (1979a)
Thelastoma bulhõesi	présente	présente	présente	mucopolysaccharides acides sans protéine	Lee (1961)
œufs sans couche externe					
Ascaridia galli	présente	complexe protéine-chitine en fibres parallèles	en surface	absente	Simonov & Shigina (1972)
Capillaria hepatica	présente	complexe protéine-chitine hélicoïdal	en surface	absente	Grigonis & Solomon (1976)
Porrocaecum ensicaudatum	présente	irrégulière complexe protéine-chitine non-hélicoïdal	en surface	absente seulement des particules en surface	Wharton (1979b)
Toxocara canis et *Toxocara mystax*	présente	présente	en surface	absente	Ubelaker & Allison (1975)
Trichuris suis	présente	complexe protéine-chitine hélicoïdal	en surface	absente	Wharton & Jenkins (1978)
Tylenchus	constituée de lipoprotéines	complexe protéine-chitine non-hélicoïdal	en surface	absente	Bird & McClure (1976)

5 Biochimie de l'œuf d'*Ascaris*

Dès la fertilisation, l'œuf d'*Ascaris* n'a plus d'échange avec le milieu externe, il évolue et s'embryonne en vase clos, n'absorbant que de l'oxygène et de l'eau sous forme de vapeur, l'œuf excrète seulement du dioxyde de carbone. Son métabolisme utilise l'énergie produite par les constituants présents. L'œuf est constitué de glucides, lipides et protides, dont les concentrations évoluent au cours de l'embryogenèse. Il se développe sur sa réserve interne de glycogène et de lipides.

5.1 Etude des différents composés biochimiques

Le tableau n°15 regroupe les pourcentages de quelques constituants de l'œuf d'*Ascaris lumbricoïdes.*

Tableau n°15 : Pourcentages de constituants des œufs d'*Ascaris lumbricoïdes* (Fairbain, 1957).

Constituants	Pourcentage du poids solide[a]
Lipides	35,0 %
Polysaccharides	15,7 %
Azote total	6,6 %
Azote non protéique	0,6 %
Phosphore	0,7 %

[a] : exprimé en poids sec obtenu à partir d'œufs sans couche externe non-embryonnés

L'œuf est riche en lipides et en glucides. L'azote total (6,6%) est également distribué entre la coque, le fluide et l'embryon.

5.1.1 Lipides

Les œufs d'*Ascaris* prélevés à différents endroits de l'utérus renferment 24 à 26% de lipides. Lorsque les œufs sont émis dans le milieu extérieur, la fraction lipidique totale représente 35% du poids sec des œufs sans couche externe (Tableau n°15), elle est essentiellement constituée de triglycérides (69%), d'ascarosides (21,8%), de phospholipides et de stérols (Fairbain, 1957). L'hypothèse a été émise de l'existence d'autres lipides, correspondant à une fraction insaponifiable contenant des substances non-identifiées autres que les ascarosides et stérols (Fairbain & Passey, 1955).

5.1.1.1 Ascarosides

Leur structure n'est pas connue avec précision (Fouquet *et al.,* 1961; Wharton, 1980). L'ascaroside serait un ascaryl-alcool ou un glycoside avec des chaînes aglycones :

- Selon Fouquet *et al.,* (1961), la fraction aglycone, pour l'ascaroside A, est un mélange de 2-L-alkanols homologues $CH_3CH(OH)(CH_2)_n$ où n varie de 23 à 27, et pour les ascarosides B et C, la fraction aglycone est le dihydroxy-2,6 hentriacontane.

- Selon Wharton (1980), la fraction lipidique contient un complexe d'α-glycoside, associé à une chaîne d'alcool secondaire (2,6-diolhentriacontane) de formule CH_3-CHOH-$(CH_2)_n$-CHOH-CH_3 (avec n variant de

21 à 33 selon l'espèce de Nématode), le -OH de l'avant dernier carbone pouvant être remplacé par un $-CH_3$ ou un -H.

5.1.1.2 Stérols

Les stérols isolés du système reproductif d'*Ascaris lumbricoïdes* semblent être un mélange de composés saturés à 25% et insaturés à 75% (Fairbain, 1957). Les stérols insaturés ont été isolés et identifiés comme du cholestérol.

5.1.2 Polysaccharides

Les concentrations en glycogène et en tréhalose, qui sont pratiquement identiques, représentent 95% des polysaccharides soit environ 13 à 15% du poids total des œufs sans couche externe (Fairbain & Passey, 1957; Magat *et al.,* 1972). Pour étudier la distribution des différents polysaccharides, Fairbain & Passey (1957) ont séparé la coque chitineuse de la larve confinée à l'intérieur de la membrane vitelline. Ils ont ainsi démontré une répartition préférentielle des différents polysaccharides :

- le glycogène est confiné dans la larve et la membrane,
- le tréhalose est dans sa totalité présent dans le surnageant (fluide périvitellin de l'œuf).

5.1.2.1 Glycogène

Le glycogène est une réserve nutritionnelle pour l'adulte comme pour l'œuf, où il est essentiellement présent dans l'embryon et représente 6,9% de l'œuf infectieux et embryonné et 9,0% de l'œuf non-embryonné exprimé en poids sec (Fairbain & Passey, 1957). L'étude de la composition du glycogène montre qu'il contient 71% d'hexose (sans doute du glucose), 1,5% de glucosamine et 3,5% d'azote (Kuzin *et al.,* 1949).

5.1.2.2 Tréhalose

C'est un disaccharide non-réducteur, constitué de 2 α-glucoses, essentiellement présent dans le fluide périvitellin à une concentration de 13,7% et à une concentration de 7,5% dans l'œuf sans couche externe (Fairbain, 1957). Les fortes concentrations en tréhalose (Clarke & Perry, 1988), ne sont pas utilisées comme réserve énergétique, car le métabolisme de l'œuf est de nature aérobie. Il a un rôle de protection de la paroi et de la larve à diverses conditions environnementales comme la dessiccation et la congélation, et dans la résistance à des stress osmotiques en régulant la présence interne de l'eau et en maintenant un niveau d'hydratation de 70% (Clarke & Perry, 1988; Behm, 1997).

5.1.2.3 Chitine

Formée de molécules N-acétyl-D-glucosamine et de protéines, elle est synthétisée à partir de :

- glucose relargué à partir des réserves de glycogène,
- glutamine et d'autres acides aminés comme sources d'azote,
- acétate relargué à partir d'esters d'ascaroside.

La synthèse de la chitine dans la coque de l'œuf d'*Ascaris suum* a été étudiée indirectement en suivant l'activité de la chitine-synthétase (Dubinsky *et al.,* 1986), qui est activée au cours de la fertilisation.

Il existe une seconde enzyme liée à la chitine : la chitinase est synthétisée durant l'embryogenèse, elle sert à rompre la couche chitineuse pour la libération de la larve d'*Ascaris suum*. Ward & Fairbain (1972) montrent que sa synthèse débute à partir de 10ème jour avec une activité maximale vers le 20ème jour.

5.1.2.4 Ascarylose

Le glycoside, appelé ascarylose, est un monoglycoside ou un diglycoside associé à une chaîne d'alcool secondaire (chaîne aglycone) pour former l'ascaroside. Les glycosides sont glycosylés sur l'un ou les 2 groupes hydroxyles de la partie aglycone. L'ascarylose est un 3,6 didéoxy-L-arabinohexose selon Fouquet *et al.* (1961) et Wharton (1980) ou un α L-3,6-didéoxymannose selon Bartley *et al.* (1996), identifiant 6 glycosides chez *Ascaris suum.*

5.2 Evolution biochimique durant embryogenèse

5.2.1 Diminution des teneurs des composés biochimiques

Le poids sec de l'œuf diminue de 5,7% durant les différentes étapes de l'embryogenèse (Fairbain, 1957). Durant cette période de développement, les teneurs en lipides et polysaccharides ne sont pas stables. Le tableau n°16 et la figure n°7 témoignent des variations des teneurs en lipides, en polysaccharides, en protéines et en azote total qui diminuent lorsque l'œuf s'embryonne puis passe au stade larvaire.

Tableau n°16 : Composition biochimique massique de l'œuf d'*Ascaris suum* et de la larve (Magat *et al.*, 1972).

	Œuf non embryonné (en ng)	Œuf embryonné (en ng)	Larve (en ng)
Lipides	15,7	5,3	0,1
Polysaccharides	13,2	6,5	4,0
Protéines	21,9	7,8	4,7
Azote total	3,5	1,2	0,7

5.2.2 Echanges entre les glucides et les lipides

Teneurs en lipides (Figure n°9) : Fairbain (1957) en étudiant l'œuf d'*Ascaris* sans couche externe durant une embryogenèse à 30°C, rapporte une diminution de 15,5% du total des lipides pendant le développement de l'embryon vermiforme, cette diminution est due à la baisse des teneurs en triglycérides essentiellement car les teneurs en ascarosides et phospholipides ne varient pas. D'après Passey & Fairbain (1955), les teneurs en lipides diminuent de 36% à 32,5% durant les 10 premiers jours de l'embryogenèse et de 32,5% à 21,5% durant les 10 jours suivants, jusqu'à ce que l'embryon vermiforme soit devenu infectieux. Ensuite, les lipides continuent à disparaître lentement de l'œuf infectieux pendant plusieurs semaines.

Teneurs en glucides (Figure n°9) : Les concentrations totales en glucides diminuent fortement au cours des 10 premiers jours (avec une chute de 56% par rapport à la concentration initiale), mais elles retrouvent leur taux

de départ au 25ème jour. Les concentrations en tréhalose et glycogène représentent 7,4% et 6,9% respectivement du poids sec de l'œuf non-embryonné sans couche externe au début de l'embryogenèse.

⇒ Les concentrations en tréhalose ont une évolution identique comparée aux variations des concentrations en glucides totaux. Les concentrations diminuent jusqu'au 7ème jour puis retrouvent leur taux de départ.

⇒ Les concentrations en glycogène sont en augmentation les 3 premiers jours de l'embryogenèse, puis diminuent du 3ème au 13ème jour pour retrouver leur taux initial dès le 25ème jour.

Les échanges présents entre les glucides et les lipides du 10ème au 25ème jour de développement, suggèrent la possibilité d'une synthèse extensive de tréhalose et de glycogène à partir des triglycérides (Fairbain, 1957). Cette hypothèse est confortée par le fait que les teneurs en azote protéique et non protéique restent inchangées, les protéines des œufs ne participent donc pas à l'énergie de métabolisation.

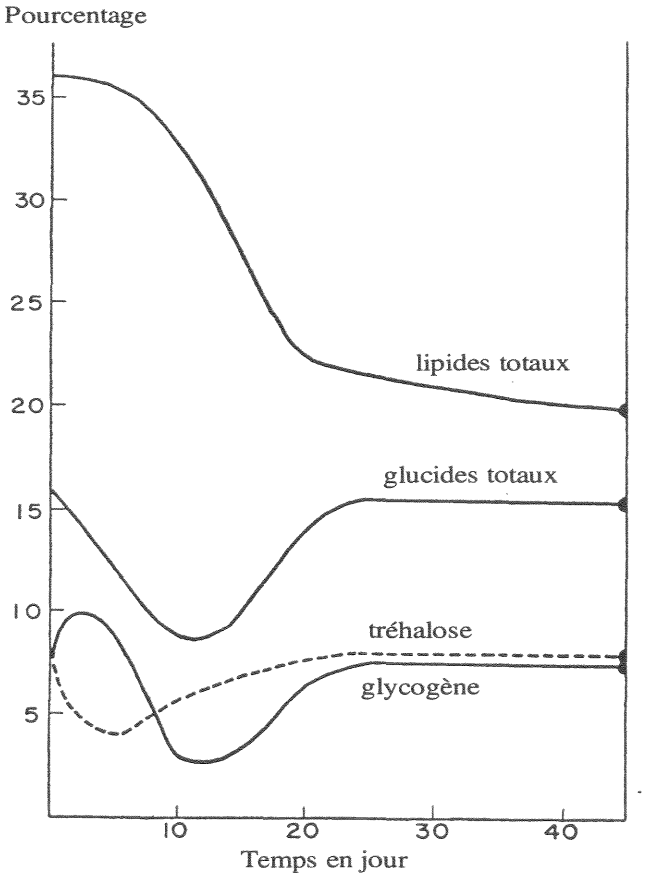


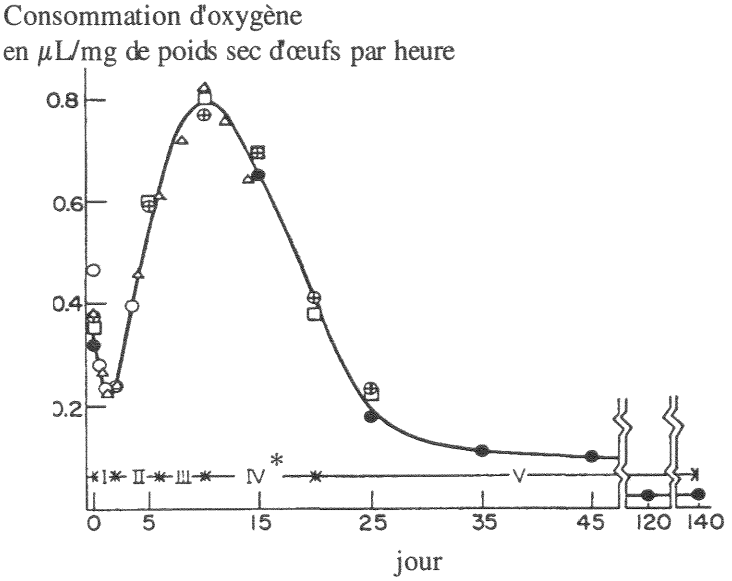
Figure n°9 : Variations en poids sec des pourcentages des lipides totaux, glucides totaux, tréhalose et glycogène de l'œuf d'*Ascaris* (Fairbain, 1957).

6 Respiration de l'embryon

La segmentation de l'embryon est lente à 15°C et optimale à 31°C avec une atmosphère enrichie en oxygène. Le développement de l'embryon s'effectue en aérobiose, nécessitant un apport variable externe d'oxygène qui

traverse la coque externe de l'œuf d'*Ascaris* (Figure n°10), l'oxygène servant à la respiration cellulaire pour la formation de l'embryon (Passey & Fairbain, 1955).

Nous pouvons distinguer sur la figure n°10 plusieurs périodes :
Une première période de J0 à J2 est caractérisée par une diminution de la consommation d'oxygène correspondant à l'initiation de l'embryogenèse. La première division qui a lieu au bout de second jour marque la fin de cette période de faible consommation en oxygène.
Une seconde période avec les divisions cellulaires nombreuses, la consommation d'oxygène augmente fortement jusqu'à J11, où la larve est vermiforme et mobile. La consommation atteint 0,8 µL d'O_2/mg de poids sec d'œufs par heure,
Une troisième période ou phase de quiescence de l'œuf, pendant laquelle la consommation en oxygène est inférieure à 0,2 µL d'O_2/mg de poids sec d'œufs par heure.



* : les différents stades larvaires sont notés I, II, III, IV, V.

Figure n°10 : Taux de consommation en oxygène lors de l'embryogenèse (140 jours) de l'œuf d'*Ascaris lumbricoïdes* (Passey & Fairbain, 1955).

Selon Brown (1928), la consommation d'oxygène pour l'embryogenèse de l'œuf d'*Ascaris* est estimée à 2,5 µL d'oxygène pour une incubation de 11 jours à 30°C ou de 25 jours à 21°C. Cette diffusion de l'oxygène est par ailleurs favorisée par le fait que les œufs d'*Ascaris* présentent une surface importante par rapport à leur volume (Wharton, 1980).

Biochimie de la couche externe de l'oeuf d'Ascaris

BIOCHIMIE DE LA COUCHE EXTERNE DE L'ŒUF D'*ASCARIS*

Ce chapitre concernant l'approche biochimique de la couche externe se divise en 6 parties :

1 Présentation bibliographique des mucopolysaccharides 56

2 Extraction et de quantification des mucopolysaccharides 67

3 Objectifs 73

4 Matériels et méthodes 74

5 Résultats des analyses biochimiques 93

6 Conclusion 112

1 Présentation bibliographique des mucopolysaccharides

Dans la première partie, une étude bibliographique consacrée aux mucopolysaccharides et à leurs constituants, ainsi qu'aux protocoles d'extraction et de quantification de ces molécules, est présentée.

Dans une seconde partie, des tests de colorations histologiques sont réalisés pour révéler la présence de mucopolysaccharides.

La troisième partie concerne les analyses des différents constituants avec le dosage des protéines et des acides aminés, de l'acide hyaluronique et des glycosaminoglycannes, sur des œufs d'*Ascaris,* mais aussi sur des sections d'organes génitaux d'*Ascaris* femelle.

Après avoir précisé la terminologie et la nomenclature chez les mucopolysaccharides, nous nous attacherons à différencier les protéoglycannes des glycoprotéines et à détailler leur rôle biologique. Enfin, la dernière partie est consacrée au protéoglycanne du cartilage choisi comme modèle de mucopolysaccharides car il est le composé qui a fait l'objet de nombreuses études.

1.1 Terminologie

Le terme de mucopolysaccharides a été introduit par Meyer en 1938 (Brimacombe & Webber, 1964) pour décrire des polysaccharides contenant des hexosamines d'origine animale. Le préfixe "muco" a été choisi pour montrer la relation de ce type de substance avec le mucus, terme physiologique caractérisant une sécrétion visqueuse. D'autres termes sont employés tels que glycosaminoglycannes et protéoglycannes. Le tableau n°17 regroupe les différentes terminologies rencontrées dans la littérature et regroupées par Kennedy & White (1988).

Tableau n°17 : Termes employés pour désigner les protéoglycannes et les glycosaminoglycannes.

- **Glycosaminoglycannes**
  - mucopolysaccharide acide
  - acide mucopolysaccharidique
  - aminopolysaccharide
  - mucopolysaccharide
- **Protéoglycannes**
  - complexe mucopolysaccharide-protéine
  - mucoprotéine
  - polysaccharide-protéine
  - protéine-polysaccharide
- **Protéoglycannes (spécifiques)**
  - complexe chondroïtine sulfate-protéine
  - chondromucoprotéine

1.2 Nomenclature

La nomenclature est basée sur l'absence ou la présence d'acide uronique et/ou de résidus sulfates. Le terme de mucopolysaccharide a été accepté pour décrire des hétéroglycannes contenant des résidus d'acide uronique et d'hexosamine. Il regroupe des substances comme l'acide hyaluronique, la chondroïtine et l'héparine qui sont conventionnellement appelées mucopolysaccharides acides (AMPS), ou glycosaminoglycannes.

La distribution topographique des protéoglycannes par rapport à la cellule, procure un autre moyen de classification (Kjellén & Lindahl, 1991). Nous pouvons alors différencier les protéoglycannes intercellulaires (dans les granules de sécrétions), de ceux qui sont associés à la surface cellulaire ou sur la matrice extracellulaire. L'ultime classification est réalisée sur la structure de la protéine. La comparaison des séquences du cœur protéique montre des structures communes caractéristiques, qui se distinguent clairement des autres protéines. Beaucoup de ces molécules sont encore référencées par des noms sans signification tels que : agrécanne, décorine, syndécanne, versicanne, etc..., sans tenir compte de leur fonction et structure caractéristiques (Kjellén & Lindahl, 1991).

Les glycosaminoglycannes peuvent s'associer aux protéines. Ce complexe forme soit des protéoglycannes soit d'autres molécules appelées glycoprotéines.

1.3 Protéoglycannes et Glycoprotéines

1.3.1 Différences entre protéoglycannes et glycoprotéines

Les protéoglycannes sont généralement définis comme des macromolécules avec une protéine formant un tronc sur lequel des chaînes d'oligosaccharides sont attachées par des liaisons covalentes. Ils sont faciles à distinguer des glycoprotéines par la nature, la quantité et la disposition des chaînes latérales glucidiques (Tableau n°18).

Tableau n°18 : Caractères distinctifs des glycoprotéines et des protéoglycannes.

	Glycoprotéine	Protéoglycanne
Composition biochimique	polysaccharide : 1 à 60% protéine : 40 à 99%	polysaccharide : 50 à 97% protéine : 3 à 50%
Quantité moyenne de résidus glucidiques	inférieure à 15 résidus	environ 80 résidus
Disposition des chaînes glucidiques	chaînes ramifiées et courtes de composition variable chaînes *O* et *N*-liées	chaînes non ramifiées et longues chaînes *O* et *N*-liées
Poids moléculaire	rarement supérieure à 3.10^5	3.10^6 (*ex.* cartilage)

1.3.2 Rôle biologique

Leur rôle biologique est hautement diversifié, les glycoprotéines et les protéoglycannes peuvent avoir soit une fonction de support mécanique relativement simple, soit des fonctions plus complexes au cours des processus cellulaires variables comme l'adhésion, la mobilité, la prolifération, la morphogenèse et l'embryogenèse. Au niveau de l'embryogenèse, deux grand rôles sont cités :

Rôle de matrice :

Les protéoglycannes ont un rôle important dans le développement des invertébrés, et plus particulièrement les glycosaminoglycannes et leurs enzymes durant le développement embryonnaire des mollusques. Ainsi les protéoglycannes isolés à partir du mucus entourant l'embryon de *Viviparus ater* (mollusque) pourraient jouer un rôle important dans l'organisation de la matrice extracellulaire en assemblant et maintenant la matrice extracellulaire à l'embryon (Volpi *et al.*, 1998). De même une production de protéoglycannes a lieu durant le développement des œufs de *Drosophila*

Rôle de récepteur des gamètes mâles qui est retrouvé dans plusieurs embranchements animaux :

- Chez la souris, Florman & Wassarman (1985) et Greve & Wassarman (1985) déterminent la présence de glycoprotéines ZP1, ZP2 et ZP3 dans la *zona pellucida* des ovules de souris, ZP3 sert de récepteur pour la fertilisation.

- Pour les bivalves, Focarelli & Rosati (1993) isolent et caractérisent les glycoprotéines de la couche vitelline des œufs de *Unio elongatulus* pour étudier les récepteurs du sperme dans la fertilisation des œufs.

- Chez les mollusques, les interactions du sperme avec les glycosaminoglycannes dans les organes reproducteurs pourraient avoir un rôle significatif pour le succès de la fertilisation des œufs de *Viviparus ater* (Volpi *et al.*, 1998).

- A la surface des œufs de poisson, des composés de type protéoglycanne servent également de récepteur pour le sperme.

Les protéoglycannes sont des molécules de masse importante et de conformation spatiale complexe. La plupart de leurs propriétés dépendent des liaisons de la protéine aux chaînes de glycosaminoglycannes, l'association peut être de faible affinité ou de haute spécificité.

1.4 Structure des protéoglycannes

Un exemple avec le protéoglycanne du cartilage est choisi (Figures n°11 et 12). La figure n°11 donne une représentation tridimensionnelle de la position des cœurs protéiques sur le brin de hyaluronate. Les liaisons entre l'hyaluronate et les nombreuses molécules de protéines sont non covalentes, par contre la protéine est liée de façon covalente aux glycosaminoglycannes (Cox *et al.*, 1991).

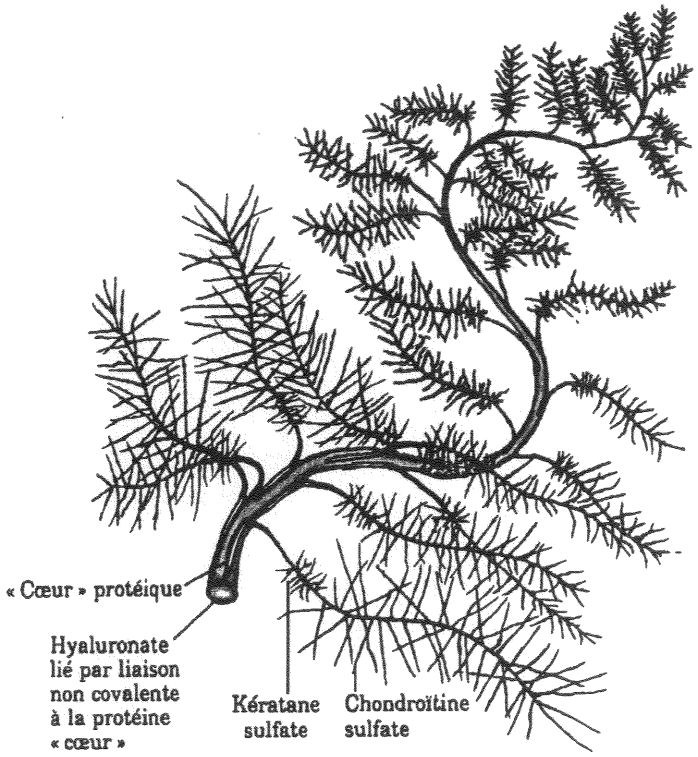


Figure n°11: Exemple d'agrégat de protéoglycanne (Cox *et al.*, 1991).

Le protéoglycanne du cartilage est divisé en 3 zones de caractéristiques et de compositions différentes (Kennedy & White, 1988) :

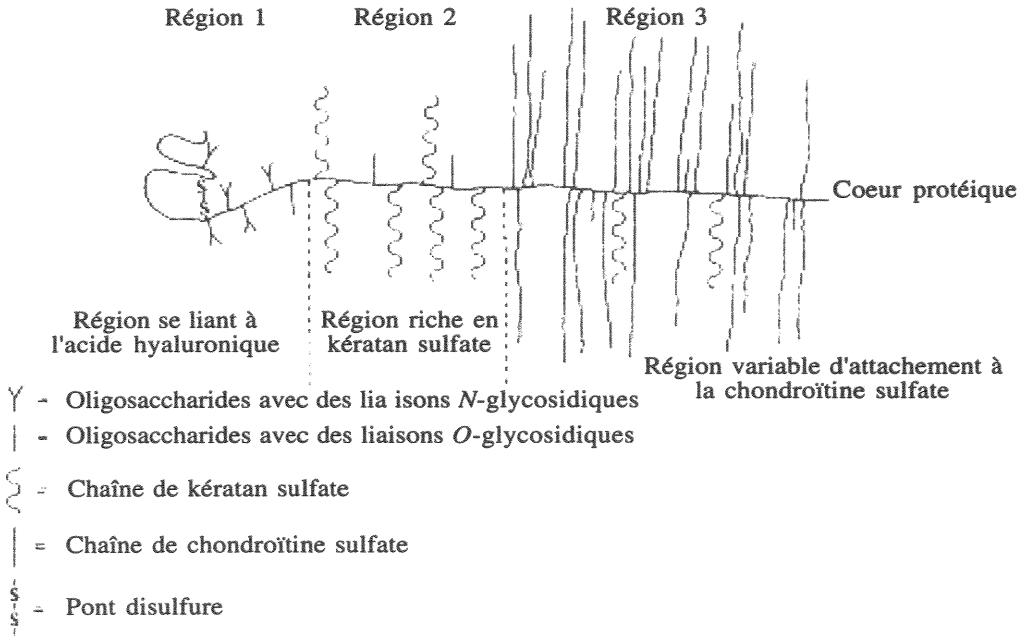


Figure n°12 : Agencement des glycosaminoglycannes sur un "cœur" protéique pour le protéoglycanne du cartilage (Kennedy & White, 1988).

Région 1 : Référencée comme la région de liaison de l'acide hyaluronique (hyaluronic acid-binding region), elle est localisée à l'extrémité de la molécule. La composition en acides aminés de la protéine est relativement élevée en L-acide glutamique ou L-glutamine, et en L-arginine. Aucune chaîne de glycosaminoglycannes n'est présente dans cette région.

Région 3 : A l'extrémité de la protéine, est localisée la région riche en chondroïtine sulfate. Cette portion contient plus de la moitié du coeur protéique. Environ 60% des résidus d'acides aminés sont représentés par :

⇒ L-acide glutamique (ou L-glutamine)
⇒ glycine,
⇒ L-sérine.

Région 2 : Située entre la région de liaison à l'acide hyaluronique et la région de la chondroïtine sulfate, elle possède une proportion élevée de chaînes de kératan sulfate attachées sur le corps de la protéine avec de larges espaces entre les chaînes. Environ 50% des acides aminés sont représentés par seulement 3 acides aminés :

⇒ L-acide glutamique ou L-glutamine,
⇒ L-proline,
⇒ L-sérine représentant déjà 10 à 15% des acides aminés totaux.

1.5 Glycosaminoglycannes : structure et propriétés

1.5.1 Structure gélatineuse

Les glycosaminoglycannes sont attachés à des protéines extracellulaires pour former des protéoglycannes, énormes agrégats dans lesquels le polysaccharide constitue la plus grande partie de la masse, souvent 95% ou plus. Les chaînes polysaccharidiques sont trop rigides pour se replier et constituer les structures globulaires compactes comme en forment normalement les chaînes polypeptidiques, de plus les chaînes polysaccharidiques sont très hydrophiles. Ainsi les glycosaminoglycannes ont tendance à adopter des conformations très étirées, repliées au hasard, qui occupent un volume considérable par rapport à leur masse. Ils forment des gels même à de très faibles concentrations.

L'espace extracellulaire des tissus animaux est rempli de ce gel, qui maintient les cellules d'un tissu et fournit un milieu poreux à la diffusion des nutriments et de l'oxygène vers les différentes cellules. Ce gel est composé d'un réseau en mailles constitué d'hétéropolysaccharides et de protéines fibreuses. L'acide hyaluronique, l'un des polymères qui rende compte de la solidité et de la flexibilité du cartilage et des tendons, est le prototype de ce groupe de polysaccharides extracellulaires. D'autres hétéropolysaccharides, quelquefois en très gros agrégats avec des protéines (protéoglycannes), sont responsables de la viscosité et des propriétés lubrifiantes élevées de certaines sécrétions extracellulaires.

1.5.2 Propriétés biophysiques

1.5.2.1 Viscosité

De nombreuses bactéries dont *Enterobacter aerogenes, Streptococcus pyogenes* et *Pseudomonas aeruginosa* synthétisent de l'acide hyaluronique (HA). HA est un des constituants du tissu conjonctif, et sa fonction est d'assurer la cohésion des cellules dans une matrice ressemblant à un gel. Il sert également de lubrifiant et possède des propriétés d'absorption des chocs. De plus, Osuoji (1971) suggère que HA pourrait avoir un rôle dans les phénomènes d'hydratation et dans la résistance aux agressions bactériennes.

Les propriétés physiques de viscosité sont variables selon les espèces et les méthodes d'extraction. Blumberg & Ogston (cité dans Brimacombe & Webber, 1964), démontrent que l'hydrolyse enzymatique totale de la protéine présente dans le complexe entraîne une réduction considérable de la viscosité, ils en concluent que la protéine est essentielle aux propriétés physico-chimiques du complexe.

Par contre Ogston & Sherman (cité dans Brimacombe & Webber, 1964), montrent que l'hydrolyse enzymatique de 65% de la protéine du complexe n'entraîne pas de perte des propriétés de viscosité. Les caractéristiques physico-chimiques du complexe seraient donc à relier à une fraction plus ou moins importante de la protéine.

1.5.2.2 Densité de charge

Chez certains glycosaminoglycannes, un ou plusieurs des hydroxyles du sucre aminé sont estérifiés par un sulfate. La combinaison de ces groupements sulfates et des groupements carboxyliques des résidus d'acide uronique donne aux glycosaminoglycannes une très forte densité de charges négatives. Le caractère acide de ces substances est stimulé par la présence de groupes sulfates (Brimacombe & Webber, 1964). Pour minimiser les forces répulsives entre les groupements voisins, ces molécules ont une conformation allongée en solution, qui engendre une forte viscosité des solutions.

De plus, leur forte densité en charges négatives attire un nuage de cations, tels que Na^+, qui sont actifs d'un point de vue osmotique, provoquant l'absorption de grandes quantités d'eau dans la matrice. Cette absorption crée une pression de gonflement ou turgescence, qui permet à la matrice de résister aux forces de compressions (Alberts *et al.*, 1986).

1.5.3 Structure biochimique des principaux glycosaminoglycannes

Les glycosaminoglycannes (ou hétéropolysaccharides) constituent une famille de polymères linéaires formés d'unités disaccharidiques répétitives. L'un des deux monosaccharides est toujours soit la N-acétylglucosamine, soit la N-acétylgalactosamine; l'autre est dans la plupart des cas un acide uronique, habituellement l'acide glucuronique. Le tableau n°19 regroupe les différents glycosaminoglycannes et leurs monosaccharides constitutifs.

Tableau n°19 : Glycosaminoglycannes et leurs composés monosaccharidiques (Alberts *et al.*, 1986).

Glycosamino-glycanne	Poids moléculaire	Disaccharide répétitif (A-B)		Distribution tissulaire
		Monosaccharide acide (A)	Monosaccharide basique (B)	
Acide hyaluronique	4 000 à 8 000 000	acide D-glucuronique	N-acétyl-D-glucosamine	tissus conjonctifs, peau, corps vitré, cartilage, liquide synovial
Chondroïtine sulfate	5 000 à 50 000	acide D-glucuronique	N-acétyl-D-galactosamine	cartilage, cornée, os, peau, artère
Dermatan sulfate	15 000 à 40 000	acide D-iduronique ou acide D-glucuronique	N-acétyl-D-galactosamine	peau, coeur, vaisseaux sanguins, valvules cardiaques
Héparane sulfate	5 000 à 12 000	acide D-iduronique ou acide D-glucuronique	N-acétyl-D-glucosamine	poumons, artères, lame basale, surface cellulaire
Héparine	6 000 à 25 000	acide D-iduronique ou acide D-glucuronique	N-acétyl-D-glucosamine	poumon, foie, peau, mastocytes
Kératane sulfate	4 000 à 19 000	D-galactose	N-acétyl-D-glucosamine	cartilage, cornée, disque vertébral

1.5.3.1 Acide hyaluronique ou hyaluronate

L'acide hyaluronique (HA) a été isolé en premier par Meyer & Palmer en 1934 (cité par Brimacombe & Webber, 1964), dans l'humeur vitreuse des yeux, puis il a été récupéré :

chez l'Homme :
- dans différents tissus conjonctifs,
- dans le sérum,
- dans le cordon ombilical,
- dans les liquides synoviaux,

chez l'animal :
- dans les ovaires de lapin,
- dans les embryons de porc.

La structure la plus simple des glycosaminoglycannes est celle de l'acide hyaluronique. Elle est composée de l'acide D-glucuronique comme premier monosaccharide et de la N-acétylglucosamine comme second monosaccharide (Figure n°13). L'acide hyaluronique est donc un polysaccharide linéaire ayant une structure répétitive. C'est le plus grand glycosaminoglycanne contenant entre 500 et plusieurs milliers d'unités de disaccharides et le seul non-sulfaté présent dans la nature.

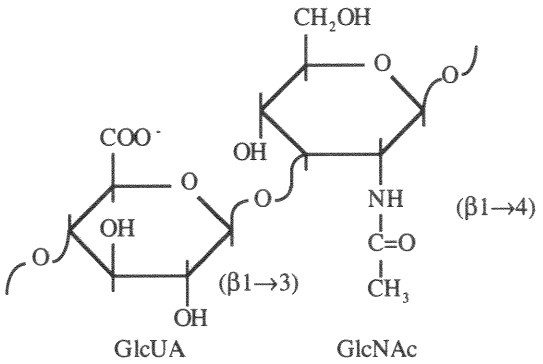


Figure n°13 : Formule moléculaire de l'unité monomérique de l'acide hyaluronique.

Le terme de hyaluronidase a été utilisé pour nommer une série d'enzymes qui hydrolyse certains mucopolysaccharides acides qui ont des spécificités et des produits de dégradation différents. Nous avons répertorié 3 enzymes (Ludowieg *et al.*, 1961) :

- *Hyaluronidase testiculaire* hydrolyse les liaisons endo-N-acétylhexosaminiques de l'acide hyaluronique, de la chondroïtinesulfate A et C, avec production d'une série d'oligosaccharides constitués majoritairement de tétrasaccharides.
- *Hyaluronidase de sangsue* produit des tétrasaccharides, mais rompt les liaisons de l'acide endoglucuronique.
- *Hyaluronidase bactérienne* est inactive sur la chondroïtine sulfate A et C, mais dégrade l'acide hyaluronique en disaccharides avec production d'un acide carboxylique α,β-insaturé.

La hyaluronidase testiculaire a permis à Leppi & Stoward (1965) d'identifier, dans des sections de tissu, des mucopolysaccharides acides. Bowness (1965) a également montré que cette enzyme dégrade la chondroïtine sulfate, mais Knudson *et al.* (1984) ne préconisent pas la hyaluronidase testiculaire pour le dosage de la chondroïtine 4 et 6-sulfate. Selon ces auteurs, l'enzyme coupe les polysaccharides en pentasaccharides et heptasaccharides.

Dickson & Roughley (1993) montrent la présence d'acide hyaluronique dans des échantillons d'os de poulet en dosant l'acide glucuronique provenant de la digestion de l'acide hyaluronique par l'hyaluronidase de *Streptomyces*.

1.5.3.2 Chondroïtine et chondroïtine sulfate

La structure de la chondroïtine est analogue à celle de l'acide hyaluronique, c'est une structure polymérique dans laquelle le résidu N-acétylglucosamine est remplacé par un résidu N-acétylgalactosamine (Figure n°14).

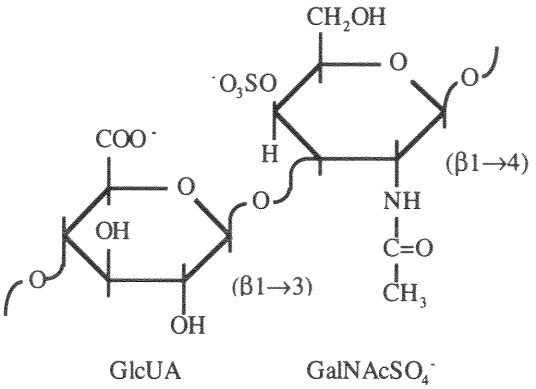


Figure n°14 : Formule moléculaire de l'unité monomérique de la chondroïtine 4-sulfate.

Dans la chondroïtine sulfate, le groupe sulfate est localisé en position 4 ou 6 de la *N*-acétylgalactosamine. Le poids moléculaire de la chondroïtine sulfate est considérablement plus faible que celui de l'acide hyaluronique avec seulement entre 10 et 60 unités de disaccharide présentes dans la plupart des échantillons. La présence du résidu d'acide uronique et du groupement *O*-sulfate sur le dernier groupe hydroxyle rend le glycosaminoglycanne encore plus fortement acide.

1.5.3.3 Dermatan sulfate

Le dermatan sulfate est un isomère de la chondroïtine sulfate dans lequel l'acide D-glucuronique est remplacé par un acide L-iduronique (Figure n°15).

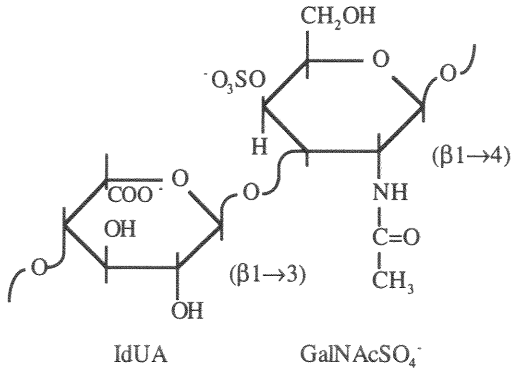


Figure n°15 : Formule moléculaire de l'unité monomérique du dermatan 4-sulfate.

1.5.3.4 Héparine

L'héparine a pour disaccharide un résidu d'acide L-iduronique sulfaté ou D-glucuronique et un 2-sulfamino-2-déoxy-D-glucose 6-sulfate. Dans ce disaccharide, le groupe aminé n'est pas *N*-acétylé comme les autres glycosaminoglycannes, mais *N*-sulfaté (Figure n°16).

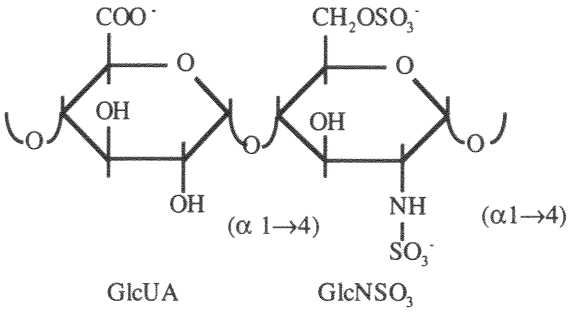


Figure n°16 : Formule moléculaire de l'unité monomérique de l'héparine.

1.5.3.5 Kératan sulfate

Le kératan sulfate ne renferme pas d'acide uronique, qui est remplacé par un hexose neutre : le D-galactose, le second constituant est la N-acétylglucosamine avec un groupement sulfate en position 6 (Figure n°17). Le kératan sulfate du cartilage comporte 5 à 10 unités de disaccharides alors que celui de la cornée en contient 30 à 50 unités.

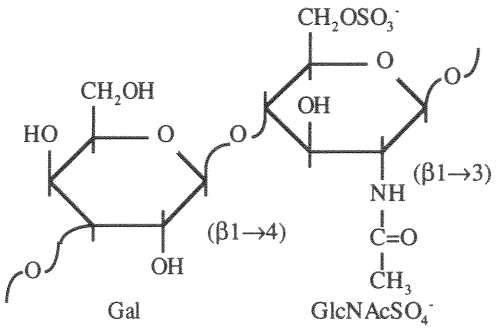


Figure n°17 : Formule moléculaire de l'unité monomérique du kératan 6-sulfate.

2 Extraction et de quantification des mucopolysaccharides

Afin d'étudier les caractéristiques des mucopolysaccharides, il est souvent nécessaire de les extraire des tissus et de les isoler des autres constituants, pour pouvoir déterminer la masse et la concentration des différents éléments le composant.

2.1 Extraction des protéoglycannes des échantillons

2.1.1 Dissolution à la guanidine-HCl

Une dissolution des échantillons de tissu lyophilisé contenant les protéoglycannes à quantifier est envisageable par de la guanidine-HCl à 4M. Eggen *et al.* (1994) l'utilisent sur du tissu musculaire de bovin, et Dickson & Roughley (1993) sur de la poudre d'os poulet. Les 2 équipes emploient cette solution avec des inhibiteurs de protéase, couplée à une ultrafiltration sur des filtres Amicon permettant une purification et une concentration.

Yanagishita & Hascall (1984) isolent les protéoglycannes des cultures de cellules *granulosa* d'ovaires de rat par une solution de guanidine-HCl 4M contenant 2% de détergent Triton X-100. Selon ces auteurs, les structures intracellulaires contenant ces molécules de protéoglycannes sont détruites lors des procédures d'extraction en l'absence de détergents.

2.1.2 Digestion enzymatique

Pour une extraction des glycosaminoglycannes du plasma humain, Volpi *et al.* (1998) préconisent une première digestion enzymatique à la papaïne, et une seconde digestion à la trypsine, associée à la chymotrypsine, à la collagénase et à la pepsine.

2.2 Isolement des protéoglycannes et des différents glycosaminoglycannes

2.2.1 Précipitation des ammoniums quaternaires

Les procédures d'extraction impliquent une précipitation avec des détergents, en particulier le chlorure de cétylpyrimidium, le bromure de cétyltriméthylammonium et le chlorure de benzylcétyldiméthylammonium (Brimacombe & Webber, 1964; Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973; Rahemtulla & Løvtrup, 1974a). Les mucopolysaccharides acides forment des complexes d'ammonium quaternaire, qui sont insolubles dans des solutions fortement salines,

2.2.2 Chromatographie gel-filtration

Les chromatographies gel-filtration permettent de purifier et d'éliminer la guanidine HCl et d'autres sels. Différentes colonnes sont utilisées avec du Sephadex G-50 (fine), DEAE-Sephacel, Sépharose CL-4B, ECTEOLA-cellulose (Yanagishita & Hascall, 1984; Dickson & Roughley, 1993; Van de Lest *et al.*, 1994; Eggen *et al.*, 1994; Volpi *et al.*, 1995)

2.2.3 Gradient de densité

Après une dissolution des échantillons de tissus par une solution de guanidine-HCl, Eggen *et al.* (1994) et Dickson & Roughley (1993) purifient leurs échantillons par une ultracentrifugation en gradient de densité en ajustant la densité de leur extrait à 1,37 $g.mL^{-1}$ par addition de CsCl. Ils récupèrent les protéoglycannes en prélevant les fractions de densité supérieure à 1,31 $g.mL^{-1}$. Yanagishita & Hascall (1984) utilisent également cette méthode de purification avec une densité initiale de 1,43 $g.mL^{-1}$ de CsCl.

2.2.4 Electrophorèse à gel d'agarose-polyacrylamide

Pour séparer les différents glycosaminoglycannes après une dissolution par une solution de guanidine-HCl et une séparation par une gradient de densité au CsCl, Dickson & Roughley (1993) emploient la technique de l'électrophorèse sur gel composé de 0,6% d'agarose et 1,2% d'acrylamide. Après une coloration au bleu de Toluidine, ils visualisent le dermatan sulfate présent dans les os de poulet.

2.3 Déglycosilation des protéoglycannes

La déglycosilation permet de séparer les glycosaminoglycannes liés au coeur protéique. En choisissant des enzymes ou des molécules spécifiques à certaines liaisons, nous pouvons ainsi sélectionner les différents glycosaminoglycannes pour déterminer leurs concentrations respectives.

2.3.1 Glycosaminoglycannes N-liés

Ce sont les plus nombreux des glycosaminoglycannes, et ils se retrouvent majoritairement dans les glycoprotéines, et sont plus rarement présents dans les protéoglycannes. Ils résultent de la conjugaison de la fonction réductrice de la N-acétylglucosamine avec la fonction amide de l'asparagine.

Concernant les glycoprotéines, il existe 2 enzymes rompant les liaisons proches de la protéine :

⇒ une endoglycosidase coupe la liaison entre 2 N-acétylglucosamines, dont l'une est liée à l'asparagine

GlcNAc - ↕ - GlcNAc - Asn

⇒ une glycopeptidase coupe la liaison entre l'asparagine et la N-acétylglucosamine

GlcNAc - GlcNAc - ↕ -Asn

Ces deux enzymes ne sont efficaces que pour des glycoprotéines riches en mannose.

2.3.2 Glycosaminoglycannes O-liés

Les glycosaminoglycannes O-liés sont rares, mais plus spécifiques des protéoglycannes. La région de liaison entre la protéine et le glycosaminoglycanne est pratiquement la même pour tous les protéoglycannes, qu'ils portent des chaînes de chondroïtine sulfate, de dermatan sulfate ou d'héparine sulfate, il s'agit de :

site de coupure
↕
Glycosaminoglycanne → Glucosamine → Galactose → Galactose → Xylose → O-Sérine
ou O-Thréonine

---------- Région de liaison ----------

2.3.2.1 β-élimination

Les liaisons O-glycosidiques entre la N-acétyl-D-galactosamine et l'acide β-hydroxyaminé (la sérine et la thréonine) sont relativement sensibles aux clivages alcalins par une réaction de type β-élimination. Les concentrations couramment utilisées dans ces réactions sont de 50-100 mM, mais elles peuvent provoquer une dégradation des chaînes polypeptidiques. L'ajout d'un puissant agent réducteur comme $NaBH_4$ permet la transformation des acides aminés possédant une liaison glycosidique, la sérine devient de l'alanine et la thréonine devient de l'acide α-aminobutyrique (Florman & Wassarman, 1985).

2.3.2.2 Acide trifluorométhanesulfonique

L'effet de l'acide trifluorométhanesulfonique ou TFMS se traduit par une déglycosilation extensive. Ce réactif permet la lyse des liaisons O-glycosidique d'un monosaccharide adjacent à un acide aminé (sérine et thréonine). En revanche le TFMS ne clive pas les liaisons N-glycosidiques comportant l'asparagine (Edge *et al.*, 1981; Florman & Wassarman, 1985).

2.4 Caractérisation des polysaccharides par la spectrométrie infrarouge

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosages non destructifs basés sur l'étude de l'absorption ou de la réflexion, par l'échantillon de radiations électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 1 et 1 000 μm. Cette bande spectrale est elle-même divisée :

- en proche infrarouge (de 1 à 2,5 μm),
- en moyen infrarouge (2,5 à 25 μm ou de 4 000 à 400 cm^{-1})
- et en lointain infrarouge au delà.

La partie la plus riche en information et la plus accessible d'un point de vue expérimental est celle du moyen infrarouge. Les adsorptions dans ce domaine forment une sorte d'empreinte digitale des composés permettant de les reconnaître et de déduire des détails de structure.

Rahemtulla & Løvtrup (1974ab) ont dosé les mucopolysaccharides acides à partir de vers adultes d'*Ascaris suum* , en réalisant un spectre infrarouge des échantillons d'*Ascaris*, qu'ils comparent aux spectres des glycosaminoglycannes.

2.4.1 Moyen infrarouge

2.4.1.1 Applications analytiques

La principale application des spectres d'absorption infrarouge est l'analyse fonctionnelle et la recherche des différents groupements constituants une molécule. Pour les molécules renfermant peu de liaisons, les spectres d'absorption sont spécifiques de groupements d'atomes, pour les molécules plus complexes, les pics peuvent se recouvrir et nuire à l'interprétation. On distingue 4 groupes de pics d'absorption, qui sont :

- Nombre d'ondes compris entre 2 700 et 3 700 cm^{-1} : les pics sont dus aux liaisons A—H, A pouvant être l'oxygène, l'azote ou le carbone,
- Nombre d'ondes compris entre 2 000 et 2 500 cm^{-1} : les pics décèlent la présence de liaisons triples —C≡C— ou —C≡N et également de doubles liaisons conjuguées (>C=C<),
- Nombre d'ondes compris entre 1 600 et 1 800 cm^{-1} : ils indiquent la présence de doubles liaisons >C=C<; >C=O; >C=N. Le groupe carbonyle >C=O présente dans cette région, une absorption très intense correspondant à des pics très étroits et caractéristiques au voisinage de 1 700 cm^{-1}.
- Nombre d'ondes inférieur à 1 500 cm^{-1} : cette région est complexe et difficile à interpréter

Tableau n°20 : Principaux domaines de vibrations infrarouges pour les grandes familles de molécules biologiques (Daudon & Estepa-Maurice, 1996).

Fréquence (cm^{-1})	Type de vibration	Type de molécule
1700	valence C=O acides carboxyliques	Lipides, acides aminés, chaînes latérales des protéines, bilirubine
1460	déformation C-H	Lipides
1400	valence C-O acides carboxyliques	Lipides, acides aminés, chaînes latérales des protéines
1250	valence SO_4	Glycosaminoglycannes, protéoglycannes
1235	valence P=O esters PO_4	Phospholipides, Acides nucléiques
3600-3100	valence O-H et N-H	Eau de cristallisation, protéines, acides aminés, polysaccharides, urée
3000-2850	valence C-H	Lipides, protéines, polysaccharides
1150-1050	valence C-O alcools	Polysaccharides
1640-1575	valence C=O acides carboxyliques	Acides aminés, acide oxalique
1575-1525	déformation N-H + valence C-N amide II	Protéines
1670-1630	valence C=O amides I	Protéines
1690-1660	valence C=O lactames	Purines
1050-1020	valence PO_4	Apatites
1425-1410	valence CO_3	Carbonates (os, dents,)
1745-1735	valence C=O esters	Lipides

En spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, les glycosaminoglycannes sont identifiés par leur groupement sulfate en 1250 cm^{-1} (Daudon & Estepa-Maurice, 1996).

2.4.1.2 Traitements des échantillons

Pour les procédés par transmission, les échantillons peuvent être gazeux, liquides et solides. Pour les échantillons solides, nous disposons de 3 techniques :

- Dispersion de quelques mg d'échantillon dans une huile de paraffine qui ne présente que 3 bandes principales d'absorption en dehors desquelles le spectre de l'échantillon est exploitable.
- Solubilisation de l'échantillon dans un solvant n'absorbant pas aux longueurs d'onde recherchées.

- Broyage à raison de 0,5 à 3% de solide en présence de KBr sec dans un petit mortier. Ce mélange est ensuite comprimé sous une pression de 5 à 10 t/cm^2, avec une presse hydraulique. La pastille frittée qui en résulte d'aspect translucide de 13 mm de diamètre et d'épaisseur comprise entre 0,2 et 1 mm, correspond à une dispersion de l'échantillon dans une matrice solide.

2.4.2 Spectrométrie à transformée de Fourrier

Les spectromètres en infrarouge à transformée de Fourrier, apparus vers 1970, sont plus sensibles et plus rapides que les spectrophotomètres dispersifs. Ils ont modifié profondément l'infrarouge traditionnel en lui donnant une nouvelle dimension, tant par les possibilités de traitement des spectres, que par ses applications dans l'analyse des micro-échantillons structurés (microanalyse infrarouge) (Rouessac & Rouessac, 1997).

2.5 Détermination des caractéristiques des protéoglycannes

2.5.1 Détermination du poids moléculaire

2.5.1.1 Electrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Pour déterminer le poids moléculaire des protéines, Dickson & Roughley (1993), Eggen *et al.* (1994) et Volpi *et al.* (1998) réalisent une électrophorèse SDS-PAGE après traitement des échantillons purifiés par de la chondroïtinase avec une coloration au bleu de Coomassie.

Pour déterminer le poids moléculaire des glycosaminoglycannes, Dickson & Roughley (1993) remplacent le colorant par du bleu d'Alcian, mais cette méthode reste peu appliquée car les bandes obtenues ne se séparent pas et restent liées.

2.5.1.2 Chromatographie HPSEC (High-Performance Size-Exclusion Chromatography)

Volpi *et al.* (1998) déterminent le poids moléculaire de protéoglycannes à l'aide d'une chromatographie haute performance à exclusion de taille. Les temps de rétention des échantillons purifiés sont comparés aux temps de rétention de glycosaminoglycannes purs.

2.5.2 Détermination du point isoélectrique

Avec une électrophorèse en gel de polyacrylamide, Volpi *et al.* (1998) obtiennent le point isoélectrique de protéines de protéoglycannes traités à la chondroïtinase, en comparant le point isoélectrique de la protéine étalon et la distance de migration de l'échantillon.

2.6 Détermination des concentrations des glycosaminoglycannes

2.6.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet une séparation des glycosaminoglycannes, mais peut aussi permettre la détermination des concentrations. Ainsi Volpi *et al.* (1995) déterminent par une électrophorèse sur gel d'agarose associée à un scanner permettant de mesurer l'intensité de la réponse colorée, les pourcentages respectifs de plusieurs glycosaminoglycannes par comparaison à des étalons internes.

2.6.2 Spectrophotométrie

La méthode de référence dans les dosages des acides uroniques est le dosage de Bitter & Muir (1962) par une solution au carbazole à 0,125% dans de l'alcool absolu. L'échantillon est hydrolysé à chaud par une solution d'acide sulfurique et de tétraborate de sodium avant l'ajout du réactif coloré. Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) augmentent la sensibilité de la méthode en utilisant le méta-hydroxydiphényl au lieu du carbazole pour former un complexe coloré.

Farndale *et al.* (1982), Eggen *et al.* (1994), van de Lest *et al.* (1994) et Volpi *et al.* (1998) utilisent des méthodes de spectrométrie pour doser des glycosaminoglycannes sulfatés, avec comme marqueur coloré le bleu de diméthyleméthylène ou 1,9-DMB.

2.6.3 Chromatographie liquide à haute pression

Les nouvelles techniques publiées sur le dosage des glycosaminoglycannes utilisent des méthodes enzymatiques pour la détermination simultanée de l'acide hyaluronique (HA) et la chondroïtine sulfate (CS) par une chromatographie liquide HPLC en phase inverse en traitant séquentiellement par de la chondroïtinase ABC et de la hyaluronidase (Koshiishi *et al.*, 1998; Volpi *et al.*, 1995; Volpi *et al.*, 1998). Volpi *et al.* (1995) utilisent par exemple l'héparinase de type I, II et III, et différentes chondroïtinases (ABC, ACI Flavo et ACII Arthro).

De même, Kitagawa *et al.* (1995) marquent par le fluorophore 2-aminoacridone les dissacharides résultant de la digestion enzymatique, les glycosaminoglycannes dérivés sont quantifiés par HPLC et électrophorèse capillaire.

2.6.4 Electrophorèse capillaire zonale

Al-Hakim & Linhardt (1991), Grimshaw (1997), Denuzière *et al.* (1997) et Payan *et al.* (1998) caractérisent les glycosaminoglycannes par électrophorèse capillaire zonale (ECZ). La formation de disaccharides, tétrasaccharides et hexasaccharides après une digestion enzymatique spécifique, permet la reconnaissance des unités saccharidiques et la détermination des concentrations présentes par l'extrapolation des surfaces des pics.

2.7 Dosages des mucopolysaccharides chez l'Ascaris adulte

Rahemtulla & Løvtrup (1974ab) ont élaboré des méthodes de dosages des mucopolysaccharides chez les Plathelminthes (Nématodes, Cestodes et Trématodes) avec comme modèle pour les Nématodes l'*Ascaris*. La méthode de fractionnement et de détermination quantitative mucopolysaccharides acides (AMPS) comporte 4 étapes :

3. libération des AMPS de l'échantillon par digestion enzymatique avec de la papaïne,
4. précipitation des AMPS par des détergents avec une solution à 1% de cétylpyridinium,
5. élimination des sucres neutres et cationiques et séparation des constituants sur des colonnes de chromatographie échangeuse d'ions,
6. caractérisation par électrophorèse sur acétate de cellulose des fractions obtenues.

En ce qui concerne les résultats, Rahemtulla & Løvtrup (1974ab) isolent par chromatographie sur colonne 2 fractions, qu'ils caractérisent par électrophorèse. Les 2 composés ont la même mobilité électrophorétique que

l'acide hyaluronique et la chondroïtine sulfate, composants principaux des mucopolysaccharides. Ils dosent ensuite les fractions (Tableau n°21).

Tableau n°21 : Composition en mucopolysaccharides acides chez l'*Ascaris* (Rahemtulla & Løvtrup, 1974b).

Constituant	1ère fraction	2de fraction
Sucres aminés	Glucosamine	Galactosamine
Ester de sulfate	absence	présence
Hexosamine ($\mu M.mg^{-1}$)	1,50	1,22
Acide hexuronique ($\mu M.mg^{-1}$)	1,46	1,24
Sulfate ($\mu M.mg^{-1}$)	0,04	1,53
Protéine (% de poids sec)	4,13	3,40

Au vu de ces résultats, Rahemtulla & Løvtrup (1974b) identifient la première fraction comme de l'acide hyaluronique et la seconde fraction comme de la chondroïtine sulfate et concluent à la présence de mucopolysaccharides acides chez l'*Ascaris* adulte.

3 Objectifs

Malgré les différents travaux décrivant l'œuf d'*Ascaris,* la composition de la couche externe n'est pas connue avec précision, elle serait constituée :

⇒ de mucopolysaccharides (Foor, 1967; Ubelaker & Allison, 1975)
⇒ ou d'un complexe mucopolysaccharides-protéines (Lee, 1961; Meng *et al.,* 1981)
⇒ ou de glycoprotéines (Zulauf & Gut, 1978; Clarke & Perry, 1988)
⇒ ou de mucoïdes (Chitwood & Chitwood 1950).

Les informations sont obtenues à partir de colorations biochimiques, mais aucune quantification n'a été réalisée sur les composés de la couche externe. Le but de ce travail est d'étudier la nature de cette structure par différentes techniques de dosage.

Concernant le plan de travail,

- nous avons débuté avec un ensemble de tests regroupant des colorations histologiques pour caractériser la nature biochimique de la couche externe de l'œuf. Les colorants sont le Bleu de Toluidine, le Bleu d'Alcian, la Fuchsine Basique et l'Acide Périodique de Schiff. Les expérimentations sont effectuées avec des suspensions d'œufs provenant de la dissection d'utérus de ver adulte, et possédant une couche externe importante.
- dans une seconde partie, nous avons réalisé des dosages :
  - de protéines et d'acides aminés
  - d'acide hyaluronique
  - de glycosaminoglycannes sulfatés.

Ces analyses sont réalisées à partir d'œufs d'*Ascaris* en suspension ou lyophilisés et de sections d'utérus de ver adulte. Pour ces trois types d'échantillons, nous avons soit des œufs avec une couche externe, soit des œufs dont la couche externe a été dénaturée.

Dans la réalisation de ce travail, une des difficultés rencontrées réside dans l'approvisionnement en œufs d'*Ascaris*, les quantités de matière première constituent un facteur limitant pour effectuer la plupart des dosages.

4 Matériels et méthodes

4.1 Tests préliminaires avec colorations histologiques

4.1.1 Matériels

4.1.1.1 Œufs d'Ascaris

Les œufs d'*Ascaris suum* sont obtenus à partir de dissection de vers adultes provenant d'un abattoir de porc.

4.1.1.2 Réactifs

4.1.1.2.1 Coloration au Bleu de Toluidine Phéniqué

Fixateur à base de formol (50 mL) et d'éthanol (50 mL)

Les réactifs pour la solution colorée sont :

- Bleu Toluidine ..... 0,5 g (Sigma *réf.* T-3260)
- Ethanol ..... 10 mL
- Phénol ..... 1,5 mL
- Eau distillée ..... qsp 100 mL

4.1.1.2.2 Coloration au Bleu d'Alcian

Solution acide HCl 0,02N

Les réactifs pour la solution à 0,1% de bleu d'Alcian dans HCl 0,02N sont :

- Bleu d'Alcian ..... 0,1 g (Sigma *réf.* 87GX A5268)
- HCl pur ..... 1,6 mL (Sigma *réf.* H-7020)
- Eau distillée ..... qsp 100 mL

4.1.1.2.3 Coloration à l'Acide Périodique - Fuchsine Basique

Les réactifs pour la solution d'Acide Périodique-Fuchsine basique sont :

- Fuchsine Basique ..... 0,5 g (Pararosaniline Sigma *réf.* P-7632)
- Acide Périodique ..... 1 g (Sigma *réf.* P-7875)
- Alcool absolu ..... 80 mL
- Eau distillée ..... 20 mL

4.1.1.2.4 Coloration au Bleu d'Alcian - PAS

Solution de Bleu Alcian :

- Bleu d'Alcian ..... 0,1 g (Sigma *réf.* 87GX A5268)
- Eau distillée ..... 10 mL
- Acide acétique ..... 0,3 mL
- Le pH doit être inférieur à 2,6.

Réactif de Schiff :

Dissoudre à ébullition 0,1 g de Fuchsine Basique dans 20 mL d'eau distillée
Filtrer et laisser refroidir
Ajouter 0,2 g de métasulfite de sodium (Sigma *réf.* S-1516)
Ajouter 1 mL d'acide chlorhydrique 1N
Agiter fortement et laisser reposer quelques heures
Le liquide doit être incolore ou jaune paille.

Acide Périodique :

Acide Périodique ..... 1 g (Sigma *réf.* P-7875)
Eau distillée ..... 100 mL

Eau sulfureuse :

Métasulfite de sodium à 10%.....5 mL
HCl 1N.....5 mL
Eau distillée .....qsq 100 mL

4.1.1.3 Outils

⇒ Cellule de Mac-Master : Poly Labo *réf.* 99520
⇒ Flacon de conservation en polypropylène 40 mL : Poly Labo *réf.* 96616
⇒ Filtre Scrynel Polyester 102 µm : Poly Labo *réf.* 87440
⇒ Microscope Olympus CH
⇒ Polybroyeur de tissu 5 mL PV22 avec un piston en Téflon : Poly Labo *réf.* 06030
⇒ Support de filtration 25 mm avec seringue, surface de filtration 3,4 cm^2 : Poly Labo *réf.* 84827

4.1.2 Méthodes

4.1.2.1 Obtention des suspensions d'œufs d'Ascaris

La dissection des vers s'effectue en 3 phases : dissection des femelles, puis section de la partie distale de l'utérus et enfin obtention des œufs de l'utérus (Figure n°18).

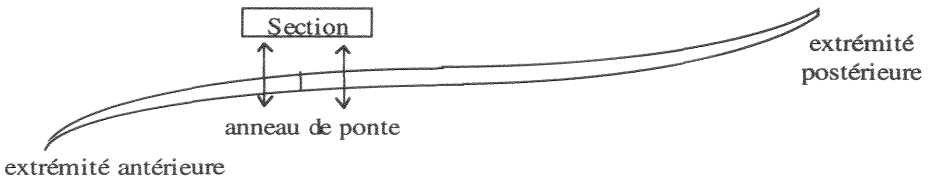


Figure n°18: Dissection d'une femelle *Ascaris*.

Dissection des femelles : Au niveau de l'anneau de ponte, une section de 2 cm est coupée autour de l'anneau (Figure n°19). Une section longitudinale de la cuticule, permet d'observer l'utérus d'une taille de 1 à 5 mm. L'utérus est récupéré avec le canal de ponte et un fragment d'environ 1 cm de chacun des 2 oviductes. Les organes génitaux sont conservés dans une solution contenant 10% d'ATBF (antibiotique-antifongique).

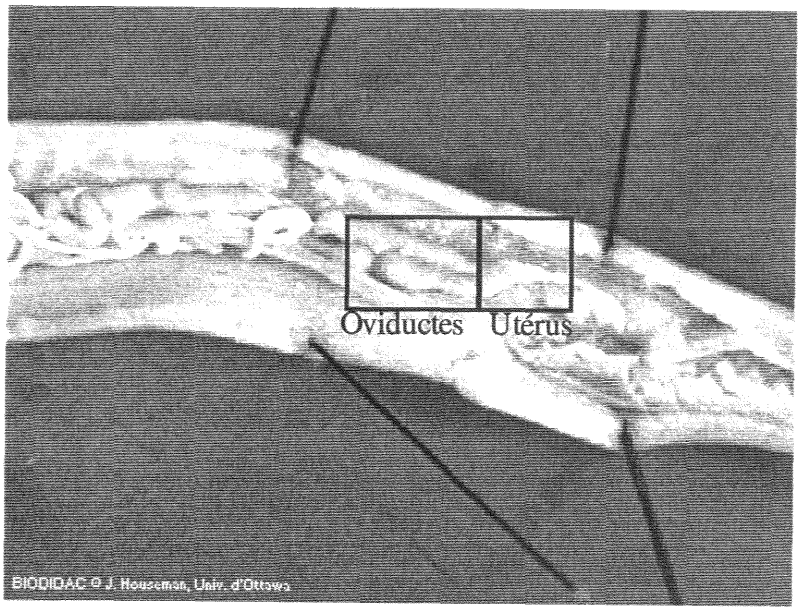


Figure n°19 : Dissection du ver femelle et observation de l'utérus.

Récupération de la partie distale de l'utérus : Il est alors sectionné en 3 parties (Figure n°20) :

section proximale : jonction des 2 oviductes à l'utérus et zone de fertilisation de l'œuf

section centrale : zone de maturation de l'œuf

section distale : zone de formation de la couche externe avant la ponte.

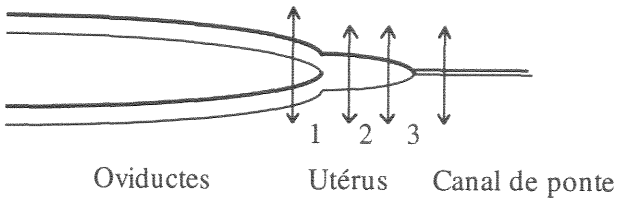


Figure n°20 : Section de l'utérus d'*Ascaris* en 3 parties.

Obtention de la suspension d'œufs : Les sections distales sont broyées avec un polybroyeur de tissu dans une solution de tampon phosphate de sodium 0,1 M à pH 5,3 avec 0,15 M de NaCl. Un broyage de 3 aller-retours avec le piston permet de séparer les œufs du tissu utérin. Les œufs sont ensuite passés à travers un filtre de 102 µm de porosité posé sur un support de filtration relié à une seringue. Les suspensions ainsi obtenues sont numérées sur cellule de Mac-Master et conservées à 4°C dans des flacons en polypropylène de 40 mL.

4.1.2.2 Méthodes de coloration des œufs

4.1.2.2.1 Coloration au Bleu de Toluidine Phéniqué

La technique de coloration est adaptée pour réaliser un examen de surface avec une lecture immédiate.

① Centrifugation à 600*g* 5 min. d'une suspension contenant 100 œufs d'*Ascaris*

② Fixation du culot obtenu par 5 mL de mélange méthanol-formol

③ Après 5 min., centrifugation à 600*g* 5 min.

④ Sur le culot, ajout de 5 mL de la solution de bleu de toluidine
⑤ Après 5 min. de coloration, centrifugation à 600*g* 5 min.
⑥ 2 rinçages successifs couplés à 2 centrifugations 600*g* 5 min. avec 5 mL de solution tampon
⑦ Remise en suspension du culot dans 500 µL et examen au microscope (×400)

4.1.2.2.2 Coloration au Bleu d'Alcian

① Centrifugation à 600*g* 5 min. d'une suspension contenant 100 œufs d'*Ascaris*
② Addition de 1 mL de solution au bleu d'Alcian au culot
③ Temps de contact de 15 min.
④ 2 rinçages successifs avec centrifugation à 600*g* 5 min.
⑤ Examen au microscope (×400)

4.1.2.2.3 Coloration à l'Acide Périodique - Fuchsine Basique

① Centrifugation à 600*g* 5 min. d'une suspension contenant 100 œufs d'*Ascaris*, aspiration du surnageant réduit à 2 mL
② Addition de 2 mL de la solution Acide Périodique - Fuchsine Basique
③ Temps de contact de 30 min.
④ 2 rinçages successifs à l'alcool 70°, avec centrifugation à 600*g* 5 min.
⑤ Examen au microscope (×400)

4.1.2.2.4 Coloration au Bleu d'Alcian - PAS

① 1 mL d'une suspension contenant 100 œufs d'*Ascaris*
② Addition de 1 mL de la solution de bleu d'Alcian acétique
③ Centrifugation à 600*g* 5 min.
④ 2 rinçages successifs avec de l'eau, associés avec des centrifugations à 600*g* 5 min.
⑤ Addition de 5 mL d'acide périodique à 1%, temps de contact de 5 min.
⑥ 2 rinçages successifs à l'eau désionisée, associés avec des centrifugations à 600*g* 5 min.
⑦ Addition de 1 mL de réactif de Schiff, temps de contact de 10 min. et une centrifugation à 600*g* 5 min.
⑧ 1 rinçage à l'eau sulfureuse suivi d'une centrifugation à 600*g* 5 min.
⑨ 2 rinçages à l'eau désionisée suivi de centrifugations à 600*g* 5 min.
⑩ Examen au microscope (×400)

4.2 Caractérisation des constituants de la couche externe par infrarouge

4.2.1 Matériel

4.2.1.1 Chondroïtine sulfate

Nous avons choisi de comparer les spectres des suspensions d'œufs aux spectres d'un constituant majeur des protéoglycannes, la chondroïtine sulfate. Nous avons sélectionné les chondroïtines sulfates A et C qui diffèrent par leur position du groupement sulfate :

⇒ La chondroïtine sulfate A (Sigma *réf.* C-8529) est un disaccharide constitué de (β-acide glucuronique-[1→3]-N-acétyl-β-galactosamine-4-sulfate-[1→4])

⇒ La chondroïtine sulfate C (Sigma *réf.* C-4384) est un disaccharide constitué de (β-acide glucuronique-[1→3]-N-acétyl-β-galactosamine-6-sulfate-[1→4])

4.2.1.2 Suspensions d'œufs d'Ascaris

La suspension d'œufs d'*Ascaris* est obtenue à partir d'une dissection des utérus de vers adultes (*cf.* 4.1.2.1).

4.2.1.3 Spectromètre

Les spectres ont été réalisés sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Bruker Vector 22 avec une séparatrice KBr pour l'interféromètre et un détecteur DTGS.

4.2.2 Méthodes

4.2.2.1 Lyophilisats d'œufs d'Ascaris

Après une filtration à travers un Scrynel en polyester 102 µm (*cf.* 4.1.2.1), la suspension d'œufs d'*Ascaris* est séparée en 2 :

- la première moitié de la suspension d'œufs est lyophilisée pendant 24 heures, elle est dénommée :
  ⇒ lyophilisat d'œufs avec couche externe
- la seconde moitié de la suspension d'œufs subit 3 étapes :
  1. addition d'une solution d'hypochlorite de sodium titrant 1,60 $g.L^{-1}$ pendant 2 heures pour éliminer la couche externe,
  2. trois rinçages et centrifugations successives dans de l'eau désionisée à 400*g* pendant 5 minutes,
  3. lyophilisation pendant 24 heures, elle est dénommée :
     ⇒ lyophilisat d'œufs sans couche externe

4.2.2.2 Pastillage

Les spectres infrarouges en transmission sont réalisés à partir de pastilles de bromure de potassium, constituées de 2 mg d'échantillon et de 198 mg de KBr. Les échantillons sont homogénéisés dans un mortier et comprimés dans une presse hydraulique.

4.3 Dosage des protéines et des acides aminés

Les mucopolysaccharides sont constitués de glycosaminoglycannes et de protéines. L'étude de protéines ou d'acides aminés devrait permettre de caractériser la part protéinique de cette structure.

4.3.1 Dosage des protéines

4.3.1.1 Choix et principe du dosage

Le choix de la méthode de microtitration des protéines s'est porté sur le dosage à l'acide bicinchoninique (BCA). Cette méthode est appliquée à l'étude des enveloppes de levures, renfermant de la chitine et des glycoprotéines, alors que la coque de l'œuf d'*Ascaris* est constituée d'une couche lipidique, d'une couche chitineuse et d'une couche externe, qui semblerait contenir des protéoglycannes.

La méthode de microtitration à l'acide bicinchoninique permet de quantifier les protéines par leurs propriétés réductrices. L'échantillon est mélangé à une solution alcaline de BCA et de sulfate de cuivre de coloration verte. Les ions Cu^{2+} sont réduits par des protéines en solution en ions Cu^{+} qui forment avec le BCA un complexe coloré pourpre, suivant la réaction :

$$\text{Protéine} + Cu^{2+} + \text{BCA} + H_2O + OH^- \longrightarrow \text{Complexe BCA-}Cu^{+}\text{ pourpre}$$

4.3.1.2 Matériels

4.3.1.2.1 Réactifs

Solution protéique étalon de sérum albumine bovine (BSA) à $1 g.L^{-1}$ (Sigma *réf.* P 0914) contenant NaCl à 0,9% et du NaN_3 à 0,05%.

Réactif BCA / $CuSO_4$:

Solution de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ à 4% (m/v) ..... 1 mL (Sigma *réf.* C 2284)
Solution de BCA prête à l'emploi ..... 50 mL (Sigma *réf.* B 9643)

Tampon PBS pH 7,4 :

NaCl ..... 8,08 g (Prolabo *réf.* 27 800.291)
KCl ..... 0,2 g (Prolabo *réf.* 26 764.298)
Na_2HPO_4 ..... 1,15 g (Prolabo *réf.* 28 020.292)
KH_2PO_4 ..... 0,2 g ((Prolabo *réf.* 26 936.293)
NaN_3 ..... 0,2 g (Prolabo *réf.* 27 967.150)
Eau désionisée ..... qsp 1 L

4.3.1.2.2 Echantillons

Lyophilisats de section d'utérus d'*Ascaris* adulte :

Des sections proximales et distales sont récupérées lors de la dissection avant le broyage et mises dans le lyophilisateur.

Lyophilisats d'œufs d'*Ascaris* :

Les lyophilisats d'œufs avec couche externe et les lyophilisats d'œufs sans couche externe sont obtenus selon la méthode citée en 4.2.2.1.

4.3.1.2.3 Outils

Microplaque 96 puits : Nunclon-Surface *réf.* 167008
Agitateur de plaque : New Brunswick Scientific Modèle M52
Lecteur de plaque : Metertech Σ960
Spectrophotomètre : Spectronic Instruments, Septronic 401

4.3.1.3 Méthodes de microtitration

4.3.1.3.1 Gamme d'étalonnage

La gamme étalon est réalisée à des concentrations variant de 0 à 1 $g.L^{-1}$ de sérum albumine bovine (Tableau n°22)

Tableau n°22 : Constitution de la gamme d'étalonnage en microtitration avec la sérum albumine bovine pour le dosage des protéines.

Concentration en BSA ($g.L^{-1}$)	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Solution protéique (µL)	0	4	8	12	16	20
Tampon PBS (µL)	20	16	8	8	4	0
Réactif BCA / $CuSO_4$ (µL)	200	200	200	200	200	200

4.3.1.3.2 Dosage

Les dosages des échantillons en suspension dans 0,1 mL et de la gamme étalon s'effectuent dans une même microplaque à fond plat. Les différents lyophilisats sont dilués en cascade jusqu'au $1/8^{ème}$ dans du tampon PBS.

20 µL de lyophilisat dilué dans du tampon PBS — 20 µL de la gamme d'étalonnage — 20 µL d'eau désionisée pour le blanc réactif

⇩

+ 200 µL de réactif BCA / $CuSO_4$

⇩

Agitation 30 secondes avec un agitateur de plaques

⇩

Incubation à 37°C pendant 30 min.
puis incubation à température ambiante pendant 30 min.

⇩

Lecture de l'absorbance à 560 nm sur lecteur à microplaque
contre le blanc réactif pour calibrer le zéro.

4.3.2 Dosage des acides aminés

4.3.2.1 Choix et principe du dosage

Le dosage des acides aminés totaux libérés est réalisé par le dinitrofluorobenzène (DNFB) après une hydrolyse acide sous vide, selon la méthode de Ghuysen *et al.* (1965). Le DNFB réagit avec les groupements NH_2 libres pour donner un complexe coloré en jaune dont l'absorbance est mesurée en milieu acide.

4.3.2.2 Matériels

4.3.2.2.1 Outils

Spectrophotomètre : Spectronic Instruments, Septronic 401
Polybroyeur de tissu 5 mL PV22 avec un piston en Téflon : Poly Labo *réf.* 06030

4.3.2.2.2 Réactifs

Solution de tétraborate de potassium à 5% (m/v) dans de l'eau désionisée :

$K_2B_4O_7 \cdot 4H_2O$.....5 g (Sigma *réf.* P-1463)
Eau désionisée.....qsp 100 mL

Solution de méthanol à 1,3% (v/v) de 2,4-Dinitrofluorobenzène :

2,4-Dinitrofluorobenzène.....130 µL (Sigma *réf.* D-1529)
Eau désionisée.....qsp 10 mL

Solution d'acide chlorhydrique 6N :

HCl à 37%.....5 mL (Sigma *réf.* H-7020)
Eau désionisée.....qsp 10 mL

Solution d'acide chlorhydrique 2N :

HCl à 37%.....16,5 mL
Eau désionisée.....qsp 100 mL

Solution de D-Lalanine à 1 mM :

$C_3H_7NO_2$.....89,09 mg (Sigma *réf.* A-7502)
Eau désionisée.....qsp 1 L

4.3.2.2.3 Echantillons lyophilisés

Les lyophilisats d'œufs avec couche externe et les lyophilisats d'œufs sans couche externe sont obtenus selon la méthode citée en 4.2.2.1.

4.3.2.3 Méthodes

4.3.2.3.1 Gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage est réalisée à des concentrations variant de 0,00 à 1,00 mM de D-L-alanine (Tableau n°23).

Tableau n°23 : Constitution de la gamme d'étalonnage avec la D-L-alanine pour le dosage des acides aminés.

Concentration (mM)	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,50	0,75	1,00
Solution de D-L-Alanine (µL)	0	50	100	150	200	250	500	750	1000
Eau désionisée (µL)	1000	950	900	850	800	750	500	250	0

4.3.2.3.2 Dosage

Hydrolyse acide des échantillons lyophilisés et pesés
à raison de 100 µL de HCl 6N par mg d'échantillon à 105°C pendant 10 heures sous vide
⇩
Rinçage de l'hydrolysat avec de l'eau désionisée puis évaporation dans un dessiccateur sous vide (opération répétée 3 fois)
Remise en suspension du résidu solide dans 1mL d'eau désionisée

⇩	⇩	⇩
100 µL des échantillons dilués jusqu'à la dilution au 1/64ème dans de l'eau désionisée	100 µL de la gamme d'étalonnage	100 µL d'eau désionisée pour le blanc réactif

+ 25 µL de solution de tétraborate de potassium
+ 10 µL de solution de méthanol et de DNFB
⇩
Homogénéisation et incubation au bain-marie à 60°C pendant 30 min.
⇩
Ajout 1,5 mL d'HCl 2N après refroidissement des tubes
et lecture à 420 nm contre le blanc réactif.

4.4 Dosage de l'acide hyaluronique

Une digestion enzymatique à l'hyaluronidase permet une rupture de la chaîne de disaccharide de l'acide hyaluronique ou des mucopolysaccharides acides au niveau des liaisons 1-4 entre l'acide glucuronique et le N-acétyl-glucosamine. L'acide glucuronique libéré donne un précipité en présence d'ammonium quaternaire.

Les acides hexuroniques ainsi obtenus peuvent être quantifiés par mesure spectrophotomètrique d'un complexe coloré formé par addition de réactif (méta-hydroxydiphényl en solution) après chauffage de la solution avec de l'acide sulfurique concentré (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973).

4.4.1 Matériels

Polybroyeur de tissu 5 mL PV22 avec un piston en Téflon : Poly Labo *réf.* 06030
Unité de concentration par filtration tangentielle Ultrafree Millipore possédant une membrane BIOMAX de seuil de coupure de 10 kDa, permet de passer d'un volume de 15 mL à 50 µL : Poly Labo *réf.* 84895
Spectrophotomètre : Spectronic Instruments, Septronic 401

4.4.2 Préparations des réactifs

4.4.2.1 Solutions et réactif pour les traitements de purification avant dosage

Hydroxyde de Baryum $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ (Prolabo *réf.* 21 680.262)

Tampon PBS pH 7,4 (*cf.* 4.3.1.2.1)

Solution de guanidine-HCl 4M à 2% de Triton X-100 :

Guanidine-HCl .....7,2 g (Sigma *réf.* G-7153),
Triton X-100.....0,2 mL (Sigma *réf.* X-100)
Eau désionisée.....qsp 10 mL

Solution de Trypsine de type II-S (EC 3.4.21.4)

Trypsine.....3 mg (Sigma *réf.* T-7409)
Eau désionisée.....qsp 1 mL

Solution d'acide chlorhydrique 2N :

HCl à 37% .....16,5 mL (Sigma *réf.* H-7020)
Eau désionisée.....qsp 100 mL

Solution d'acide sulfurique 2N :

H_2SO_4.....5,6 mL (Sigma *réf.* H-7020)
Eau désionisée.....qsp 1 L

4.4.2.2 Solutions pour le dosage

Solution de métahydroxydiphényl à 0,15% dans NaOH à 0,5% :

m-hydroxydiphényl.....0,15 g (Sigma *réf.* H-6527)
NaOH à 1N.....12,5 mL
Eau désionisée.....qsp 100 mL

Solution H_2SO_4/tétraborate de sodium à 12,5 mM :

$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.....0,95 g (Sigma *réf.* B-9876)
H_2SO_4 concentrée.....qsp 200 mL

Solution de bromure de cétyltriméthyl ammonium (CTAB) à 5% :

CTAB .....5 g (Merck *réf.* 1.08130)
Eau désionisée.....qsp 100 mL

Solution tampon phosphate de sodium 0,1M pH 5,3 avec NaCl 0,15M:

NaH_2PO_4.....7,8 g (Prolabo *réf.* 28 020.292)
NaCl.....4,38 g (Prolabo *réf.* 27 800.291)
Eau désionisée.....qsp 500 mL

Solution de rinçage à l'éthanol saturé à 95% avec NaCl 0,15M :

NaCl.....4,38 g (Prolabo *réf.* 27 800.291)
Ethanol 95% .....qsp 500 mL

Solution d'acide hyaluronique à 3,030 mg.mL^{-1} :

Acide hyaluronique.....50 mg (Sigma *réf.* H-5388)

Eau désionisée.....qsp 16,5 mL

Solution d'acide glucuronique (PM=216) (Sigma *réf.* G-5269) :

Solution mère à 0,1M soit 21,6 mg.mL^{-1}

Solution intermédiaire à 1mM soit à 216 µg.mL^{-1}

Solution fille à 200 µg.mL^{-1} soit 0,952 mL de solution intermédiaire complétée à 1 mL avec de l'eau désionisée.

Solution de hyaluronidase testiculaire de Type II (EC 3.2.1.35) à 505 unités.mg^{-1} :

Hyaluronidase.....50 mg (Sigma *réf.* H-2126)

Eau désionisée.....qsp 3,030 mL

4.4.3 Détermination de la quantité d'enzyme à utiliser

Une unité enzymatique permet la dégradation d'une quantité d'acide hyaluronique correspondant à la formation de 1 µg d'acide glucuronique en une heure. Pour déterminer la quantité d'enzyme nécessaire, nous émettons plusieurs hypothèses :

La première hypothèse prend en compte le poids de la couche externe : Fairbain (1957) détermine le volume de la coque de l'œuf à 23 100 µm^3. Avec une densité proche de 1,00 pour une matrice hydratée extracellulaire, l'estimation du poids de la couche externe est de l'ordre de 23 ng.

La seconde hypothèse concerne la masse d'acide hyaluronique présente dans la couche externe : nous la supposons égale à 50% car sont également présents des glycosaminoglycannes et des coeurs protéiques. Le poids de l'acide hyaluronique présent dans la couche externe serait alors de 11,5 ng.

La troisième hypothèse se réfère à l'activité de l'enzyme : si nous supposons une action enzymatique optimale et que tout l'acide hyaluronique soit dégradé, cet acide est formé d'unités répétitives de disaccharides (l'acide glucuronique et la N-acétylglucosamine), nous aurions une masse de 5,75 ng d'acide glucuronique provenant de la couche externe des œufs d'*Ascaris* .

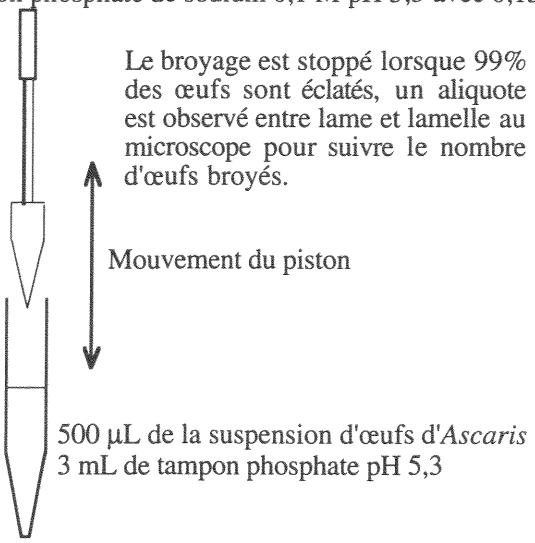
Pour la hyaluronidase testiculaire de Type II à 505 unités.mg^{-1}, nous devons utiliser 1 UI (unité enzymatique) pour 1 µg d'acide glucuronique. Nos calculs nous ont permis de définir le nombre d'unités enzymatiques théoriques nécessaire par œuf d'*Ascaris*, soit 5,75 mUI/œuf.

4.4.4 Obtention des coques des œufs d'*Ascaris*

Les analyses sont réalisées sur des coques d'œufs possédant une couche externe provenant de dissection d'utérus (*cf.* 4.1.2.1). La quantité d'œufs est déterminée par numération sur cellule de Mac-Master (Poly Labo *réf.* 9952). La suspension de 50 mL obtenue titre $3{,}3.10^4$ œufs/mL.

Dans le polybroyeur, l'espace inter-piston-cylindre est de 10 à 15 µm permettant de rompre les coques des œufs d'une taille de 40×60 µm. Dubinsky *et al* (1986) utilisaient un homogénéisateur de type Potter Elvehjem ayant une clearance de la chambre de 0,1 à 0,15 mm.

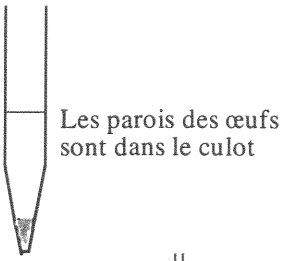
Si nous admettons qu'un œuf d'*Ascaris* possède 5,75 ng d'acide glucuronique, la gamme d'étalonnage étant linéaire pour des concentrations inférieures à 30 µg, il faut prélever une quantité de 5217 œufs d'*Ascaris* pour le dosage. Nous réalisons un dosage avec 5500 œufs soit un volume de 166 µL. L'analyse étant réalisée en triplicat, le volume nécessaire de la suspension mis dans le polybroyeur est de 498 µL, nous avons effectué le dosage avec 500 µL additionné de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 5,3 avec 0,15 M de NaCl



⇓

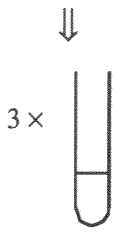
Une centrifugation à 2000*g* pendant 5 min. permet de séparer le surnageant contenant le fluide périvitellin et le matériel granuleux interne du futur embryon, du culot regroupant les coques.

⇓



⇓

Le surnageant est aspiré et le culot est remis en suspension dans du tampon phosphate pour un volume final de 1 mL



La suspension de paroi d'œufs d'*Ascaris* est partagée en 3 fractions identiques pour réaliser un triplicat. Le volume est de 330 µL pour la digestion enzymatique à la hyaluronidase.

Chacun des 3 tubes renfermerait selon notre hypothèse une quantité de 30 µg d'acide glucuronique provenant de la coque des œufs d'*Ascaris*. Il est à noter qu'une partie de la couche externe détériorée et arrachée par le broyage s'est retrouvée dans le surnageant.

4.4.5 Traitements sur les broyats de coques d'œufs d'*Ascaris*

Des suspensions de 330 µL de coques d'œufs broyés subissent des traitements préliminaires supplémentaires en vue de dissoudre la couche externe, afin de faciliter l'action de l'hyaluronidase. Dans cette optique la guanidine-HCl, la trypsine, l'acide chlorhydrique et sulfurique, et l'hydroxyde d'ammonium couplé au peroxyde d'oxygène sont testés.

4.4.5.1 Guanidine-HCl

- Trois suspensions de coques obtenues par broyage de 5500 œufs, d'un volume de 330 µL sont mises à incuber avec 0,5 mL d'une solution à 4 M de guanidine-HCl contenant 2% de Triton X-100 durant 16 heures à 4°C sous agitation douce par vortex.
- Les suspensions sont rincées et concentrées 3 fois par addition de tampon phosphate de sodium en utilisant une unité Ultrafree Millipore permettant une filtration tangentielle par une membrane possédant un seuil de coupure de 10 kDa.
- La concentration par centrifugation à 2000*g* est poursuivie tant que le volume de l'échantillon n'est pas inférieur à 150 µL. Seules les molécules de masse moléculaire inférieure à 10 000 passent à travers la membrane, et la solution de guanidine-HCl est ainsi éliminée.
- Après le dernier rinçage, les 150 µL sont placés dans un tube, le filtre est rincé avec du tampon phosphate, pour obtenir un volume final de 330 µL pour la digestion enzymatique à la hyaluronidase.

4.4.5.2 Trypsine

Sur 3 suspensions de coque correspondant environ à 5500 œufs broyés (*cf.* 4.4.3.2.), une digestion enzymatique à la trypsine est réalisée dans 4 mL de tampon PBS à 3 $g.L^{-1}$ de trypsine à 37°C durant 24 heures. Les 3 hydrolysats sont concentrés avec des unités Ultrafree Millipore (*cf.* 4.4.5.1.). Le volume final est de 330 µL pour la digestion enzymatique à la hyaluronidase.

4.4.5.3 Acide chlorhydrique

Sur 3 suspensions de 330 µL contenant 5 500 œufs broyés, une hydrolyse acide partielle avec un volume de 1 mL d'acide chlorhydrique 2N pendant 24 heures est effectuée. Les 3 hydrolysats sont concentrés avec des

unités Ultrafree Millipore (*cf.* 4.4.5.1.) avec obtention d'un volume final de 330 µL pour la digestion enzymatique à la hyaluronidase.

4.4.5.4 Acide sulfurique

Un volume de 1 mL d'acide sulfurique 2N est mis en contact pendant 24 heures sur 3 suspensions de 330 µL contenant 5500 œufs broyés. Les hydrolysats donnent une solution contenant des ions sulfates qu'il faut éliminer par précipitation à l'hydroxyde de Baryum. Le culot est rincé et le surnageant est remis en contact avec $Ba(OH)_2$, l'opération est répétée jusqu'à l'absence de précipitation.

4.4.6 Méthode de dosage

4.4.6.1 Protocole de dosage

Dans 1 mL de tampon phosphate de sodium à pH 5,3 avec 0,15 M de NaCl
Ajouter 330 µL de la suspension de coques d'œufs d'*Ascaris*
et incuber 5 min. à 37°C
⇓
Ajouter 30 UI d'enzyme soit 3,6 µL de la solution enzymatique
et compléter à 3 mL avec du tampon
⇓
Laisser 1 à 2 h à 37°C sous agitation
⇓
Acidifier à pH 5,0 si besoin avec HCl 2N
et centrifuger à 700*g* pendant 5 min. et récupérer le surnageant
⇓
Ajouter 100 µL de bromure de cétyltriméthyl ammonium à 5%
⇓
Refroidir 30 min. dans de la glace
et centrifuger 15 min. à 800*g*
⇓
Laver le précipité 3 fois avec 3 mL d'éthanol/NaCl
⇓
Redissoudre avec 1 mL d'eau désionisée

Hydrolyse de l'acide hyaluronique en acide glucuronique

Prélever 0,4 mL pour analyse
⇓
Ajouter 2,4 mL H_2SO_4/tétraborate de sodium 12,5 mM
⇓
Refroidir dans de la glace et agiter
⇓
Chauffer à 100°C 5 min. puis refroidir dans de la glace
⇓
Ajouter 0,04 mL de m-hydroxydiphényl à 0,015%
⇓
Lire à 520 nm après 5 min.

Dosage de l'acide glucuronique formé

Comme les polysaccharides produisent un précipité rose avec la solution d'acide sulfurique/tétraborate à 100°C, un blanc doit être réalisé sans addition de réactif, qui est remplacé par 0,04 mL de NaOH à 0,125 N. L'absorbance du blanc est soustraite de l'absorbance totale.
Des essais sont réalisés :

- avec une suspension d'œufs et de l'eau distillée sans enzyme
- et avec de l'acide hyaluronique 0,60 µg dans 3 mL de tampon phosphate de sodium et 30 UI d'enzyme.

4.4.6.2 Gamme d'étalonnage

Une gamme d'étalonnage est réalisée avec des concentrations variant de 0 à 75 $mg.mL^{-1}$ d'acide glucuronique dans de l'eau distillée. Une solution fille à 0,2 $mg.mL^{-1}$ est préparée, à partir de la solution mère à 0,1 M (Tableau n°24).

Tableau n°24 : Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide glucuronique.

Concentration en acide glucuronique ($mg.L^{-1}$)	0	12,5	25	37,5	50	62,5	75
Solution fille à 1 mM (µL)	0	25	50	75	100	125	150
Eau désionisée (µL)	400	375	350	325	300	275	250

4.5 Dosage des glycosaminoglycannes

Les dosages des glycosaminoglycannes sont réalisés au moyen de 2 techniques, par une méthode colorimétrique à partir du bleu diméthylméthylène et par un dosage à partir d'une électrophorèse capillaire zonale. Ce couplage permet de doser les chondroïtines sulfates présentes dans du tissu cartilagineux.

Dans un premier temps, nous explicitons le protocole d'hydrolyse de la chitine, puis dans un second temps, nous détaillons la préparation des échantillons. Enfin, dans un troisième temps, nous indiquons les différentes démarches concernant le dosage des glycosaminoglycannes par la méthode colorimétrique et par l'électrophorèse capillaire zonale.

4.5.1 Essais d'interférence sur la chitine

Une suspension de chitine est dégradée par la chitinase pour subir les protocoles de dosage

4.5.1.1 Préparation des solutions

Tampon Phosphate de Potassium pH 6 :

KH_2PO_4 ..... 200 mM ou 2,72 g (Sigma *réf.* P-5379)
$CaCl_2$ ..... 2 mM ou 22,2 mg (Sigma *réf.* C-4901)
Eau désionisée ..... qsp 100 mL

Suspension de chitine à 1,25% (p/v) :

Beta-(1,4)-2-Acétamido-2-déoxy-D-Glucose ..... 312 mg (Acros Organique *réf.* 24458-2500)
Tampon Phosphate de Potassium ..... qsp 25 mL

Solution de chitinase à 1 UI/mL :

Chitinase EC 3.2.1.14 ..... 2 UI (Sigma *réf.* C-6137)

Tampon Phosphate de Potassium ..... qsp 2 mL

4.5.1.2 Protocole de digestion de la chitine

La dégradation d'une suspension de chitine par la chitinase est réalisée suivant le protocole présenté dans le tableau n°25. Les tests sont réalisés en triplicata et les blancs en duplicata, les 5 tubes sont mis à l'étuve 2 heures à 25°C sous faible agitation.

Tableau n°25 : Protocole de dégradation enzymatique d'une suspension de chitine par la chitinase.

Réactif	Blanc (n=2)	Test (n=3)
Suspension de chitine	2,00 mL	2,00 mL
Eau désionisée	0,50 mL	
Solution chitinase (1UI/mL)		0,50 mL

4.5.2 Préparation des échantillons

Différents échantillons sont préparés :

1. sections distales et proximales d'utérus,
2. œufs avec et sans couche externe dont certains sont lyophilisés.

4.5.2.1 Sections d'utérus

Les sécrétions utérines formant la couche externe sont métabolisées dans les sections distales uniquement. Des dosages sont effectués sur des sections distales et proximales pour rechercher la nature de ces sécrétions. Elles sont obtenues lors de la dissection des utérus de femelles adultes (*cf.* 4.1.2.1) puis elles sont lyophilisées. Les caractéristiques des différents échantillons réalisés sont présentées dans le tableau n°25.

4.5.2.2 Œufs

Après une filtration à travers un Scrynel en polyester 102 µm (*cf.* 4.1.2.1), la suspension d'œufs d'*Ascaris* est séparée en 3 fractions :

- la première lyophilisée pendant 24 heures constitue le lyophilisat d'œufs avec couche externe.
- la seconde broyée avec le polybroyeur représente une suspension d'œufs broyés avec couche externe.
- la troisième subit 3 étapes pour obtenir le lyophilisat d'œufs sans couche externe :
    1. addition d'une solution d'hypochlorite de sodium titrant 1,60 $g.L^{-1}$ pendant 2 heures pour éliminer la couche externe,
    2. trois rinçages et centrifugations successives dans de l'eau désionisée à 400g pendant 5 min.,
    3. lyophilisation pendant 24 heures, elle est dénommée lyophilisat d'œufs sans couche externe.

Le tableau n°26 regroupe les poids, le nombre de sections d'utérus ou le nombre d'œufs des différents échantillons.

Tableau n° 26: Caractéristiques des échantillons pour le dosage des glycosaminoglycannes.

	Poids sec (mg)	Quantité	Type d'échantillon
1	4	10 sections	section distale d'utérus
2	3	9 sections	section distale d'utérus
3	7	9 sections	section proximale d'utérus
4	6	15 sections	section proximale d'utérus
5	11	2 à 5.10^5 œufs[a]	lyophilisat d'œufs avec couche externe
6	9	1,7 à $4,1.10^5$ œufs	lyophilisat d'œufs sans couche externe
7	41	7,9 à $18,6.10^5$ œufs	lyophilisat d'œufs sans couche externe
8	non lyophilisé	2.10^5 œufs	suspension d'œufs broyés avec couche externe

[a] : quantité d'œufs estimée par son poids sec variant de 52,9 à 22,3 ng selon son stade de maturation (Magat et al., 1972).

4.5.3 Dosage des glycosaminoglycannes par colorimétrie

4.5.3.1 Préparation des solutions et réactifs pour le dosage des chondroïtines sulfates

Tampon Tris/HCl pH 8 :

Tris ($C_4H_{11}NO_3$) ..... 0,605 g (Merck réf. 8382)
Eau désionisée ..... qsp 100 mL et ajuster à pH 8 avec HCl pur

Tampon Papaïne :

Na_2HPO_4 anhydre ..... 283,8 mg (Merck réf. 6586)
EDTA Titriplex III ..... 41,62 mg (Merck réf. 8418)
Dithiothreitol ..... 30 mg (Sigma réf. D-9779)
Eau désionisée ..... qsp 100 mL

Solution Papaïne à préparer extemporanément :

Papaïne ..... 6 mg (Sigma réf. P-4762)
Eau p.p.i. ..... qsp 1 mL

MIA ou Monoiodoacétate à 220 mM :

Monoiodoacétate ..... 40,9 mg (Merck réf. 100374)
Eau désionisée ..... qsp 1 mL

1,9-DMB ou bleu de diméthyleméthylène :

NaCl ..... 2,37 g
Glycine ..... 3,04 g (Sigma réf. G-7403)
1,9-DMB ..... 16 mg (Aldrich réf. 34, 108-8)
HCl 0,1N ..... 95 mL (Merck réf. 100374)
Eau désionisée ..... qsp 1 L et ajuster à pH 3

Solution mère de Chondroïtine 4-Sulfate (C4S)

Solution à 1 mg.mL^{-1} (Sigma réf. C-8529) dans du tampon Tris pH 8

Solution fille diluée au 1/10ème pour préparer la gamme d'étalonnage.

4.5.3.2 Préparation des gammes d'étalonnage de la chondroïtine 4-Sulfate

La gamme d'étalonnage est réalisée en duplicata selon le tableau n°27.

Tableau n° 27 : Gamme d'étalonnage de la chondroïtine 4-Sulfate.

	0	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
C4S à 0,1 mg.mL^{-1} (µL)	0	2,5	5	10	20	30	40	50	100
Tampon Tris (µL)	100	97,5	95	90	80	70	60	50	0

4.5.3.3 Hydrolyse à la papaïne

Pour 2 à 4 mg d'échantillons lyophilisés ajouter 0,2 mL de tampon Papaïne et 0,01 mL de solution Papaïne.
Laisser au bain-marie à 60°C pendant 24 h.
Pour arrêter l'hydrolyse à la papaïne, mettre dans chaque Eppendorf 0,01 mL de MIA et 0,180 mL de tampon Tris pH 8 pour obtenir un hydrolysat Papaïne de 400 µL.
Centrifuger à 15 000 RPM pendant 10 min.

4.5.3.4 Dosage des chondroïtines sulfates dans les échantillons

Prélever l'hydrolysat Papaïne dans un Eppendorf et le diluer avec du tampon Tris pH 8.
Prendre 0,1 mL d'échantillon hydrolysé dilué et compléter avec 2,5 mL de 1,9-DMB dans une microcuve.
Agiter doucement et lire à 525 nm dans les 10 secondes.

4.5.4 Dosage des chondroïtines sulfates par électrophorèse capillaire zonale

4.5.4.1 Etalon interne

L'étalon interne est de l'acide benzoyl 1-4 phényl-2 butyrique (ou BPBA, Rhône Poulenc Rorer Vitry/Seine). Il est mis en solution à raison de 160 µg.mL^{-1} dans du tampon Tris/HCl à 50 mM pH 8.

4.5.4.2 Gamme d'étalonnage des chondroïtines 0S, 4S et 6S

Dans un tube à hémolyse, préparer une solution mère de C0S-C4S-C6S avec :

200 µL de C0S à 10 mg.mL^{-1} (Sigma réf. C-3920)

200 µL de C4S à 10 mg.mL^{-1} (Sigma réf. C-4045)

100 µL de C6S à 25 mg.mL^{-1} (Sigma réf. C-4170)

500 µL de Tampon Tris pH 8

La solution mère (SM) contient donc 2 mg.mL^{-1} de C0S, 2 mg.mL^{-1} C4S et 2,5 mg.mL^{-1} C6S, une solution fille (SF) est la SM diluée au 1/10ème (100 µL de SM + 900 µL de Tampon Tris). Le tableau n°28 indique les volumes pour réaliser la gamme.

Tableau n°28 : Gamme d'étalonnage des chondroïtines 0S, 4S et 6S pour l'électrophorèse capillaire zonale.

	I	II	III	IV
Solution fille (µL)	100	50	25	10
H_2O (µL)	25	25	25	25
Tampon Tris (µL)	275	325	350	365

4.5.4.3 Préparation des échantillons par électrophorèse capillaire zonale

Dans un Eppendorf, mettre 225 µL d'hydrolysat Papaïne,
25 µL de Chondroïtinase ABC (1 UI/mL)
150 µL de Tampon Tris pH 8.

Laisser au bain-marie à 37°C pendant 12 heures.

Mettre 250 µL d'hydrolysat chondroïtinase ABC ou 250 µL d'un des tubes de la gamme dans un Eppendorf-filtre Ultrafree-MC de 1 mL (Millipore 10 000 NMWL polysulfone).

Centrifuger à 10 000 RPM pendant 1 heure.

Le dosage se fait sur 150 µL de filtrat auquel on ajoute 10 µL de la solution de BPBA (étalon interne).

5 Résultats des analyses biochimiques

5.1 Tests préliminaires : les colorations histologiques

5.1.1 Coloration au bleu de Toluidine phéniqué

Surtout utilisé en histologie, le bleu de Toluidine colore les acides nucléiques et les substances basophiles en bleu (Chevreau et al., 1977). Pour les colorations métachromatiques des tissus, les éléments épithéliaux sont colorés en bleu, le stroma conjonctif est coloré en rose violacé, les glycoprotéines du mucus se colorent également en rose-magenta.

Sur les tests réalisés en triplicata (cf. 4.1.2.2.1), sur des suspensions titrant 300 œufs, aucun œuf n'est observé coloré. La couche externe reste incolore, alors que Lee (1961) utilisant le bleu de Toluidine pour colorer l'enveloppe externe, sécrétée également par le tissu utérin, de Thelastoma bulhoõesi (oxyuroidae), observe une coloration rouge pourpre obtenue, témoignant de la présence de mucopolysaccharides acides (AMPS).

5.1.2 Coloration au bleu d'Alcian

La coloration au bleu d'Alcian a une forte affinité pour les 2 groupements sulfates et carboxyles, ainsi que pour les groupements phosphates. Par sa nature cationique neutre, le bleu d'Alcian se lie aux molécules électrostatiquement négatives associées à des polyanions glycoconjugés comme la chondroïtine sulfate, l'acide hyaluronique, l'héparine et les glycosaminoglycannes acides (Hayat, 1993b).

Sur les tests réalisés en triplicata (cf. 4.1.2.2.2), à partir de suspensions contenant 100 œufs d'Ascaris provenant de dissection, la couche externe des œufs n'est plus transparente, elle se colore en bleu vif de façon homogène sur tout le pourtour de l'œuf. Lee (1961) utilise également ce colorant pour démontrer la présence de AMPS sur la couche externe de Thelastoma bulhoõesi. De plus, une coloration au bleu d'Alcian permet de mettre en évidence la présence de glycosaminoglycannes sulfatés (Hayat, 1993b), qui seraient par conséquent présents dans la couche externe de l'œuf d'Ascaris.

5.1.3 Coloration à l'Acide Périodique - Fuchsine Basique

La Fuchsine basique permet de mettre en évidence les polysaccharides, nous avons adapté le protocole de coloration des tissus de la méthode de Horobin et Kevill (Chevreau et al., 1977) de sorte qu'il soit réalisable sur des suspensions d'œufs d'Ascaris.

Sur les tests effectués en triplicata (cf. 4.1.2.2.3), sur des suspensions renfermant 100 œufs d'Ascaris, les œufs montrent une structure rose de texture gélatineuse témoignant de la présence de polysaccharides. Hayat (1993a) préconise également l'Acide Périodique couplé à de la Fuchsine Basique pour révéler le glycogène qui se colore en rose-magenta.

Cependant nous pouvons remarquer que la coloration n'est pas homogène sur toute la surface de l'œuf, par comparaison à la coloration des œufs au bleu d'Alcian.

De plus, la surface mamelonnée semble avoir été altérée, la couche externe est déchiquetée, alors que les œufs observés avant la réaction ne sont pas abîmés. L'alcool ou l'acide ont dû détériorer la couche externe, soulignant la fragilité des œufs provenant de dissection d'utérus.

5.1.4 Coloration à l'Acide Périodique de Schiff - bleu d'Alcian

La coloration réalisée au bleu d'Alcian conjuguée au PAS (Acide Périodique de Schiff) a pour but de colorer les noyaux en noir et de mettre en évidence la présence ou l'absence de polysaccharides. Le protocole est basé sur la méthode de Mowry (Chevreau *et al.,* 1977). La technique au bleu d'Alcian permet de visualiser les mucopolysaccharides acides et la réaction avec l'Acide Périodique de Schiff permet de colorer les mucopolysaccharides neutres (Revel & Hay, 1963). Les observations attendues sont:

- une coloration bleue témoignant :
  de la présence de mucopolysaccharides acides (test au bleu d'Alcian positif)
  ou de l'absence de polysaccharides (test PAS négatif)

- une coloration rouge signant la présence de mucopolysaccharides neutres (test PAS positif)

L'examen microscopique réalisé en triplicata (*cf.* 4.1.2.2.4), sur des suspensions d'œufs permet de visualiser des œufs entourés d'une structure de nature gélatineuse colorée en bleu vif. La coloration bleue indique la présence de mucopolysaccharides acides ou une absence de polysaccharides, or la présence de polysaccharides ayant été démontrée avec la coloration à la Fuchsine basique, nous pouvons conclure à la présence de mucopolysaccharides acides. Nous n'observons pas de coloration rose-rouge, d'où une absence de polysaccharides neutres.

De plus, nous remarquons une déstructuration de la couche externe qui est lésée, altérée et déchirée alors qu'elle était intacte avant la coloration. La structure mamelonnée a disparu laissant place à des morceaux de couche externe plus ou moins accrochés à la coque. Nous avons une modification apparente de la couche externe, il semblerait que la structure de la couche externe ait subi des altérations provoquées par l'Acide Périodique. En effet, cette couche transparente serait très sensible à l'action de l'acide.

Avec cette technique, Volpi *et al.* (1995) caractérisent les protéoglycannes sulfatés isolés du mucus entourant les embryons d'un mollusque. Les mucocytes donnent une coloration positive à l'Acide Périodique de Schiff et au bleu d'Alcian à pH 0,5 et 2,5 confirmant la présence de polysaccharides sulfatés dans ces cellules.

5.1.5 Interprétation de l'ensemble des colorations

Sur les 3 colorations testées, le test de coloration à la Fuchsine basique révèle une couche externe de l'œuf d'*Ascaris suum* constituée de polysaccharides. La coloration au bleu d'Alcian témoigne de la présence de mucopolysaccharides à caractère acide, qui est confirmée par la coloration au bleu d'Alcian associée à la coloration avec le PAS. Les résultats des colorations sont regroupés dans le tableau n°29.

Tableau n°29 : Résultats des différentes colorations.

Coloration	Résultats	Interprétation
Bleu d'Alcian	La couche externe se colore en bleu de façon homogène	Présence d'AMPS* et de groupements sulfates
Fuchsine Basique couplée au bleu d'Alcian	Les œufs sont recouverts d'une structure rose d'apparence gélatineuse	Présence de polysaccharides
Bleu d'Alcian couplée au PAS	Les œufs sont entourés d'une texture gélatineuse bleu vif	Présence d'AMPS
Bleu de Toluidine	Absence de coloration	Absence d'AMPS

* : AMPS : Acid MucoPolySaccharide

En revanche, la coloration au bleu de Toluidine donne des résultats discordants par rapport aux 3 autres techniques (bleu d'Alcian, Acide Périodique associé à de la Fuchsine Basique, et bleu d'Alcian conjugué au PAS) avec absence d'AMPS.

5.2 Résultats de l'étude par spectrométrie infrarouge

Afin de confirmer les résultats des colorations histologiques, à savoir la présence de mucopolysaccharides dans la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*, deux suspensions lyophilisées d'œufs avec et sans couche externe sont mélangées avec du bromure de potassium pour obtenir des pastilles soumises à des rayons infrarouges.

5.2.1 Spectres infrarouges de la chondroïtine sulfate

Pour comparer les spectres obtenus à des structures connues, des protéoglycannes sulfatés sont également analysés par spectrométrie infrarouge. Nous avons choisi les chondroïtines sulfates A et C, constituants majeurs des protéoglycannes (Figure n°21).

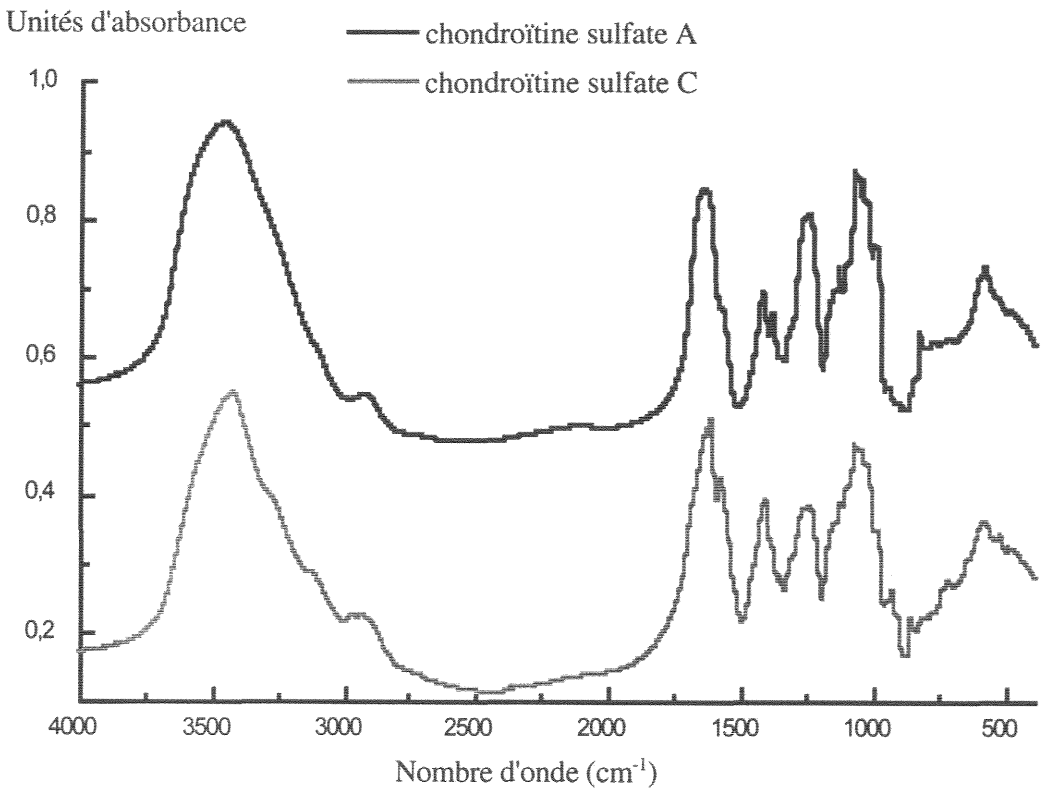


Figure n°21 : Spectres infrarouges des chondroïtines sulfates A et C entre 4000 et 500 cm^{-1}.

La portion du spectre infrarouge en transmission contenant les caractéristiques de la chondroïtine sulfate se situe entre 2000 et 500 cm^{-1}. Cette zone est agrandie dans la figure n°22.

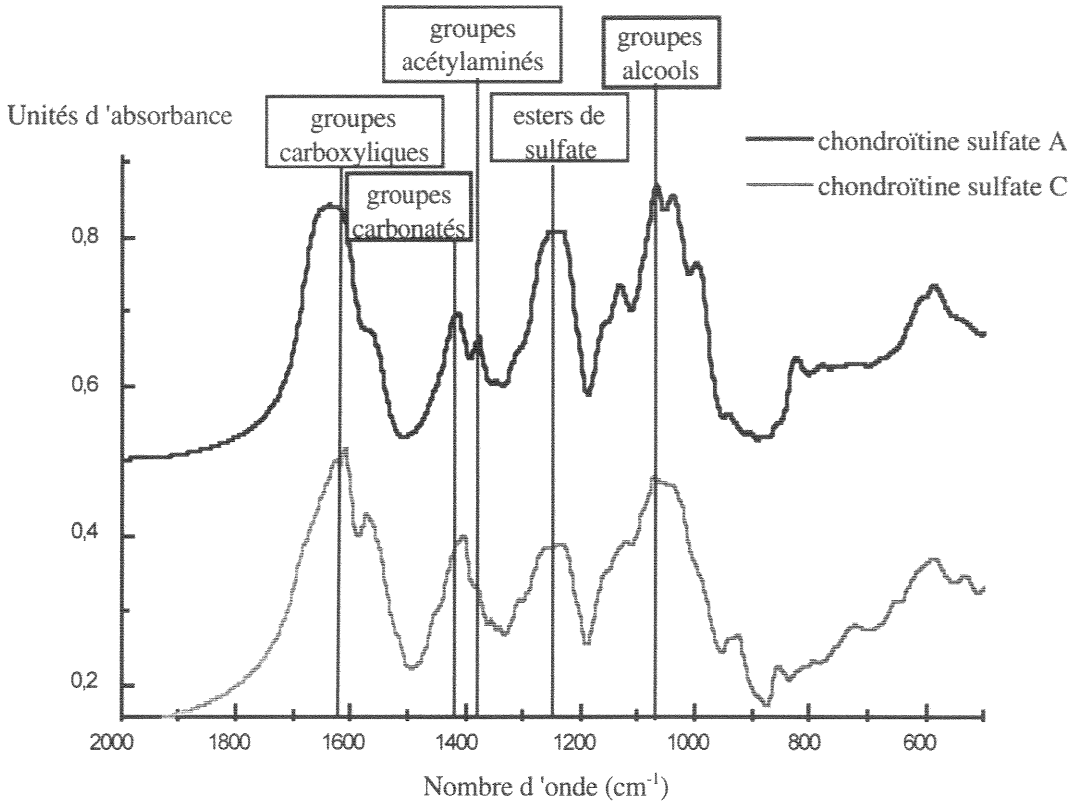


Figure n°22 : Spectres infrarouges des chondroïtines sulfates A et C entre 2000 et 500 cm^{-1}.

Les spectres sont caractérisés par la présence de 5 bandes caractéristiques :

- 1615 cm^{-1} : groupes carboxyliques (—COO^-)
- 1425-1410 cm^{-1} : groupes carbonatés (—CO_3^-)
- 1375 cm^{-1} : groupes acétylaminés (—NH—CO—CH_3)
- 1266 et 1228 cm^{-1} centrés vers 1245 cm^{-1} : esters de sulfate (—O—SO_3^-)
- 1070 cm^{-1} : groupes alcools (C—O^-)

Daudon & Estepa-Maurice (1996) indiquent que les glycosaminoglycannes se caractérisent en spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier par une bande à 1250 cm^{-1} reflétant des vibrations des valences des groupements sulfates et que les fonctions alcools des polysaccharides absorbent entre 1150 et 1050 cm^{-1}.

5.2.2 Spectrométrie infrarouge à partir des suspensions d'œufs lyophilisés

Les dosages des protéines et des acides aminés sont réalisés sur 2 types d'œufs lyophilisés, qui sont constitués :

- soit d'un embryon, d'un fluide périvitellin et d'une coque
- soit d'un embryon, d'un fluide périvitellin, d'une coque et d'une structure externe appelée couche externe.

Le dosage des 2 types de lyophilisats a pour but de mettre en évidence la nature de la couche externe, par la comparaison des résultats des 2 échantillons analysés. Les spectres infrarouges correspondant aux 2 lyophilisats de suspensions d'œufs d'*Ascaris* sont présentés dans la figure n°23.

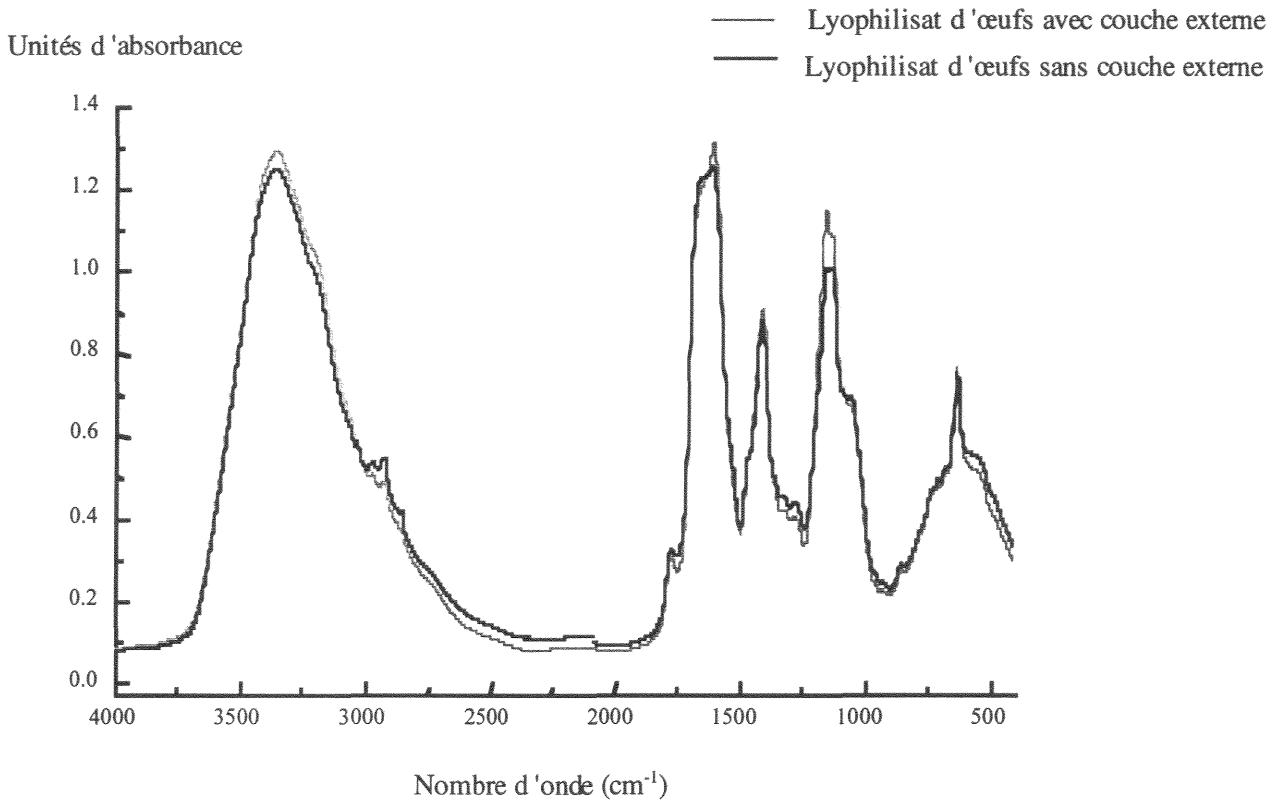


Figure n°23 : Spectres infrarouges des 2 suspensions d'œufs lyophilisées avec et sans couche externe.

Les 2 spectres infrarouges en transmission des suspensions lyophilisées d'œufs d'*Ascaris* avec et sans couche externe ont une allure identique avec 2 zones caractéristiques :

⇒ la première zone correspond aux longueurs d'onde de 3600 à 2500 cm^{-1} avec les bandes d'absorption situées à :
- 3356 et 3211 cm^{-1} : vibrations d'élongation des structures O—H et N—H des amides A et B, correspondant aux molécules d'eau de cristallisation, aux molécules de protéines, d'acides aminés, de polysaccharides et d'urée,
- 2971, 2927 et 500 cm^{-1} : vibrations d'élongation des structures C—H, correspondant aux molécules de lipides, de protéines et de polysaccharides.

⇒ la seconde zone correspond aux longueurs d'onde de 1800 à 600 cm^{-1} avec les bandes d'absorption situées à :
- 1765 cm^{-1} : vibrations d'élongation des structures C=O,
- 1644 cm^{-1} : amide primaire (I),
- 1597 cm^{-1} et 1397 cm^{-1}: amide secondaire (II) et vibrations d'élongation de structures COO^-,
- 1349 cm^{-1} et 1314 cm^{-1} : vibrations de déformation des structures C—H,
- 1263 cm^{-1} : amide tertiaire (III)

- 1142, 1120, 1076 et 1044 cm^{-1} : vibrations d'élongation des structures C—O des alcools, éther et esters et des structures SO_4,
- 622 cm^{-1}: amide quaternaire et vibrations de déformation des structures SO_4.

Les résultats de la soustraction des valeurs du spectre avec couche externe moins 0,85 fois les valeurs du spectre sans couche externe donne le spectre représenté dans la figure n°24 au niveau de la région 2000 à 500 cm^{-1}.

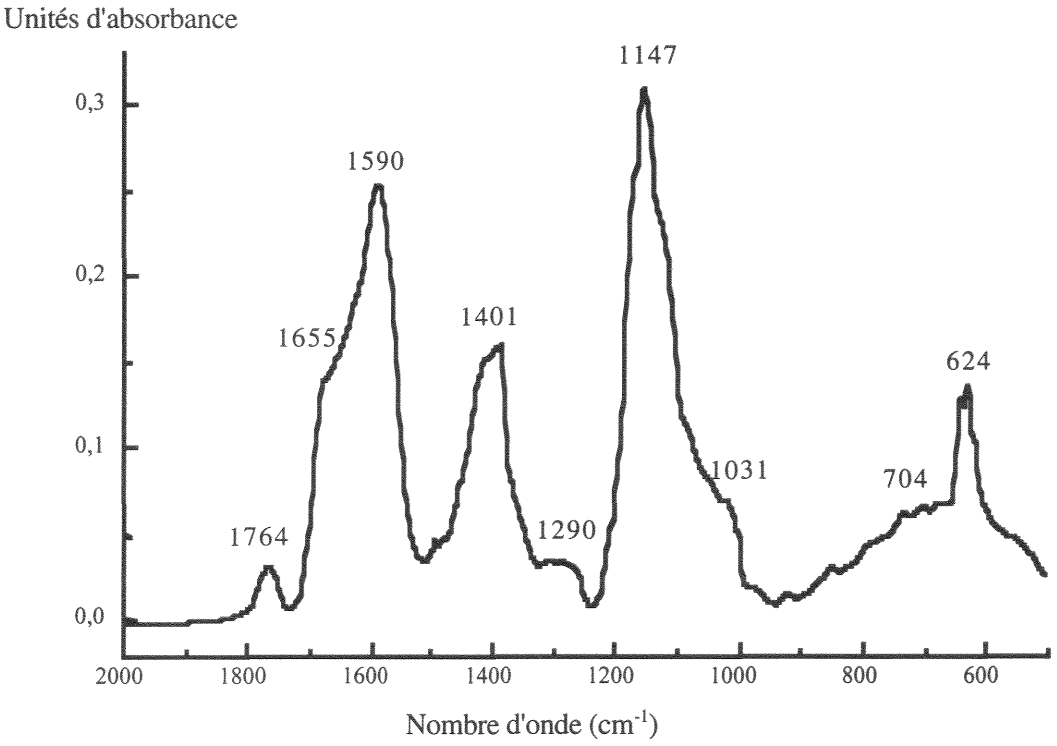


Figure n°24 : Spectre infrarouge de la différence des 2 suspensions d'œufs lyophilisées pour des longueurs d'ondes de 2000 à 500 cm^{-1}.

Les différentes bandes d'adsorption figurant sur le spectre sont :

- 1764 cm^{-1} : les vibrations d'élongation des structures C = O des esters
- 1655 cm^{-1} : les vibrations d'élongation des structures C = O des amides I et cétones
- 1590 cm^{-1} : les vibrations de déformation des structures N—H des amines I et II, et des amides
- 1401 cm^{-1} : les vibrations de déformation des structures O—H des acides
- 1290 cm^{-1} : les vibrations d'élongation des structures C—O des esters et C—N des amines

1147 cm^{-1} : les vibrations d'élongation des structures C—O des alcools, éthers et esters, C—N des amines et de déformation des structures —SO_4

- 1031 cm^{-1} : les vibrations de déformation des structures —PO_4
- 704 cm^{-1} : les vibrations de déformation des structures N—H des amines et C—H
- 624 cm^{-1}: les vibrations de déformation des structures N—H des amines et d'élongation des structures —SO_4

Pour les esters de sulfates, la seule bande observable entre 1200 et 1300 cm^{-1} se trouve à 1290 cm^{-1}, elle n'est pas centrée à 1240 cm^{-1}. Nous n'avons donc pas mis en évidence la présence de glycosaminoglycannes sulfatés.

Après purification des mucopolysaccharides acides provenant de Cestodes et Nématodes adultes par des chromatographies échangeuses d'ions, Rahemtulla & Lovtrup (1974a) décrivent également la présence de bandes d'absorption aux longueurs d'ondes de 1615, 1375 et à 1240 cm^{-1} correspondant à des bandes d'absorption des groupes carboxyliques, acétylaminés et des esters de sulfates respectivement.

5.3 Dosage des protéines et des acides aminés

Les dosages de protéines et des acides aminés sont réalisés sur des œufs lyophilisés et sur des sections d'utérus.

5.3.1 Résultats des gammes d'étalonnage

Les droites de calibration pour le dosage des protéines et des acides aminés sont réalisées à l'aide des courbes d'étalonnage. Les absorbances de la droite de calibration pour le dosage des protéines sont obtenues à partir d'une solution de BSA (*cf.* 4.3.1.3.1 : Gamme d'étalonnage). Pour le dosage des acides aminés, la droite de calibration est obtenue à partir d'une solution de D-L-alanine (*cf.* 4.3.2.3.1 : Gamme d'étalonnage). Les droites de calibration obtenues à partir des courbes d'étalonnage sont tracées dans la figure n°25.

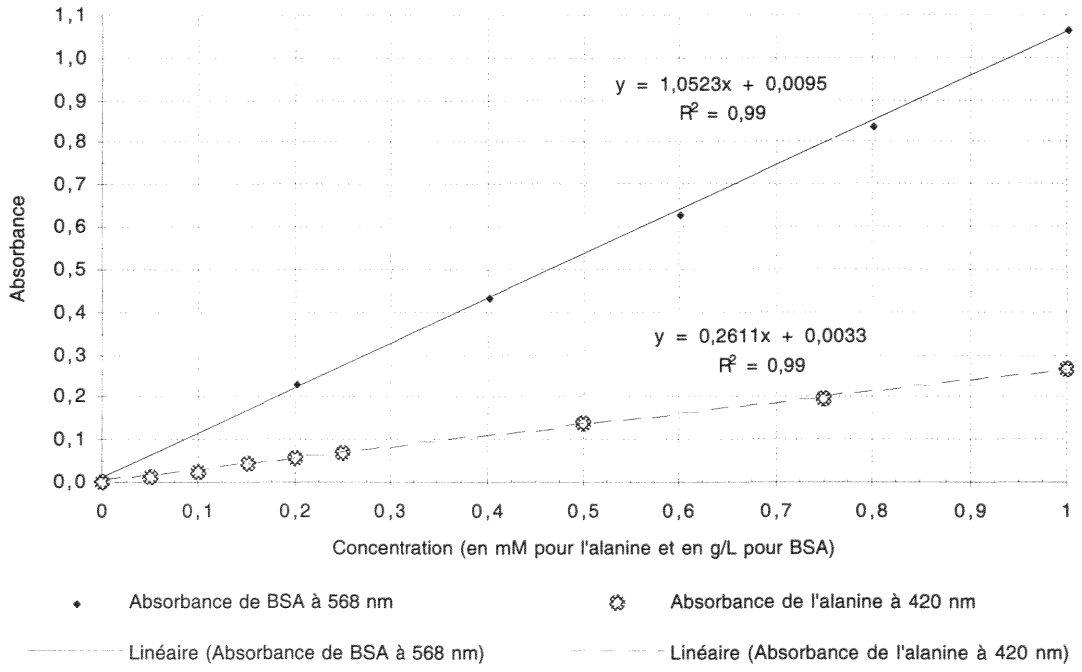


Figure n°25 : Gamme d'étalonnage de BSA et de D-L-alanine.

Concernant le dosage des protéines, la droite de calibration est linéaire de 0,237 $g.L^{-1}$ jusqu'à 1,070 $g.L^{-1}$ de BSA, avec des absorbances comprises entre 0,2 et 1,1. Le seuil de détection de la méthode est de 0,2 $g.L^{-1}$ dans 100 µL d'échantillon, soit de 20 µg de protéine dans l'échantillon de départ.

Pour le dosage des acides aminés, la droite de calibration est linéaire de 0,05 mM jusqu'à 1 mM d'alanine, avec des absorbances comprises entre 0,014 et 0,264. Le seuil de détection de la méthode est de 0,0,5 mM dans 1 mL d'échantillon, en considérant la masse molaire moyenne d'un acide aminé de 108 g, le seuil de détection est de 5,4 µg d'acide aminé dans l'échantillon initial.

5.3.2 Résultats obtenus à partir des œufs lyophilisés

Les dosages des protéines et des acides aminés sont réalisés sur 2 types d'œufs lyophilisés, ils sont constitués :

- soit d'un embryon, d'un fluide périvitellin et d'une coque
- soit d'un embryon, d'un fluide périvitellin, d'une coque et d'une structure externe appelée couche externe.

Le dosage des 2 types de lyophilisats a pour but de mettre en évidence la nature de la couche externe, par la comparaison des résultats des 3 échantillons analysés pour chacun des 2 groupes.

5.3.2.1 Résultats des dosages des protéines

Les résultats des dosages des protéines (*cf.* 4.3.1.3.2 : Dosage) sont regroupés dans le tableau n°30. Les concentrations sont obtenues à partir des absorbances des échantillons dilués au demi (sauf 2 échantillons) et par l'équation de la droite de régression de la gamme d'étalonnage de BSA :

$A = 1{,}052\ Cc° + 0{,}009$

avec A pour l'absorbance à 568 nm

et Cc° pour les concentrations en $g.L^{-1}$

Tableau n°30 : Résultats des dosages de protéines dans les échantillons lyophilisés d'œufs avec et sans couche externe.

Types d'œufs	Poids sec en mg	Absorbance à 568 nm	Concentration en protéines en $g.L^{-1}$	Masse de protéines en $g.g^{-1}$ d'œufs
Absence de la couche externe	0,5	0,310[a]	0,29	0,54
	1,3	0,447	0,83	0,64
	1,0	1,620	0,68	0,68
Présence de la couche externe	1,1	0,924	0,87	0,79
	1,4	1,039	0,98	0,70
	2,7	2,36[b]	2,24	0,83

[a] : échantillon non dilué de sorte que leur absorbance soit située dans la gamme d'étalonnage

[b] : échantillon dilué au 1/3 de sorte que leur absorbance soit située dans la gamme d'étalonnage

☞ Pour 1g d'œufs lyophilisés, nous déterminons des quantités de protéines significativement supérieures pour les lyophilisats d'œufs avec une couche externe par comparaison aux lyophilisats d'œufs sans couche externe.

Ces résultats seraient en accord avec les travaux de Jaskoski (1962) qui a nommé la couche externe de l'œuf "couche protéique" car il obtenait des spots de plus fortes intensités (sur chromatographie sur papier) pour les œufs possédant une couche externe par opposition aux œufs pour lesquels la couche externe avait été éliminée.

☞ Les analyses réalisées dans le tableau n°14 sur les masses de protéines par gramme d'œufs lyophilisés, nous donnent des pourcentages de protéines pour des œufs sans couche externe variant de 54 à 68%.

Par contre, Magat *et al.* (1972) réalisant des analyses biochimiques quantitatives sur des œufs sans couche externe et des larves d'*Ascaris suum*, déterminent un pourcentage de 23% de protéine.

☞ Les quantités de protéines pour des œufs avec couche externe varient de 0,70 à 0,83 $g.g^{-1}$ d'œufs; pour des œufs sans couche externe, les quantités de protéines varient de 0,54 à 0,68 $g.g^{-1}$ d'œufs.

Une quantité équivalente de protéine dans les 2 types de lyophilisats aurait signifié que la couche externe aurait des teneurs en protéine identiques à la teneur moyenne de l'œuf constitué d'une coque, d'un embryon et de son fluide périvitellin.

Or, nous trouvons pour un même poids de matière sèche, une plus forte quantité de protéines en présence d'une couche externe autour de l'œuf. Ces résultats indiquent :

- dans un premier temps que la couche externe est de nature protéique,
- et dans un second temps que sa teneur en protéines est plus importante que la concentration moyenne en protéines de l'œuf dans sa totalité c'est-à-dire avec la coque, l'embryon et le fluide périvitellin.

5.3.2.2 Résultats des dosages des acides aminés

Les résultats des dosages d'acides aminés (*cf.* 4.3.2.3.2 : Dosage) sont regroupés dans le tableau n°31.

Les concentrations ont été obtenues à partir des absorbances des échantillons dilués au 16ème et au 32ème (les absorbances devant être inférieures à 0,3) et par l'équation de la droite de régression de la gamme d'étalonnage de la L-D-alanine :

$$A = 0{,}261\ Cc° + 0{,}003$$

avec A pour l'absorbance à 420 nm

et Cc° pour les concentrations en mM

Tableau n°31 : Résultats des dosages d'acides aminés dans les échantillons lyophilisés d'œufs avec et sans couche externe.

Types d'œufs	Poids sec	Absorbance	Concentration		Acides aminés
	en mg	à 420 nm	en mM	en $mM.g^{-1}$	en $g.g^{-1}$ d'œufs
Absence de la couche externe	1,1	0,045[b]	2,55	2,32[c]	0,25[c]
	2,0	0,046[a]	5,23	2,62	0,28
	2,7	0,098[b]	3,98	1,47	0,16
Présence de la couche externe	1,2	0,032[b]	1,76	1,46	0,16
	1,7	0,032[a]	3,52	2,07	0,22

[a] : dilution au 1/32 de l'échantillon,

[b] : dilution au 1/16 de l'échantillon,

[c] : 1 mM d'acides aminés un poids moyen de 0,108 g

☞ Les quantités d'acides aminés varient de 0,16 à 0,28 $g.g^{-1}$ d'œufs sans couche externe et de 0,16 à 0,22 $g.g^{-1}$ d'œufs avec couche externe. Les quantités d'acides aminés sont inférieures dans les lyophilisats d'œufs possédant la couche externe.

Les résultats des dosages des protéines s'opposent aux résultats des dosages des acides aminés. Les concentrations déterminées en acides aminés sont plus faibles sur les lyophilisats d'œufs possédant une couche externe comparées aux lyophilisats d'œufs sur lesquels la couche externe a été éliminée. Ces résultats témoigneraient d'une diminution des quantités moyennes en acides aminés dans l'œuf lorsqu'il y a présence de la couche externe.

La gamme d'étalonnage étant correcte, le dosage colorimétrique n'est pas en cause; une autre hypothèse serait que l'hydrolyse n'a pas été totale pour la détermination des concentrations en acides aminés.

En utilisant différentes données bibliographiques concernant les pourcentages d'azote protéique, nous pouvons déterminer par calcul la masse d'acides aminés :

1. volume d'un œuf sans couche externe : V = 59 100 μm^3 (Fairbain, 1957)
2. densité d'un œuf non-embryonné : d = 1,10 (David & Linquist, 1982),
3. pourcentage d'azote protéique dans un lyophilisat d'œufs d'*Ascaris* sans couche externe est de 6,6% (Fairbain, 1957),
4. masse moyenne d'une mole d'acide aminé : M = 108 g
5. masse d'une mole d'azote : m = 12 g

A partir de ces informations, nous déterminons :

⇒ la masse d'un œuf est de V x d = 65,6 ng.

⇒ le pourcentage massique d'azote protéique dans un acide aminé, est de (m x 100)/M = 11,11% (en comptant 1 molécule d'azote par acide aminé).

Par conséquent, à partir des données de Fairbain (1957) qui indiquent un pourcentage de 6,6% d'azote protéique dans un échantillon, nous pouvons déterminer le pourcentage massique d'acides aminés : (6,6 x 100)/11,11 = 59,4% soit une quantité de 0,59 $g.g^{-1}$ d'échantillon lyophilisé.

Nos analyses donnent une quantité inférieure variant de 0,16 à 0,28 $g.g^{-1}$ pour des échantillons d'œufs lyophilisés sans couche externe.

5.3.3 Résultats obtenus à partir des lyophilisats des sections de l'utérus

Sur ce type de prélèvement, les dosages des protéines sont impossibles à réaliser car les échantillons se présentent sous forme de tissu sec et dur que l'on ne peut pas broyer. Seul le dosage des acides aminés est effectué, car il comporte une hydrolyse acide pour la digestion des échantillons.

Les résultats des dosages en acides aminés (*cf.* 4.3.2.3.2 : Dosage) des sections proximales et distales des utérus de vers femelles adultes sont regroupés dans le tableau n°32.

Tableau n°32 : Résultats des dosages d'acides aminés dans les lyophilisats de sections proximales et distales d'utérus.

Echantillon	Poids sec	Absorbance	Concentration		Acides aminés
	en mg	à 420 nm	en $mM.L^{-1}$	en $mM.g^{-1}$	en $g.g^{-1}$ de tissu
Sections proximales des utérus	0,9	0,04[a]	4,50	5,00	0,54[c]
	1,5	0,085[b]	5,01	3,34	0,36
Sections distales des utérus	1,0	0,088[b]	5,19	5,19	0,56
	1,1	0,048[a]	5,48	4,98	0,54

[a] : dilution au 1/32 de l'échantillon,

[b] : dilution au 1/16 de l'échantillon,

[c] : 1 mM d'acides aminés a un poids moyen de 0,108 g

Les concentrations ont été obtenues par les absorbances des échantillons dilués au 1/16 et au 1/32 et par l'équation de la droite de régression de la gamme d'étalonnage de la L-D-alanine :

$$A = 0{,}261\ Cc° + 0{,}003$$

avec A pour l'absorbance à 420 nm

et Cc° pour les concentrations en mM

☞ Les quantités d'acides aminés dans les sections d'utérus sont de 0,36 et de 0,54 $g.g^{-1}$ de tissu pour les sections proximales d'utérus et de 0,54 et de 0,56 $g.g^{-1}$ de tissu pour les sections distales d'utérus.

Nous n'observons pas de différences significatives entre les 2 types de régions d'utérus. Néanmoins, nous remarquons que les concentrations en acides aminés en $g.g^{-1}$ de tissu sembleraient légèrement supérieures pour les sections distales des utérus; ce qui pourrait indiquer la présence d'acides aminés dans cette région où est sécrétée la couche externe. Cette information serait en accord avec les observations de Foor (1967) et de Polyakova-Krusteva *et al.* (1985) qui suggèrent une nature protéique pour les sécrétions. Mais les différences restent trop faibles pour affirmer la présence des sécrétions utérines protéiques dans les sections distales de l'utérus.

5.4 Dosage de l'acide hyaluronique

Le dosage effectué permet d'hydrolyser l'acide hyaluronique par de la hyaluronidase rompant les liaison β entre l'acide glucuronique et la N-acétylglucosamine. Le dosage colorimétrique de l'acide glucuronique est réalisé par addition de m-hydroxydiphényl.

5.4.1 Droite de calibration

La droite de calibration est tracée à partir de la courbe d'étalonnage (*cf.* 4.4.6.2 : Gamme d'étalonnage). La droite est linéaire pour des concentrations comprises entre 12,5 et 80 $mg.L^{-1}$ d'acide glucuronique. Les absorbances s'échelonnent de 0,115 à 0,740. Le seuil de détection de la méthode est de 12,5 $mg.L^{-1}$ dans 0,4 mL, soit de 5 µg d'acide glucuronique dans l'échantillon.

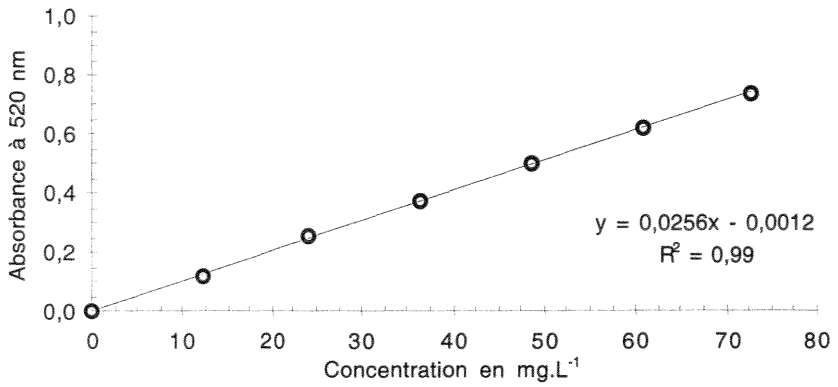


Figure n°26 : Droite de calibration de l'acide glucuronique.

5.4.2 Dosage de l'acide hyaluronique

La première étape des expérimentations concerne la validation du protocole de dosage, avec des échantillons d'acide hyaluronique de concentration connue, la seconde étape représente le dosage des échantillons de parois d'œufs d'*Ascaris*.

5.4.2.1 Validation du protocole de dosage

Une gamme de concentration en acide hyaluronique jusqu'à 1 mg est réalisée pour tester la méthode de dosage (*cf.* 4.4.6.1 : Protocole de dosage). Le tableau n°33 donne les quantités d'acide glucuronique correspondant aux quantités d'acide hyaluronique introduit. Les concentrations théoriques et observées d'acide glucuronique ou GlcUA sont ensuite comparées.

Tableau n°33 : Résultats des concentrations en acide glucuronique théoriques et calculées à partir de la droite de calibration.

HA en µg	GlcUA en µg	Concentration de GlcUA théorique en $mg.L^{-1}$*	Absorbance à 520 nm	Concentration de GlcUA calculée en $mg.L^{-1}$
0	0,0	0	0,016	0,63
			0,011	0,43
200	86,7	43,35	0,092	3,59
			0,183	7,15
400	173,4	86,70	0,361	14,10
			0,242	9,45
600	260,1	130,05	0,221	8,63
			0,221	8,63
800	346,8	173,40	0,717	28,01
			0,507	19,80
1 000	433,5	216,75	0,608	23,75
			0,562	21,95

* concentration théorique obtenue dans 2 mL après précipitation avec le bromure de cétyltriméthyl ammonium

Les concentrations sont déterminées à partir de l'absorbance par la droite de régression de la gamme d'étalonnage d'équation :

$$A = 0{,}0256\ Cc° - 0{,}012$$

avec A pour l'absorbance à 520 nm

et Cc° pour les concentrations en acide glucuronique.

La figure n°27 montre les différences entre les concentrations théoriques en acide glucuronique et déterminées par le dosage.

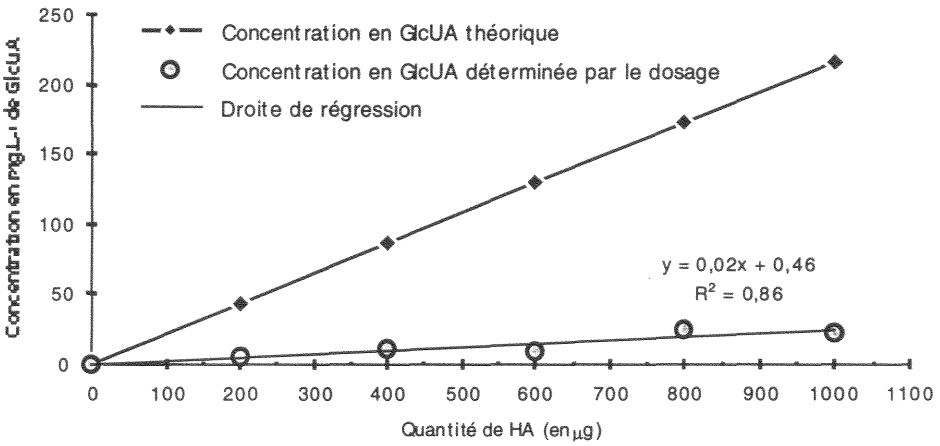


Figure n°27 : Dosage de l'acide glucuronique en fonction des quantités d'acide hyaluronique introduites .

☞ Nous remarquons une distance importante entre les 2 droites, représentant les écarts entre les concentrations théoriques et déterminées par le dosage.

☞ Les concentrations déterminées par le dosage sont sous-estimées, bien que l'ensemble des valeurs reste linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,86.

La droite de calibration pour le dosage de l'acide glucuronique est linéaire pour des concentrations inférieures à 80 $mg.L^{-1}$. L'absorbance maximale de la droite de calibration est de 0,740, bien que nous ayons testé des concentrations supérieures à 80 $mg.L^{-1}$, les absorbances relevées n'ont pas dépassé la valeur de 0,717. Aucune dilution des échantillons n'a donc été nécessaire pour ce dosage. Le tableau n°34 donne le rendement de la méthode.

Tableau n°34 : Rendement du protocole de dosage associant une étape enzymatique et la méthode de Blumenkrantz & Ashoe-Hansen (1973).

Quantité d'acide hyaluronique en µg	Concentration en acide glucuronique théorique en $mg.L^{-1}$	Concentration en acide glucuronique déterminée en $mg.L^{-1}$	Rendement en %
200	43,35	5,37	12,38
400	86,70	11,77	13,57
600	130,05	8,63	6,63
800	173,40	23,90	13,78
1000	216,75	22,85	10,54

☞ Le rendement moyen de la méthode est de 11,36 ± 2,64%.

La détermination des concentrations étant réalisée à partir de la droite de calibration, la réaction colorimétrique n'est pas en cause dans l'obtention de ce faible rendement. Les observations indiqueraient que l'enzyme ne couperait apparemment pas toutes les liaisons, le dosage colorimétrique par le méta-hydroxydiphényle ne prendrait en compte que les molécules d'acide glucuronique libérées. L'association d'une technique enzymatique au protocole de dosage de l'acide glucuronique de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) ne donne pas les résultats escomptés.

5.4.2.2 Dosages à partir des suspensions de coques de l'œuf d'Ascaris

Le protocole de dosage (*cf.* 4.4.6.1 : Protocole de dosage) est réalisé sur 3 suspensions de coques d'œufs d'*Ascaris* obtenues par broyage d'une suspension $3,3.10^4$ œufs/mL. Le dosage est effectué avec 5500 œufs d'*Ascaris* par échantillon, les œufs d'*Ascaris* possèdent une masse de couche externe estimée à 23 ng (Fairbain, 1957). La matrice extracellulaire constituant cette couche externe représente une masse relative de 126,5 µg par échantillon.

☞ Bien que le seuil de détection de la méthode de dosage soit de 5 µg d'acide glucuronique dans l'échantillon initial, aucune coloration ne permet de mettre en évidence la présence d'acide glucuronique dans les broyats de coques d'œufs d'*Ascaris*. Seule la gamme d'étalonnage donne une réaction colorée.

Pour expliquer ces résultats, deux hypothèses sont émises :

1 : L'acide hyaluronique serait absent dans les échantillons analysés.
2 : L'acide hyaluronique serait présent dans les échantillons analysés mais il ne pourrait être dégradé par l'enzyme. L'acide hyaluronique serait localisé au centre du protéoglycanne, entouré par des protéines et des glycosaminoglycannes, et donc inaccessible pour l'enzyme.

Afin de faciliter l'action de la hyaluronidase, nous avons décidé d'effectuer au début du protocole, des traitements permettant de dissocier les structures moléculaires des protéines ou d'autres composés situés en périphérie de l'acide hyaluronique.

5.4.2.3 Résultats des essais avec des hydrolyses acides ou enzymatiques préliminaires

Les traitements réalisés par la guanidine-HCl, par la trypsine ou les acides (chlorhydrique ou sulfurique) ont pour but de déstructurer les protéines de surface, pour faciliter l'action de la hyaluronidase.

5.4.2.3.1 Guanidine-HCl

Les 3 suspensions de coques d'œufs d'*Ascaris* sont traitées avec une solution de guanidine-HCl 4M, préalablement à la digestion enzymatique avec la hyaluronidase. Lors du dosage de l'acide glucuronique dans les échantillons de broyats de coques des œufs d'*Ascaris* après le traitement à la guanidine-HCl, aucune coloration n'est apparue.

5.4.2.3.2 Trypsine

Sur les 3 échantillons analysés contenant les coques des œufs broyés et traités à la trypsine, nous n'avons eu aucune coloration permettant d'affirmer la présence d'acide glucuronique.

5.4.2.3.3 Acide chlorhydrique

Concernant le traitement à l'acide chlorhydrique réalisé sur 3 échantillons renfermant les coques des œufs broyés, l'absence de coloration traduit la non-présence d'acide hyaluronique.

5.4.2.3.4 Acide sulfurique

Le traitement à l'acide sulfurique 2N pendant 24 heures, pose le problème de l'élimination des ions sulfates. Le traitement à l'hydroxyde de baryum se révèle inadapté par suite de la formation d'un dépôt blanchâtre de sulfate de baryum, gênant le déroulement de l'hydrolyse enzymatique.

5.4.3 Conclusion

La présence de l'acide hyaluronique n'a pu être mise en évidence. Deux hypothèses sont suggérées :

- la première est l'absence d'acide hyaluronique ou une présence en trop faibles concentrations,

- la seconde est que le protocole testé ne semble pas adapté à ce dosage pour diverses raisons :

    - les témoins internes d'acide hyaluronique n'ont donné que des concentrations sous-estimées,
    - le choix de l'enzyme est difficile, il existe plusieurs types de hyaluronidase avec des sites de coupures et des produits de réaction différents (*cf.* 1.5.3.1),
    - l'acide hyaluronique peut être piégé dans des filaments de protéines et donc inaccessible pour l'enzyme, empêchant l'hydrolyse enzymatique.

Au vu de ces résultats, d'autres dosages doivent être envisagés pour doser les glycosaminoglycannes et la chondroïtine sulfate plus particulièrement.

5.5 Dosage de la chondroïtine sulfate

Un protocole de dosage de glycosaminoglycannes de cartilage de rat est réalisé selon la technique décrite par Payan *et al.* (1998). Après une hydrolyse à la papaïne, il est procédé à une détermination des concentrations par colorimétrie au bleu de diméthylméthylène et par électrophorèse capillaire zonale.

La méthode au IA-CZE (ou Ion-Association Capillary Zone Electrophoresis) permet de visualiser les disaccharides insaturés des chondroïtines 4- et 6-sulfate et les disaccharides, tétrasaccharides et hexasaccharides de l'acide hyaluronique après une hydrolyse enzymatique. Farndale *et al.* (1982) utilisent également la spectrométrie avec le 1,9-DMB pour le dosage des glycosaminoglycannes sulfatés dans les cultures de cartilage, les quantités dosées s'échelonnent alors de 0,1 à 0,5 $mg.mL^{-1}$ de glycosaminoglycannes.

Les œufs possèdent une couche chitineuse, la présence de cette chitine nous a obligé à vérifier si les disaccharides de N-acétylglucosamine qui la composent peuvent interférer avec le 1,9-DMB pour les dosages colorimétriques ou avoir des temps de rétention similaires à la chondroïtine pour les dosages en électrophorèse.

5.5.1 Droite de calibration

Une courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution de chondroïtine 4-sulfate à 0,1 $mg.mL^{-1}$ (*cf.* 4.5.3.2 : Gamme d'étalonnage), les 10 concentrations sont réalisées en duplicata. La droite de calibration est linéaire pour des concentrations comprises entre 2,5 et 100 $\mu g.mL^{-1}$ (Figure n°28). Le seuil de détection de la méthode est de 5 $\mu g.mL^{-1}$, le dosage étant réalisé sur un volume d'échantillon de 0,4 mL, donc de 2 µg de chondroïtine sulfate dans l'échantillon initial.

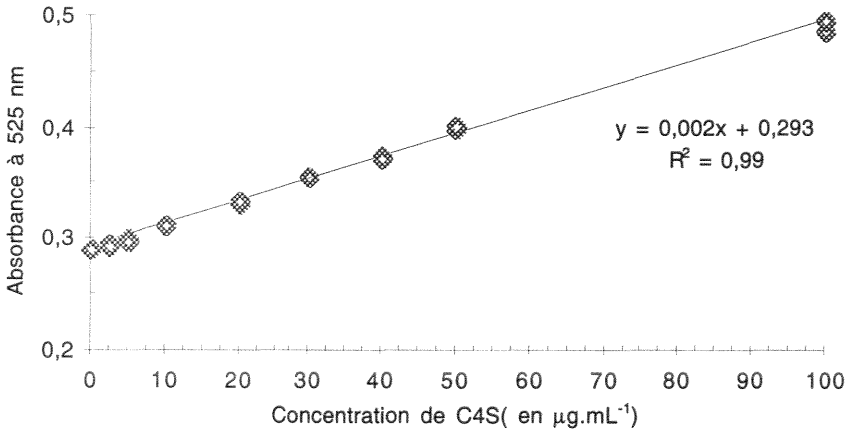


Figure n°28 : Gamme d'étalonnage de la chondroïtine 4-sulfate.

5.5.2 Résultats du dosage des suspensions de chitine

Les suspensions de 25 mg de chitine ayant subi une digestion à la chitinase puis à la papaïne (*cf.* 4.5.1.2 : Protocole de digestion de la chitine), sont dosées selon le protocole de dosage des glycosaminoglycannes dans les échantillons en colorimétrie (*cf.* 4.5.3.4 : Dosage des glycosaminoglycannes dans les échantillons) et en électrophorèse capillaire zonale (*cf.* 4.5.4.3 : Préparation des échantillons pour IA-CZE).

☞ Les suspensions de chitine n'ont provoqué aucune modification de la coloration du 1,9-DMB. Les molécules de N-acétyl-glucosamine ne créent pas d'interférence avec le réactif.

☞ Aucun pic parasite de N-acétylglucosamine n'est visible en électrophorèse capillaire au temps de rétention des disaccharides de la chondroïtine sulfate.

La présence d'une couche composée de chitine dans la coque des œufs ne pose pas de problème d'interférence pour le dosage des glycosaminoglycannes de la coque de l'œuf d'*Ascaris*.

5.5.3 Résultats des dosages des échantillons

Les 8 échantillons décrits dans le tableau n°26 du chapitre "Matériels et méthodes" (*cf.* 4.5.2 : Préparation des échantillons), sont constitués :

- de sections distales ou proximales d'utérus,
- de lyophilisats d'œufs d'*Ascaris* avec et sans couche externe
- de suspensions d'œufs avec couche externe.

L'objectif des dosages est de démontrer la présence de glycosaminoglycannes dans les sécrétions utérines présentes dans les sections distales des utérus d'*Ascaris*, ainsi que dans les échantillons de suspensions ou de lyophilisats d'œufs avec couche externe.

Les échantillons de sections proximales d'utérus et les échantillons de lyophilisats d'œufs sans couche externe devraient servir de témoins négatifs, montrant l'absence des glycosaminoglycannes dans ces échantillons, ou démontrant en même temps, que les glycosaminoglycannes seraient uniquement présents dans les sécrétions utérines formant la couche externe et dans la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*.

Les échantillons sont hydrolysés à la papaïne afin de détruire les molécules de protéines et de libérer les glycosaminoglycannes. Les hydrolysats papaïne d'un volume de 100 µL (*cf.* 4.5.3.3 : Hydrolyse à la papaïne), sont utilisés purs ou dilués au 1/2, 1/5 et au 1/10 dans du Tampon Tris. La réaction colorée est réalisée avec le 1,9-DMB (*cf.* 4.5.3.4 : Dosage des glycosaminoglycannes).

Parmi les 8 échantillons préparés nous avons sélectionné dans un premier temps les 4 échantillons susceptibles de contenir la matrice extracellulaire formant la couche externe. Ces 4 échantillons sont dilués au 1/2, 1/5 et au 1/10. Le tableau n°35 regroupe les résultats des dosages des échantillons après l'hydrolyse à la papaïne.

Tableau n°35 : Concentrations en glycosaminoglycannes totaux dans les échantillons hydrolysés.

Echantillon	Dilution	Absorbance à 525 nm	Concentration en $\mu g.mL^{-1}$
10 Sections distales d'utérus	1/10	0,292	< 0
	1/5	0,286	< 0
	1/2	0,293	0,04
	1	0,290	< 0
9 Sections distales d'utérus	1/10	0,289	< 0
	1/5	0,295	1,19
	1/2	0,290	< 0
	1	0,292	< 0
Lyophilisats d'œufs (11 mg) avec couche externe	1/10	0,289	< 0
	1/5	0,287	< 0
	1/2	0,292	< 0
	1	0,293	0,10
Lyophilisats d'œufs (41 mg) sans couche externe	1/10	0,294	0,46
	1/5	0,289	< 0
	1/2	0,295	1,19
	1	0,294	0,52

☞ Pour les 16 dosages réalisés, les absorbances déterminées à 525 nm sont inférieures à 0,300. Les concentrations en glycosaminoglycannes des échantillons se sont donc révélées inférieures au seuil de détection de 5 $\mu g.mL^{-1}$. La masse de la chondroïtine sulfate est donc inférieure à 2 µg dans les échantillons initiaux.

Etant donné les concentrations obtenues, les 4 autres échantillons de sections proximales et de lyophilisats d'œufs sans couche externe, ne sont pas dosés en colorimétrie.

Nous avons également décidé de ne passer aucun hydrolysat papaïne des 8 échantillons (préparés initialement) en électrophorèse capillaire, car le seuil de détection est encore plus important. Il est compris entre 53,3 et 66,6 $\mu g.mL^{-1}$ selon qu'il s'agisse de chondroïtine 0S, 4S ou 6S, soit un seuil de détection de 10 µg pour une injection de 150 µL d'échantillon.

6 Conclusion

6.1 Mise en évidence des mucopolysaccharides par des colorations histologiques

Nous avons réalisé 4 types de colorations avec comme cible la couche externe sur des suspensions d'œufs d'*Ascaris* provenant de sections distales de l'utérus :

- Bleu d'Alcian
- Acide Périodique de Schiff + Fuchsine Basique
- Acide Périodique de Schiff + bleu d'Alcian
- Bleu de Toluidine

La présence de mucopolysaccharides a été démontrée par un ensemble de colorations :

- Le test de coloration à l'Acide Périodique de Schiff couplé à la Fuchsine basique montre une couche externe de l'œuf d'*Ascaris* colorée en rose, indiquant la présence de mucopolysaccharides.

- La coloration bleu vif obtenue au bleu d'Alcian témoigne de la présence de mucopolysaccharides à caractère acide, elle est confirmée par la coloration bleu vif obtenue au bleu d'Alcian associé à la coloration avec le test PAS.

- La double coloration au bleu d'Alcian et à l'Acide Périodique de Schiff confirme également la présence de mucopolysaccharides acides avec apparition d'un bleu vif au niveau de la couche externe.

D'autres précisions sont données par Hayat (1993b) et Dickson & Rougley (1993). Selon Hayat (1993b) une coloration au bleu d'Alcian permet de mettre en évidence la présence de glycosaminoglycannes sulfatés, qui seraient par conséquent présents dans la couche externe de l'œuf *d'Ascaris*. Dickson & Rougley (1993) effectuant des électrophorèses sur gel de polyacrylamide avec des échantillons contenant des glycosaminoglycannes sulfatés, colorent également les bandes obtenues sur le gel par du bleu d'Alcian.

Par contre la coloration réalisée au bleu de Toluidine donne des résultats divergents avec les 3 autres colorations (bleu d'Alcian, Acide Périodique de Schiff couplé à la Fuchsine Basique ou au bleu d'Alcian).

Le bleu de Toluidine est pourtant utilisé par Chevreau *et al.* (1977) pour colorer le mucus sur des sections de tissu, par Hayat (1993a) qui l'associe à la Fuchsine Basique pour visualiser les glycoprotéines, et par Volpi *et al.* (1998) qui l'emploient pour marquer les bandes de glycosaminoglycannes dans un gel d'agarose.

6.2 Analyses par spectrométrie infrarouge

6.2.1 Chondroïtines sulfates

Les chondroïtines A et C ont été analysées pour rechercher les bandes d'absorption caractéristiques des glycosaminoglycannes. Sur les spectres, pour des longueurs d'ondes comprises entre 2000 et 1000 cm^{-1}, nous

apercevons les bandes d'absorption des groupes carboxyliques à 1615 cm^{-1} et des groupes acétylaminés à des longueurs d'onde de 1375 cm^{-1}.

La bande d'absorption des esters de sulfates est la caractéristique principale des glycosaminoglycannes, elle se situe à des longueurs d'onde de 1240-1250 cm^{-1} (Rahemtulla & Lovtrup, 1974a; Daudon & Estepa-Maurice, 1996).

6.2.2 Lyophilisats d'œufs d'*Ascaris*

Des lyophilisats de suspensions d'œufs possédant ou dépourvus de couche externe ont été testés en spectrométrie infrarouge (*cf.* 5.2.2 : Spectrométrie infrarouge à partir des suspensions d'œufs lyophilisés). L'analyse des 2 spectres, ainsi que l'analyse de la différence entre les 2 tests, avait pour objectif d'étudier la nature de la matrice extracellulaire formant la couche externe.

Le spectre d'absorption obtenu par différence est présenté sur la figure n°29.

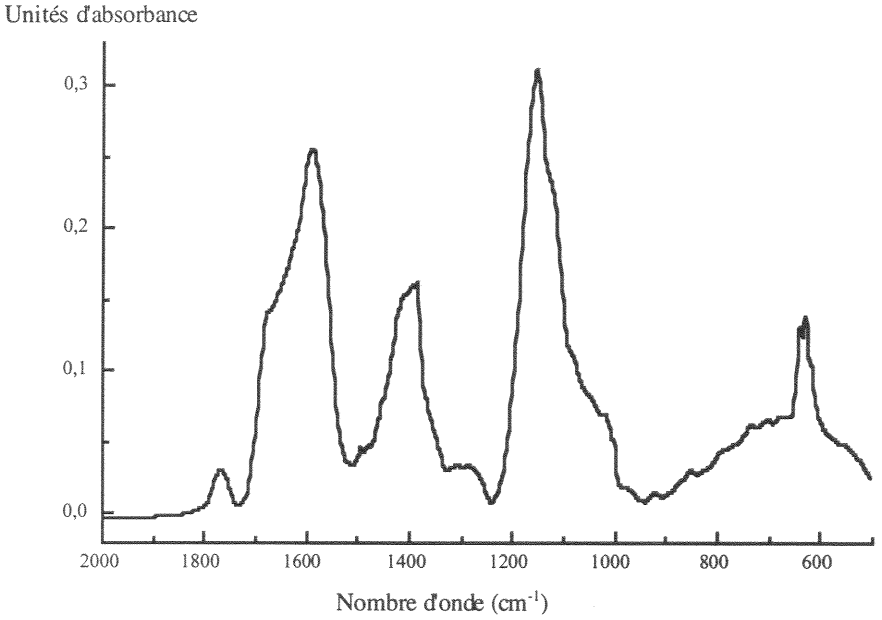


Figure n°29 : Spectre infrarouge de la différence des 2 suspensions d'œufs lyophilisée pour des longueurs d'ondes de 2000 à 500 cm^{-1}.

Le tableau n°36 indique les principaux domaines de vibrations infrarouges pour les protéines, les chaînes latérales de protéines, les acides aminés, les polysaccharides et les glycosaminoglycannes.

Tableau n°36 : Comparaison des fréquences des principaux domaines de vibrations infrarouges (Daudon & Estepa-Maurice, 1996; Rouessac & Rouessac, 1997) avec les fréquences du spectre formé par différence des 2 lyophilisats d'œufs.

Molécules	Type de vibration	Fréquence (en cm^{-1})	Présence/absence dans la figure n°29
Protéines	valence C = O des amides I	1670 - 1630	présence à 1655 cm^{-1}
Protéines	déformation N—H valence C—N des amides II	1575 - 1525	absence
Acides aminés et Chaînes latérales des protéines	valence C = O des acides carboxyliques	1400	présence à 1401 cm^{-1}
Acides aminés	valence C = O des acides carboxyliques déformation N—H des amides et amines I et II	1640 - 1575	présence à 1590 cm^{-1}
Polysaccharides	valence C—O des alcools	1150 - 1050	présence à 1147 cm^{-1}
Glycosaminoglycannes	valence SO_4	1250	absence

Nous pouvons ressortir 3 points importants à partir de ces résultats :

- le spectre obtenu par différence, montre des bandes d'absorption engendrées par les vibrations de déformation et d'élongation des structures des amines et amides. La présence de ces bandes d'adsorption indique la présence de protéines dans la couche externe (Daudon & Estepa-Maurice, 1996). Cependant, aucune bande d'absorption des protéines n'est retrouvée entre 1575 et 1525 cm^{-1}, pour les vibrations des déformations N—H et des valences C—N des amides II.

- la bande d'absorption à 1147 cm^{-1} correspondant aux valences O—H des alcools, signe la présence de polysaccharides de la couche externe.

- en revanche, l'absence d'une bande à 1240-1250 cm^{-1}, caractéristique des groupements sulfates des glycosaminoglycannes ne permet pas de conclure sur la présence de mucopolysaccharides dans la couche externe.

L'analyse des bandes d'absorption indiquerait donc que parmi les constituants de la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*, il y aurait présence de polysaccharides et de protéines.

6.3 Dosage des protéines et des acides aminés

6.3.1 Lyophilisats d'œufs

6.3.1.1 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé en microtitration avec l'acide bicinchoninique (*cf.* 4.3.1.3 : Méthodes de microtitration), cette méthode est utilisée avec des lyophilisats des enveloppes des levures contenant des glycoprotéines et de la chitine.

Pour le dosage des lyophilisats des œufs d'*Ascaris* avec et sans couche externe (*cf.* 5.3.2.1 : Résultats des dosages des protéines), nous obtenons des masses moyennes de protéines égales :

- 0,62±0,07 $g.g^{-1}$ pour les lyophilisats d'œufs privés de couche externe,
- 0,77±0,06 $g.g^{-1}$ pour les lyophilisats d'œufs avec leur couche externe.

Nous remarquons tout d'abord que les lyophilisats sont très riches en protéine. Connaissant le volume de cette couche qui a été estimé à 39% par Faribain (1957), nous pouvons calculer d'une manière théorique la teneur en protéine de la couche externe, elle serait de 0,398 g de protéine par gramme de lyophilisat. La couche externe représenterait 39,8% de la teneur totale en protéine de l'œuf.

Par contre Magat *et al.* (1972) donnent un pourcentage massique de protéine de seulement 23% pour la totalité de l'œuf, mais l'expérimentation a été réalisée à partir d'œufs provenant d'une dissection d'utérus de 1 cm à partir de l'orifice génital. Sachant que le taille de l'utérus est rarement supérieure à 0,5 cm, tous les œufs ont été récupérés sans discrimination (œufs fécondés ou œufs non fécondés). De plus, les suspensions d'œufs sont ensuite placées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5% pour éliminer la couche externe nommée "couche lamellaire" par Magat *et al.* (1972). Ils suppriment ainsi un apport important de protéine, car cette couche est également nommée "couche protéine" par Jaskoski (1962).

6.3.1.2 Dosage des acides aminés

Après une hydrolyse acide, les acides aminés sont dosés par le 2,4-dinitrofluorobenzène selon le protocole de Ghuysen *et al.* (1965) cité en 4.3.2.3.

Pour le dosage des lyophilisats des œufs d'*Ascaris* avec et sans couche externe (*cf.* 5.3.2.2 : Résultats obtenus à partir des lyophilisats des sections de l'utérus), nous obtenons des masses moyennes d'acides aminés de :

- 0,19±0,04 $g.g^{-1}$ pour les lyophilisats d'œufs privés de couche externe,
- 0,23±0,06 $g.g^{-1}$ pour les lyophilisats d'œufs avec leur couche externe.

Les lyophilisats d'œufs avec leur couche externe semblent contenir une part plus importante d'acides aminés, cependant les tests statistiques n'indiquent pas de différence significative entre les 2 masses moyennes d'acides aminés dans les lyophilisats. Ces résultats signifieraient que la couche externe ne contiendrait pas d'acides

aminés, alors que nous obtenons des concentrations supérieures en protéines dans les lyophilisats des œufs avec couche externe.

6.3.2 Sections des utérus

6.3.2.1 Dosage des protéines

Le but recherché des analyses des sections distales et proximales des utérus était mettre en évidence la présence et la nature des sécrétions utérines dans les sections distales des utérus, mais les lyophilisats des sections n'ont pu être réduits en poudre rendant les analyses impossibles.

6.3.2.2 Dosage des acides aminés

Pour le dosage des lyophilisats des sections proximales et distales d'utérus d'*Ascaris*, nous obtenons des masses moyennes d'acides aminés de :

- 0,45±0,12 $g.g^{-1}$ pour les sections proximales d'utérus,
- 0,55±0,01 $g.g^{-1}$ pour les sections distales d'utérus.

Les sections distales d'utérus semblent contenir une part plus importante d'acides aminés, cependant les tests statistiques n'indiquent pas de différence significative entre les 2 masses masses moyennes d'acides aminés des 2 types de sections. La matrice extracellulaire constituant la couche externe étant sécrétée uniquement dans les sections distales, une différence de concentration entre les 2 sections nous aurait permis de déduire la nature biochimique des sécrétions.

Foor (1967) indique pourtant que les cellules utérines possèdent un réticulum endoplasmique granuleux, des complexes de Golgi et des vésicules de sécrétions. Polyakova-Krusteva *et al.* (1985) observent un réticulum endoplasmique fortement développé ainsi que des mitochondries apparaissant denses aux électrons, ils concluent que les cellules utérines ont un métabolisme actif, et que les cellules synthétisent des protéines.

6.4 Dosage des constituants des protéoglycannes

6.4.1 Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est lié par liaison covalente au coeur protéique, il est le tronc du protéoglycanne (*cf.* 1.4 : Structure des protéoglycannes). Il est formé d'unités répétitives de disaccharides de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique. Il est le plus grand des glycosaminoglycannes comprenant entre 500 et plusieurs milliers d'unités de disaccharides (*cf.* 1.5.3.1 : Acide hyaluronique).

Nous avons utilisé la méthode de dosage de l'acide glucuronique dans les urines decrite par Blumenkrantz & Ashoe-Hansen (1973), pour quantifier l'acide glucuronique obtenu par hydrolyse de l'acide hyaluronique par la hyaluronidase (*cf.* 4.4.6).

6.4.1.1 Rendement de la méthode

Le rendement de la méthode est déterminé par dosage d'une gamme d'acide hyaluronique de 0 à 1000 µg dans un volume de 3 mL de tampon phosphate. Après hydrolyse enzymatique à la hyaluronidase, nous dosons

l'acide glucuronique formé par la méthode de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973). Le rendement de la méthode est de 11,35±2,94%.

La détermination des concentrations étant réalisée à partir de la droite de calibration, la réaction colorimétrique n'est pas en cause dans l'obtention de ce faible rendement. L'enzyme ne coupe apparemment pas toutes les liaisons, le dosage colorimétrique par le méta-hydroxydiphényle ne prend en compte que les molécules d'acide glucuronique libérées.

6.4.1.2 Dosage de l'acide hyaluronique dans les coques purifiées

Bien que le rendement soit faible, les suspensions de coques d'œufs d'*Ascaris* broyés sont utilisées pour le dosage de l'acide hyaluronique. Le seuil de détection de la méthode a été estimé par la droite de calibration à 5 µg d'acide glucuronique, étant donné le rendement de la méthode, le seuil de détection serait de 56,75 µg.

Les suspensions contiennent les coques de 5500 œufs. Etant donné le volume de la couche externe de 23100 μm^3 (Fairbain, 1957) et une densité estimée à 1 pour un gel hydraté, la masse approximative de matrice extracellulaire dans les échantillons est de 130 µg.

Malgré un seuil de détection inférieur à la masse théorique de matrice extracellulaire utilisée, nous n'avons obtenu aucune coloration dans les échantillons témoignant d'une présence d'acide hyaluronique.

6.4.1.3 Hydrolyses enzymatiques et acides avant dosage

Il semblerait que le problème provienne de l'hydrolyse enzymatique, nous avons donc introduit des étapes en amont du protocole dont le but est de libérer l'acide hyaluronique qui pourrait être piégé dans des filaments de protéines. Pour ce faire, nous avons utilisé 4 réactifs séparément sur les suspensions de coques d'œufs broyés avant l'hydrolyse :

1. Guanidine-HCl (Yanagishita & Hanscall, 1984)
2. Trypsine (Volpi *et al.*, 1998)
3. Acide chlorhydrique (hydrolyse acide partielle)
4. Acide sulfurique (hydrolyse acide partielle)

Aucun des traitements réalisés n'a donné de réponse positive avec une coloration au méta-hydroxydiphényle. Nous pouvons supposer que l'acide hyaluronique est soit présent en faible quantité, soit absent de la matrice extracellulaire formant la couche externe.

6.4.2 Glycosaminoglycannes

Un protocole de dosage de glycosaminoglycannes de cartilage de rat est réalisé selon la méthode utilisée par Payan *et al.* (1998) permettant le dosage des glycosaminoglycannes après une hydrolyse à la papaïne. Il associe une détermination des concentrations par colorimétrie au bleu de diméthylméthylène et par électrophorèse capillaire zonale.

6.4.2.1 Suspensions de chitine

La chitine présente dans la couche chitineuse de l'œuf d'*Ascaris* est un polysaccharide composé de N-acétylglucosamine. Nous avons vérifié d'une part que sa présence n'engendrait pas d'interférence avec le colorant 1,9-DMB et d'autre part que la N-acétylglucosamine ne possédait pas en électrophorèse capillaire zonale des temps de rétentions identiques à ceux de la chondroïtine 0S, 4S et 6S.

6.4.2.2 Dosage colorimétrique

Après libération par la papaïne des glycosaminoglycannes de la matrice extracellulaire de la couche externe, nous avons des hydrolysats :

- des sections distales et proximales d'utérus,
- des lyophilisats d'œufs avec et sans couche externe
- des suspensions d'œufs avec couche externe

Les absorbances obtenues lors des analyses sont inférieures à 0,300 (valeur qui correspond à l'absorbance du colorant à 525 nm), les concentrations seraient inférieures à 5 $\mu g.mL^{-1}$ dans les hydrolysats papaïne. Les quantités de chondroïtine sulfate dans les échantillons seraient par conséquent inférieures à 2 µg.

Les échantillons ne sont pas analysés par électrophorèse capillaire zonale, car le seuil de détection est supérieur à celui du dosage colorimétrique, il est de 10 µg pour une injection de 150 µL d'échantillon.

6.4.3 Conclusion sur les constituants des protéoglycannes

La présence des glycosaminoglycannes ou de l'acide hyaluronique dans la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*, n'a pu être démontrée par les dosages enzymatiques (hyaluronidase et papaïne), colorimétriques avec le m-hydroxydiphényl pour le dosage de l'acide glucuronique et le 1,9-DMB pour le dosage des glycosaminoglycannes.

Les protéoglycannes seraient :

- soit absents de la couche externe,
- soit présents à de faibles concentrations, sous les seuils de détection.

En revanche, les colorations histologiques au bleu d'Alcian et à l'acide Périodique de Schiff couplée à de la Fuchsine Basique ou à du bleu d'Alcian témoigneraient de la présence de mucopolysaccharides acides.

Tests de détermination du caractère hydrophile et hydrophobe de la surface des oeufs d'Ascaris

TEST DE DETERMINATION DU CARACTERE HYDROPHILE ET HYDROPHOBE DE LA SURFACE DES ŒUFS D'*ASCARIS*

Ce chapitre sur la détermination du caractère hydrophile et hydrophobe se divise en 5 parties :

1 Etude bibliographique de l'hydrophilie et de l'hydrophobie de surfaces biologiques 120

2 Objectifs 127

3 Matériels et méthodes 128

4 Résultats des études d'hydrophilie et d'hydrophobie de la surface des œufs d'*Ascaris* 142

5 Discussions et conclusion 164

1 Etude bibliographique de l'hydrophilie et de l'hydrophobie de surfaces biologiques

La plupart des microorganismes sont en suspension dans l'eau, traduisant des propriétés de surface hydrophiles. Une majorité de bactéries est facilement mise en suspension en milieu aqueux grâce aux composants polaires et hydrophiles qui constituent la surface bactérienne. Elle est principalement de nature glucidique (exopolysaccharides) et protéique, les groupements chimiques externes sont surtout polaires (fonctions carboxyliques, phosphates, sulfates, amines).

Il existe des cas particuliers où les bactéries marines se développent à la surface de l'eau directement en contact avec l'atmosphère, exprimant des propriétés d'hydrophobie pour rester en surface (Rosenberg & Doyle, 1990). L'hydrophobie de surface bactérienne a été particulièrement étudiée par Rosenberg *et al.* (1980), Rosenberg & Kjelleberg (1986), et Rosenberg (1991). Des études d'adhésion ont également été réalisées sur des virus, des levures et des cellules d'eucaryotes (Rosenberg & Kjelleberg, 1986). Les composés hydrophobes de surface sont de nature aromatique (protéines avec des acides aminés hydrophobes) et/ou lipidique (longue chaîne carbonée).

L'hydrophobie se manifeste par la relative insolubilité des composés non polaires en milieu aqueux, par leur agrégation, par l'incapacité de ces surfaces à être mouillées par l'eau et par leur tendance à se partager préférentiellement avec un milieu autre que l'eau (sur une surface, dans un solvant ou un gaz).

En réalité, le phénomène est plus complexe, les surfaces biologiques n'ont pas un caractère hydrophile unique. Les propriétés dépendent de la balance entre les groupements hydrophiles et hydrophobes d'un microorganisme, qui contraint à un environnement hydrophile, gouvernerait sa capacité à adhérer à des surfaces hydrophobes. En fait, la capacité de certaines bactéries à adhérer aux molécules hydrophobes ou aux interfaces de 2 substances hydrophile/hydrophobes, est obtenue grâce à l'intervention de molécules amphipatiques interagissant avec les 2 phases. Le rapport entre les composants hydrophobes et hydrophiles détermine donc la contribution des interactions hydrophobes dans les phénomènes d'adhésion et d'agrégation cellulaire.

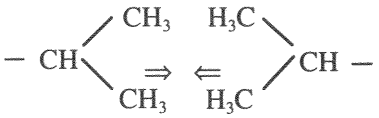
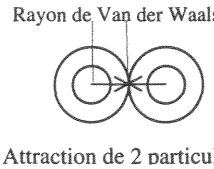
Deux voies sont envisageables pour étudier l'hydrophobie et l'hydrophilie :

- par voie directe, en utilisant des mesures de caractéristiques de surface pour quantifier l'adhésion des éléments à analyser,
- par voie indirecte, en quantifiant la désorption d'éléments ayant adhéré par l'utilisation d'inhibiteur d'adhésion.

1.1 Différents types de liaison impliquées dans les interactions

Il existe différentes forces de liaisons dans les molécules biologiques, les liaisons covalentes possèdent une énergie de dissociation de 414 $kJ.mol^{-1}$ pour des simples liaisons C–H ou de 930 $kJ.mol^{-1}$ pour des triples liaisons C≡C par exemple. Les liaisons non covalentes possèdent des énergies de dissociation plus faibles (Tableau n°37).

Tableau n°37: Forces de liaisons non covalentes dans les molécules biologiques (Leclerc *et al.*, 1995).

Type de liaison	Exemple	Energie de dissociation (en $kJ.mol^{-1}$)
liaison hydrogène	$> C = O \cdots H - O -$	8-21
interactions ioniques	$- NH_3^+ \Rightarrow\Leftarrow {}^-O - C -$	42
interactions hydrophobes		4-8
interactions de Van der Waals		4

Les interactions hydrophobes sont des forces maintenant entre elles les régions non polaires des molécules. Elles ne sont pas dues à une attraction entre les molécules non polaires, mais résultent d'une organisation optimale des molécules d'eau autour des zones hydrophobes. Les interactions ioniques ou électrostatiques possèdent une énergie de dissociation supérieure à l'énergie de dissociation des interactions hydrophobes. Pour caractériser les interactions hydrophobes, nous devons neutraliser les forces ioniques présentes par l'ajout de sels dans le milieu.

1.2 Voie directe : tests de mesure pour l'évaluation des caractéristiques de surface

Du point de vue méthodologique, il existe un éventail assez vaste de méthodes pour l'évaluation de l'hydrophobie des surfaces cellulaires microbiennes. Par contre, il existe peu de méthodes d'évaluation de l'hydrophilie.

1.2.1 Méthodes de mesure du caractère hydrophobe

Le tableau n°38 regroupe les différentes méthodes pour quantifier le caractère hydrophobe.

Tableau n°38 : Méthodes d'évaluation de l'hydrophobie de surface des microorganismes.

Auteurs	Tests	Protocoles
van Oss & Gillman (1972) Bellon-Fontaine *et al.* (1990)	Mesure de l'angle de contact MAC	Sur une goutte d'eau déposée sur la surface à analyser, l'angle de contact entre la surface et la tangente est mesuré. Plus la surface est hydrophobe, plus la goutte est bombée et l'angle important.
Stendahl *et al.* (1973) Sharpe (1988) Eiteman & Gainer (1991a)	Technique de partage de deux phases liquides TPP	Les propriétés de surface sont estimées selon la distribution des cellules lorsque deux solutions non miscibles sont mises en contact, le dextran (hydrophile) et le polyéthylène glycol (hydrophobe).
Hjertén *et al.* (1974)	Chromatographie d'interaction hydrophobe CIH	La suspension bactérienne est déposée sur une colonne contenant des billes de sépharose liées de façon covalente à des groupements hydrophobes. La détermination de la rétention est réalisée par densité optique, par mesure des unités formant colonie, ...
Hill *et al.* (1963) Kjelleberg *et al.* (1980)	Sondes moléculaires hydrophobes	Une mesure de la mobilité électrophorétique est réalisée en présence de molécules de surfactant chargées dans la suspension bactérienne. La mobilité est modifiée suivant le nombre de molécules de surfactant s'étant liées par interactions hydrophobes aux surfaces cellulaires.
Rosenberg *et al.* (1980) Pelletier *et al.* (1997) van der Mei *et al.* (1997)	Test d'adhésion des microorganismes aux hydrocarbures TAMH	La suspension bactérienne est mise en contact avec une émulsion d'hydrocarbure, le pourcentage de cellules retenues à l'interface est déterminé par mesure de la densité optique dans la phase aqueuse.
Hazen & Hazen (1988) Uyen *et al.* (1988) Rosenberg (1991)	Adhésion à des solides hydrophobes	La mesure de l'adhésion de microorganismes sur des microsphères de polystyrène est réalisée par dénombrement au microscope de colonies ayant au moins 3 microsphères adsorbées.
Lindhal *et al.* (1981)	Test d'agrégation en milieu salin TAS	La suspension bactérienne est additionnée de sulfate d'ammonium jusqu'à l'agrégation des cellules. Plus le caractère hydrophobe est marqué, plus la précipitation se réalise à faible concentration saline.
Krishina *et al.* (1996)	Electromicroscopie par immuno-gold EMIG	La fixation d'anticorps marqués de particules d'or sur la surface est visualisée par microscopie électronique.

1.2.1.1 Mesure de l'angle de contact

La méthode implique la réalisation de plusieurs conditions (Rosenberg & Doyle, 1990):

- une couche de cellules aussi fine que possible,

- un séchage partiel et non une dessiccation de la couche cellulaire pour enlever l'eau "libre", qui pourrait entraîner une erreur de la mesure,
- une application méticuleuse de la goutte de liquide,
- une mesure de l'angle de contact directement ou par détermination de la forme de la goutte nécessitant une instrumentation et une expertise technique difficiles à mettre en place.

De nouvelles méthodes sur la mesure de l'angle de contact se sont développées avec l'étude des propriétés thermodynamiques permettant de déterminer les énergies libres d'interaction de surface, pour déterminer une approche de Lifshitz-van der Waals/Acide-Base. Cette technique donne des indications sur les propriétés d'hydrophobie, électrostatiques et acido-basiques (Bellon-Fontaine *et al.*, 1990).

1.2.1.2 Test de partage de phase

Plusieurs facteurs influencent le partage des 2 phases, comme la nature chimique et la concentration des phases, le pH, la température et la présence de sels. Différents gels peuvent être utilisés pour réaliser le TPP comme le polyéthylène glycol associé à une solution de dextran, de sulfate de magnésium ou de phosphate de potassium dibasique (Stendahl *et al.*, 1973; Sharpe, 1988; Eiteman & Gainer, 1991b). Il est difficile de déterminer les concentrations des 2 phases, de sorte que les forces hydrophiles mises en jeu soient équivalentes aux forces hydrophobes.

Eiteman & Gainer (1991b) déterminent les coefficients de partage de plusieurs molécules à différents pH à l'aide de modèle mathématique en utilisant un système associant du PEG 8000 à une solution de phosphate de potassium. Par contre, leur modélisation réalisée à partir de solutés non chargés n'est pas transposable aux solutés chargés négativement.

1.2.1.3 Chromatographie d'interaction hydrophobe

Ce test mesure l'adhésion microbienne à des microsphères d'octyl-sépharose ou de phényl-sépharose. Le pourcentage de bactéries liées aux billes se détermine par différence de concentrations avant et après passage sur la colonne chromatographique (Hjertén *et al.*, 1974). Néanmoins des problèmes stériques peuvent se présenter, des bactéries peuvent rester bloquées entre les billes. Une procédure en batch par agitation de la suspension et des billes libres en suspension permet d'éviter ces problèmes liés à la taille (Rosenberg & Doyle, 1990). La réalisation de ce test en batch revient à effectuer un test d'adhésion sur support hydrophobe, comme le test d'adhésion sur microsphères de polystyrène (*cf.* 1.1.1.6 : Adhésion à des solides hydropobes).

L'avantage que procure cette technique est la possibilité de réaliser un contrôle d'adhésion sur des billes non-traitées de sépharose, ce qui permet de vérifier si l'adhésion est due aux propriétés hydrophobes de l'élément à caractériser. De plus, des solutions à base de détergents peuvent permettre une désorption ou une élution des bactéries afin de quantifier les phénomènes d'adhésion de façon indirecte.

1.2.1.4 Sondes moléculaires hydrophobes

Une mesure de la mobilité électrophorétique est réalisée en présence de molécules de surfactant chargées et marquées dans la suspension bactérienne. Des surfactants ioniques (généralement anioniques) et non-ioniques ont été proposés comme sondes pour mesurer l'hydrophobie bactérienne. Le degré de liaison des sondes

moléculaires à la surface des cellules pourrait être une approche intéressante pour l'étude de l'hydrophobie microbienne (Hill *et al.*, 1963).

Kjelleberg *et al.* (1980) mesurent les liaisons de l'acide dodécanoïque radiomarqué aux cellules bactériennes et déterminent par calcul leur affinité et le nombre des sites de liaison. Des approches similaires sont réalisées en utilisant de l'acide palmique radiomarqué. Avec l'utilisation de ces sondes, un des problèmes potentiels est leur pénétration possible à l'intérieur de la cellule via les porines ou par des fractures de la paroi (Rosenberg & Doyle, 1990).

1.2.1.5 Test d'adhésion des microorganismes aux hydrocarbures

Le pourcentage d'hydrophobie dépend de l'espèce, de la phase de culture et du choix de l'hydrocarbure. Vanhaeke & Pijck (1988) (cités par Rosenberg & Doyle, 1990) montrent que l'hexadécane n'a pas d'effet sur l'intégrité des cellules, tandis que le xylène provoquerait une lyse cellulaire et fausserait par conséquent les résultats. Testant 3 hydrocarbures sur différentes bactéries, Rosenberg *et al.* (1980) montrent des différences importantes d'affinité entre les hydrocarbures pour une même souche selon leur phase de croissance (Tableau n°39). Dans ces conditions, la comparaison des propriétés d'hydrophobie d'une souche à l'autre reste difficile.

Tableau n°39 : Variations de l'affinité de différentes souches bactériennes en fonction de l'hydrocarbure (Rosenberg *et al.*, 1980).

Bactérie	Souche	Hexadécane	Octane	Xylène
Escherichia coli	B	0*	0	1
Acinetobacter	RAG-1	4	5	4
Acinetobacter	BD	3	5	4
Staphylococcus	*albus*	0	N.D.	0
Staphylococcus	*aureus*	5	5	4
Serratia	*marcescens* (p.ex.)	1	0	2
Serratia	*marcescens* (p.st.)	3	2	4

p.ex : phase exponentielle, p.st. : phase stationnaire, N.D. : non déterminé

* : Affinité notée de 0 à 5 avec 0 pour une absence d'affinité et 5 pour une bonne affinité

Van der Mei *et al.* (1997) montrent que l'adhésion de souches de staphylocoques dépend des interactions électrostatiques entre les émulsions d'hexadécane et la surface des bactéries. Une adaptation du test a été réalisée par van der Mei *et al.* (1998) qui déterminent les effets de l'adhésion des protéines. Ils mesurent la mobilité électrophorétique des émulsions d'hexadécane recouvertes de protéine. Le test n'est plus nommé TAMH, mais appelé TAPH pour la mesure de l'adhésion de protéine.

Pelletier *et al.* (1997) réalisent sur les lactobacilles des tests d'adhésion au chloroforme (solvant acide), qu'ils comparent aux tests d'adhésion à l'hexadécane, solvant apolaire. Les pourcentages d'adhésion étant supérieurs avec le chloroforme, ils démontrent ainsi que les lactobacilles sont d'importants donneurs d'électrons et possèdent un caractère basique, et par conséquent offrent une capacité potentielle à générer des interactions acides-bases de Lewis avec un support.

1.2.1.6 Adhésion à des solides hydrophobes

Hazen & Hazen (1988) étudient l'adhésion des microsphères de polystyrène en latex sur des populations de *Candida albicans*. Pour différencier les colonies hydrophobes des colonies non-hydrophobes, ils déterminent un nombre minimal de microsphères devant être adsorbées. Le pourcentage de colonies de *Candida albicans* sur lesquelles 3 microsphères au moins sont attachées, représente l'hydrophobie relative de la population.

Uyen *et al.* (1988) indiquent que quelque soit la force ionique, l'énergie interfaciale libre de l'adhésion est déterminée par le nombre relatif de bactéries ou de particules de polystyrène adhérant à l'équilibre, excepté pour les faibles forces ioniques où les répulsions électrostatiques sont supérieures aux forces d'adhésion. Ils donnent pour exemple le nombre de streptocoques adhérant aux particules de polystyrène qui est de 30 à force ionique faible et de 4 à force ionique élevée.

Pour Rosenberg & Doyle (1990), une critique possible de l'utilisation de ces microsphères est la présence d'agents plastiques amphipatiques dans la production du polystyrène.

1.2.1.7 Test d'agrégation en milieu salin

La technique TAS utilisée par Lindhal *et al.* (1981), donne seulement une estimation qualitative du potentiel d'hydrophobie. De plus, ce test prend en compte les interactions électrostatiques entrant en jeu lors des phénomènes d'autoagrégation des bactéries, ce test ne permet pas de faire la part entre le potentiel d'hydrophobie et les interactions électrostatiques.

1.2.2 Méthodes cumulées

Une analyse de surface ne peut se faire par une méthode unique, seul un ensemble de techniques permettra de caractériser correctement les propriétés d'une surface.

Ainsi Krishina *et al.* (1996) caractérisent les propriétés de surface de *Clostridium difficile* par le test à l'hexadécane ou TAMH, combiné avec un test d'agglutination saline et une chromatographie d'interaction hydrophobe.

Van der Mei & Busscher (1996) indiquent la présence de molécules amphiphiles à la surface de *Streptococcus mitis* par les spectres d'absorption infrarouges, plus précisément par les bandes d'absorption des groupements CH_2/CH_3 autour de 2900 cm^{-1}. Ils recherchent conjointement la composition des éléments de surface, et mesurent le potentiel zeta ainsi que l'adhésion à l'hexadécane; Ils complètent leur recherche en déterminant le rapport des concentrations de surface N/C, un faible ratio est obtenu pour les organismes possédant des molécules amphiphiles.

De même, van der Mei *et al.* (1997) déterminent l'adhésion de souches de staphylocoques aux émulsions d'hexadécane. Ils comparent les propriétés physico-chimiques des microorganismes obtenues par le TAMH, aux tests de mesure de l'angle de contact et du potentiel zeta, ainsi qu'aux éléments de composition de la surface cellulaire.

Mattos-Guaraldi *et al.* (1999) étudiant des souches de *Corynebacterium diphteriae*, remarquent que les microorganismes expriment des variations de l'hydrophobie selon la méthode utilisée. Les résultats à partir d'une seule méthode sont délicats à exploiter. Ainsi, 12 souches adhèrent à la surface du polystyrène, 3 souches seulement montrent spontanément une agrégation dans un milieu spécifique (Trypticase Soy Broth), 8 souches s'autoagglutinent dans du PBS (solution de tampon phosphate). Le test d'agrégation en milieu salin et le test adhésion à l'hexadécane donnent également des valeurs avec des écarts larges pour l'ensemble des souches. Enfin, Mattos-Guaraldi *et al.* (1999) montrent que les propriétés d'hydrophobie de surface dépendent du milieu de culture.

1.3 Voie indirecte : inhibition de l'adhésion

L'emploi d'agents inhibiteurs interférant sur les phénomènes d'adhésion, peut permettre une désorption et être utilisé pour une quantification des cellules ayant adhéré. Divers composés ont été répertoriés par Rosenberg & Doyle (1990) dans le tableau n°40.

Tableau n°40 : Agents inhibiteurs d'adhésion par interférence avec les effets hydrophobes (Rosenberg & Doyle, 1990).

Agent inhibiteur d'adhésion	Domaine d'application
• Caséinoglycopeptides, Sérum Albumine Bovine	• Adhésion à des tubes tests en polystyrène.
• Copolymères avec des segments hydrophobes et hydrophiles	• Adhésion de *E. coli* et d'érythrocytes à du verre "hydrophobisé".
• Emulsan, Tween, SDS	• TAMH et adhésion à des cellules épithéliales buccales.
• Héparine, complexes de chlorure de tridodécylméthylammonium	• Adhésion à du latex, du téflon et à des cathéters en vinyl.
• Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	• CIH de spores de *Bacillus subtilis.* • Coagrégation entre *Actinomyces viscosus* et *Streptococcus sanguis.*
• Tétraméthyl urée, Propanol	• Adhésion de *E.coli* à des surfaces hydrophobes.
• Triton X-100, Nonidet P-40, Tween 20	• Hémagglutination par *Pseudomonas.*
• Tween 20	• Adhésion de *Candida* à du polystyrène.
• Tween 80 à 1 %	• Adhésion de *Clostridium* à des cellules intestinales d'embryon humain.

2 Objectifs

Le comportement des œufs de Nématodes dans l'environnement a été analysé à travers l'étude des phénomènes d'adhésion sur végétaux avec l'œuf *d'Ascaris suum* par différents auteurs (Ayres *et al.*, 1992; Ambolet & Schwartzbrod, 1996; Gaspard & Schwartzbrod, 1997). Par ailleurs, si Gaspard (1995) met en évidence des propriétés d'hydrophilie pour les œufs d'*Ascaris* en testant leur capacité d'adhésion sur support hydrophile, les informations sur leur comportement en milieu hydrophobe font défaut. Il était alors intéressant de rechercher les caractéristiques physiques de surface, et plus particulièrement leur potentiel d'hydrophobie.

Bien que de nombreuses méthodes soient répertoriées dans la bibliographie, aucune n'est applicable à l'étude des caractéristiques de surface de l'œuf d'*Ascaris*.

La mesure de l'angle de contact, qui nécessite un tapis cellulaire ou une surface homogène et plane, est inapplicable à une suspension d'œufs d'*Ascaris*. De même, le test TAS se réalisant par la détermination des concentrations en sel engendrant une autoagrégation, nécessite une suspension de microorganismes homogène et stable. Les œufs d'*Ascaris* d'une densité de 1,19 sédimentent, leur surface ne peut être caractérisée par cette méthode.

Nous avons sélectionné des tests adaptables à la morphologie et aux caractéristiques de l'œuf *d'Ascaris*. Nous avons choisi d'étudier les caractéristiques hydrophiles et/ou hydrophobes de la surface de l'œuf d'*Ascaris* par :

- une étude de l'adhésion sur support hydrophile avec de la poudre de verre borosilicatée,
- une mesure du potentiel d'hydrophobie avec le TAMH en utilisant 2 hydrocarbures qui sont l'hexadécane et l'octane,
- une comparaison des propriétés hydrophiles et hydrophobes avec des :
    - tests de partage de phase (Dextran et PEG)
    - tests d'adhésion sur des microsphères de sépharose et d'octyl-sépharose
    - tests d'adhésion sur des microsphères de latex hydrophiles et hydrophobes.

Les propriétés de surfaces ont été caractérisées sur plusieurs types d'œufs d'*Ascaris* :

- provenant de dissection de femelles adultes (œufs avec et sans couche externe),
- récupérés à partir de boues résiduaires contaminées (œufs avec couche externe).

Ces analyses ont pour but d'évaluer si la surface de l'œuf d'*Ascaris* présente des caractéristiques permettant à l'œuf de se fixer sur des végétaux ou sur des matières en suspension dans un milieu hydrique.

Enfin, une modification des caractéristiques de la surface de la couche externe de l'œuf lors de son développement, témoignerait d'une évolution dans le temps des propriétés de surface. Le risque pour la santé publique serait par conséquent évolutif et variable selon le stade embryonnaire ou larvaire de l'œuf.

3 Matériels et méthodes

3.1 Matériels

3.1.1 Outils

Cellule de comptage Sedgwick-Rafter 1 mL : Thomas Scientific *réf.* 9851020,
Cellule de comptage Mac-Master 2x0,150 mL: Poly Labo *réf.* 99520
Tubes 50 mL à fond conique en polypropylène Greiner® : Poly Labo *réf.* 210 261,
Tubes 50 mL à fond conique en polypropylène Nunc® : Poly Labo *réf.* 3-73660.

3.1.2 Vers d'*Ascaris*

Ils proviennent d'un abattoir de porc (Cooperl Lamballe Côtes d'Armor), les vers sont reçus dans un colis réfrigéré et sont traités dès leur arrivée.

3.1.3 Boues résiduaires

Les eaux résiduaires d'un abattoir de porc sont collectées dans une station d'épuration. Les œufs provenant des intestins de porcs parasités sont concentrés dans les boues lors de l'étape de sédimentation. Les boues déshydratées à 12,15% de MS sont contaminées à des concentrations variant de 45 à 83 œufs d'*Ascaris* par 10 grammes de MS. Elles sont utilisées pour obtenir des suspensions d'œufs avec couche externe.

3.1.4 Support hydrophile

La poudre de verre borosilicatée est constituée de verre Pyrex de type F-732-01 chargé négativement (Sovirel *réf.* 4585-10), sa granulométrie s'échelonne de 100 à 200 µm. Avant toute expérimentation, elle est lavée avec une solution saline de chlorure de sodium 1 M.

3.1.5 Composés hydrophobes

Quatre composés hydrophobes sont testés :

- *n*-octane (99 %, Prolabo *réf.* 26025-238)
- *n*-hexadécane (99 %, Aldrich *réf.* H670-3)
- chloroforme (99,5%, Merck *réf.* 1.02445.1000)
- acétate d'éthyle (99,5%, Aldrich *réf.* 11 002-7)

Lors de la détermination du caractère hydrophobe, nous utilisons une solution tampon PUM à base de phosphate, d'urée et de sulfate de magnésium (Rosenberg *et al.*, 1980., Hazen & Hazen, 1987; Rosenberg, 1991). Le nitrate de potassium permet d'annuler les charges électrostatiques présentes en solution (Bellon-Fontaine *et al.*, 1990).

Tampon PUM pH 7,1

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$.....22,2 g (Sigma *réf.* P-5504)
KH_2PO_4.....7,26 g (Sigma *réf.* P-0662)
Urée .....1,8 g (Sigma *réf.* U-5128)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$.....0,2 g (Sigma *réf.* M-1880)
Eau désionisée.....qsp 1 L

Tampon PUM et 0,1M KNO_3

KNO_3 .....10,11 g (Sigma *réf.* P-6162)
Tampon PUM.....qsp 1 L

Tampon PUM et 0,01M KNO_3

KNO_3 .....1,01 g
Tampon PUM.....qsp 1 L

3.1.6 Composés hydrophobes/hydrophiles

3.1.6.1 Test de partage de phase

Tampon Tris 0,03 M :

Tris(hydroxyméthyl)aminométhane.....0,364 g (Sigma *réf.* T-1503)
Eau désionisée.....qsp 100 mL

Bleu d'Alcian à 0,1%

Bleu d'Alcian.....10 mg (Sigma *réf.* 87GX A5268)
Eau désionisée.....qsp 10 mL

PEG 6000 à 4,40% (p/p) :

PEG 6 000 .....0,88 g (Prolabo *réf.* 26 603.293)
Tampon Tris 0,03 M .....qsp 20 mL

Dextran T500 à 6,20 % (p/p) coloré :

Dextran T500.....1,24 g (Pharmacia Biotech *réf.* 17-0320-01)
Bleu d'Alcian à 0,1%.....quelques gouttes
Tampon Tris 0,03 M .....qsp 20 mL

3.1.6.2 Chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophile en batch

Le test CIH est réalisé avec des microsphères hydrophobes d'octyl-sépharose et des microsphères hydrophiles de sépharose. La taille moyenne des particules est de 90 µm :

- microsphères à surface hydrophile : sépharose 4B (Pharmacia Biotech *réf.* 17-0120-01)

- microsphères à surface hydrophobe : octyl-sépharose CL-4B (Pharmacia Biotech *réf.* 17-0150-01) avec une densité du ligand de 40 $\mu M.mL^{-1}$ de gel.

La solution tampon pour le lavage des microsphères est à base de phosphate de sodium 50 mM, de sulfate d'ammonium 1,7 M et d'éthanol :

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	3,05 g (Sigma *réf.* S-8282)
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	5,42 g (Sigma *réf.* S-9390)
NaOH	40 g (Sigma *réf.* S-0899))
$(NH_4)_2SO_4$	224,7 g (Sigma *réf.* A-5132)
Ethanol	700 mL
Eau désionisée	qsp 1 L

La solution tampon pour les expérimentations est à base de phosphate de sodium 50 mM et de sulfate d'ammonium 1,7 M pour supprimer les interactions électrostatiques :

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	3,05 g (Sigma *réf.* S-8282)
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	5,42 g (Sigma *réf.* S-9390)
NaOH	40 g (Sigma *réf.* S-0899))
$(NH_4)_2SO_4$	224,7 g (Sigma *réf.* A-5132)
Eau désionisée	qsp 1 L

3.1.6.3 Test d'adhésion sur microsphères de latex hydrophiles et hydrophobes

3.1.6.3.1 Microsphères de latex

Les microsphères "Latex.IDC super-actifs" (Interfacial Dynamics Corporation) présentent une forte densité de groupes fonctionnels de surface. Les groupes sulfates (acide fort) assurent la stabilité des particules sur une large gamme de pH. La forte densité de groupes réactifs fournit un grand nombre de sites de fixation covalente, nous avons sélectionné :

- Microsphères hydrophobes de Latex.IDC de polystyrène super-actifs modifiés aldéhyde/sulfate (Surfactant-Free Navy Blue Aldéhyde/Sulfate Polystyrene Latex, Interchim)

- Microsphères hydrophiles de Latex.IDC de polystyrène super-actifs modifiées acide carboxylique (Surfactant-Free Yellow CML Polystyrene Latex, Interchim)

Les microsphères de latex hydrophiles à haute densité de charges de surface sont obtenues à partir des latex sulfates hydrophobes. Le procédé consiste à greffer des polymères d'acide carboxylique à la surface de la particule pour produire une couche de surface à très forte charge. Le groupe de surface prédominant est le carboxyle avec un nombre insignifiant de groupes sulfates.

Les caractéristiques des microsphères de latex sont regroupées dans le tableau n°41.

Tableau n°41 : Caractéristiques physico-chimiques des particules testées.

	Particules hydrophiles	Particules hydrophobes
Couleur	**jaunes**	**bleues**
Groupements fixés	carboxyles	aldéhydes et sulfates
Diamètre (moyenne ± écart-type)	1,9 ± 0,05 µm	2,0 ± 0,07 µm
Matière solide (%)	2,0 ± 0,1 g/100 mL	2,1 ± 0,1 g/100 mL
Nombre de particules/mL de gel	$5{,}3.10^9$	$4{,}8.10^9$
Aire de surface spécifique	$3{,}0.10^4$ cm^2.g^{-1}	$2{,}8.10^4$ cm^2.g^{-1}
Densité à 20°C	1,055 g.cm^{-2}	1,055 g.cm^{-2}
Présence de charge mesurée par conductimétrie	14,7 µEq.g^{-1} pour les carboxyles 2,7 µEq.g^{-1} pour les sulfates	3,4 µEq.g^{-1} pour les sulfates
Densité de charge de surface		11,4 µC.cm^{-2}
Groupes de carboxyles par particules	$3{,}4.10^7$	
Dépendance au pH	Oui hydrophobes à faible pH	Non

3.1.6.3.2 Préparation des solutions tamponnées et des détergents

✗ Solutions tamponnées

Nous utilisons du tampon PUM pH 7,1 (*cf.* 3.1.5 : Composés hydrophobes), ainsi que 4 autres tampons, dont la composition est indiquée dans le tableau n°42 :

du tampon citrate (pH 3 à 6),
du tampon phosphate (pH 6 à 8),
du tampon borax (pH 8 à 9).

Tableau n°42 : Volume des solutions acides et salines pour la préparation des solutions tamponnées à différents pH.

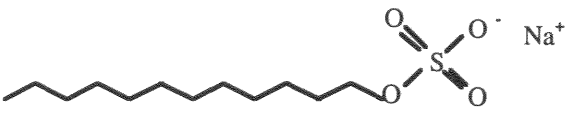
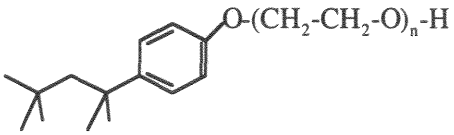
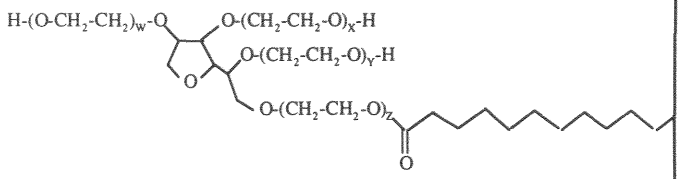
pH	Tampon citrate		Tampon phosphate		Tampon borax		Eau désionisée
	Acide citrique à 0,1M en mL	citrate de sodium à 0,1 M en mL	phosphate monosodique à 0,2M en mL	phosphate disodique à 0,2M en mL	acide borique à 0,2M en mL	borate de sodium à 0,05M en mL	en mL
3	9,30	0,70					10
4	6,60	3,40					10
5	4,10	5,90					10
6	1,90	8,30	8,77	1,23			10
7			3,90	6,10			10
8			0,53	9,47	5	0,50	14,5
9					5	5,90	9,1

✗ Solutions de détergents

Elles sont préparées dans du tampon PUM pour des solutions finales de :

- SDS à 0,1% (Prolabo *réf.* 27 926.238)
- Tween 20 à 1% et 0,1% (Sigma *réf.* P-7949)
- Triton à 1% et 0,1% (Sigma *réf.* X-100)

Tableau n°43 : Caractéristiques des détergents testés.

	Caractéristiques	Formule	
SDS ou Dodécyl sulfate de sodium	anionique à chaîne aliphatique	$C_{12}H_{25}NaSO_4$ M = 288,4	
Tween 20 ou Polyéthylène sorbitan à acide monolaurique	non-ionique aromatique	$C_{58}H_{124}O_{26}$ M = 1310	
Triton X-100	non-ionique à chaînes aliphatiques	$C_{34}H_{162}O_8$ M = 698	

3.1.6.3.3 Solutions salines

La présence de divers sels permet d'éliminer les charges électrostatiques. Du nitrate de potassium et du sulfate d'ammonium sont utilisés à différentes concentrations. Le choix des sels a été réalisé à partir de l'échelle représentée dans la figure n°30.

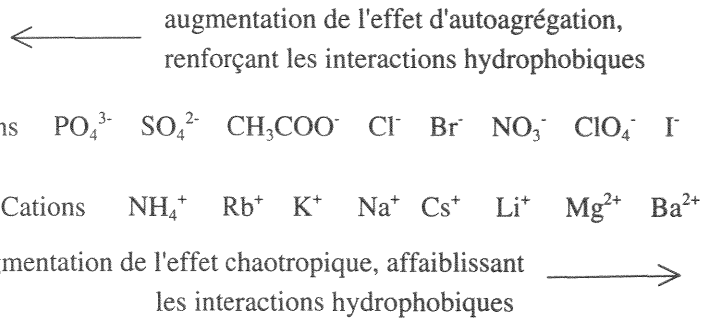


Figure n°30 : Réprésentation de la série de Hofmeister.

Dans un premier temps, le sulfate d'ammonium est sélectionné, car de faibles concentrations permettent d'éliminer les charges électrostatiques et de favoriser les interactions hydrophobes. Des solutions de 10 mL de

tampon PUM de pH 7,1 sont préparées contenant des concentrations variables de $(NH_4)_2SO_4$ avec des molarités s'échelonnant de 0,0 à 1,7M (Tableau n°44).

Tableau n°44 : Préparation des solutions de sulfate d'ammonium tamponnées.

Concentration (en M)	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,70
Solution mère (en mL)	0,00	1,47	2,94	4,41	5,88	7,35	8,82	10,00
Tampon PUM (en mL)	10,00	8,53	7,06	5,59	4,12	2,65	1,18	0,00

Dans un second temps, le nitrate de potassium est utilisé à des concentrations de 0,01M et 0,1M dans du tampon PUM. La préparation des solutions a été citée précédemment (*cf.* 3.1.5 : Composés hydrophobes).

3.2 Méthodes

3.2.1 Œufs d'*Ascaris*

3.2.1.1 *Obtention des œufs d'Ascaris par rinçage des vers*

Ce sont des œufs pondus par les femelles qui ont adhéré sur les cuticules des vers. Ils sont alors récupérés par rinçages successifs avec une solution saline isotonique à 0,9% de NaCl à partir d'un lot de vers. La suspension d'œufs d'*Ascaris* sans couche externe s'obtient en 6 étapes :

- Les œufs d'*Ascaris* provenant du rinçage sont concentrés par sédimentation de l'eau de rinçage pendant 2 heures dans des flacons à col large de 1 litre en polypropylène placés dans un bain de glace pour limiter le développement de microorganismes.
- Le surnageant est éliminé, tandis que le concentrat est rincé et centrifugé 3 fois dans de l'eau désionisée à 400*g* pendant 5 minutes.
- Le culot est remis en suspension dans de l'eau désionisée et filtré à travers un filtre Scrynel en polyester 102 µm.
- La suspension filtrée et centrifugée dans de l'eau désionisée à 400*g* pendant 5 minutes.
- Elle est mise en suspension dans une solution ATBF à 10%,
- Elle est numérée avec une cellule de Mac-Master, et stockée à 4°C.

3.2.1.2 *Obtention des œufs d'Ascaris par dissection*

Après la dissection des femelles pour récupérer l'appareil génital, l'utérus est fractionné en trois parties: une section proximale, une section centrale et une section distale (*cf.* Deuxième chapitre, 4.1.2.1 : Obtention des suspensions d'œufs d'*Ascaris*).

Pour obtenir des œufs sans couche externe, une suspension d'œufs de la section distale est mise en contact avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5° chlorométrique soit 1,60 $g.mL^{-1}$ de chlore libre, pour éliminer la couche externe. La suspension est ensuite rincée 3 fois avec une solution de NaCl à 1M suivie de centrifugations à 660*g* pendant 5 minutes.

3.2.1.3 *Obtention des œufs d'Ascaris à partir de boues résiduaires contaminées*

Un échantillon de 5 kg de boue résiduaire fortement contaminée en œufs d'*Ascaris* est utilisé dans le but de récupérer des œufs pour les expérimentations. Les œufs des parasites sont extraits selon le protocole EPA modifié.

La boue est mixée et tamisée puis subit une flottation et une séparation par une solution diphasique. Le protocole de purification-concentration est réalisé 60 fois pour extraire les œufs des 5 kg de matière première. Le protocole est le suivant :

Une quantité de boues correspondant à 10 g de matière sèche est mixée 20 secondes à 22 000 RPM
avec un Broyeur Waring Blendor avec 200 mL d'eau désionisée
⇓
filtration sur tamis de 160 µm et sédimentation de 3 heures
⇓
aspiration du surnageant avec une trompe à vide
récupération du sédiment dans 1 flacon de 450 mL à centrifuger
centrifugation à 400*g* pendant 5 min
⇓
remise en suspension du culot avec 150 mL de $ZnSO_4$ (d=1,3)
repos de 10 min., puis centrifugation à 400*g* pendant 5 min.
⇓
récupération du surnageant dans 500 mL d'H_2O et sédimentation de 3 h
⇓
aspiration avec une trompe à vide du filtrat et récupération du sédiment dans 1 tube de 50 mL
centrifugation à 480*g* pendant 5 min.
⇓
ajout de 15 mL de solution acide-alcool et de 10 mL d'éther éthylique
remise en suspension par agitation mécanique et centrifugation à 660*g* pendant 5 min.
⇓
obtention de 3 phases : une phase aqueuse au fond du tube
une phase étherée en surface
et une interface en forme d'anneau composé des débris
⇓
aspiration avec une trompe à vide de la phase étherée, de l'anneau de débris et de la phase aqueuse
⇓
regroupement des culots et numération de la suspension sur cellule de Mac-Master.

3.2.1.4 Titrage des suspensions d'œufs d'Ascaris

Pour les 3 types de suspension d'œufs d'*Ascaris*, nous réalisons juste avant l'expérimentation, un titrage de la suspension sur cellule Mac-Master dont le volume de lecture est de 2×150 µL. La concentration est exprimée en nombre d'œufs/mL.

3.2.2 Etude du caractère hydrophile

Une suspension d'œufs de concentration connue est mise en contact avec de la poudre de verre borosilicatée. Après un temps de contact déterminé,

- Les œufs n'ayant pas adhéré sont éliminés par rinçages successifs de la poudre avec une solution saline, et sont concentrés par centrifugation pour être numérés.

- Les œufs ayant adhéré subissent une étape de désorption avec une solution d'hypochlorite de sodium. Après la désorption, le protocole précédemment décrit pour les œufs n'ayant pas adhéré est effectué.

3.2.2.1 Réalisation de témoins d'adhésion au tube

0,5 mL de suspension d'œufs de concentration connue + 9,5 mL de NaCl 1M, à pH neutre

⇓

agitation au vortex pendant 1 min.

⇓

temps de contact de 1 heure avec agitation douce au vortex (puissance 2)

⇓ ⇓

ajout de 100 µL H_2O | ajout de 100 µL d'hypochlorite de sodium pour une concentration finale de 1,60 $g.L^{-1}$ de chlore libre

⇓ ⇓

Obtention d'œufs **avec** couche externe | Obtention d'œufs **sans** couche externe

⇓

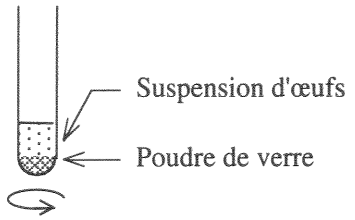
temps de contact de 10 min. avec une agitation douce au vortex (puissance 2)

⇓

centrifugation 10 min. à 700*g* et numération des œufs du culot sur cellule de comptage

3.2.2.2 Etude de l'adhésion des œufs à la poudre de verre

0,5 mL de suspension d'œufs de concentration connue
+ 9,5 mL de la solution saline acide ou basique + 0,2 g de poudre de verre
agitation au vortex (puissance 8) pendant 1 min.



⇓

temps d'adhésion variable de 15 à 60 min. avec agitation légère toutes les 5 min.
avec un vortex (puissance 2) pendant 20 s.

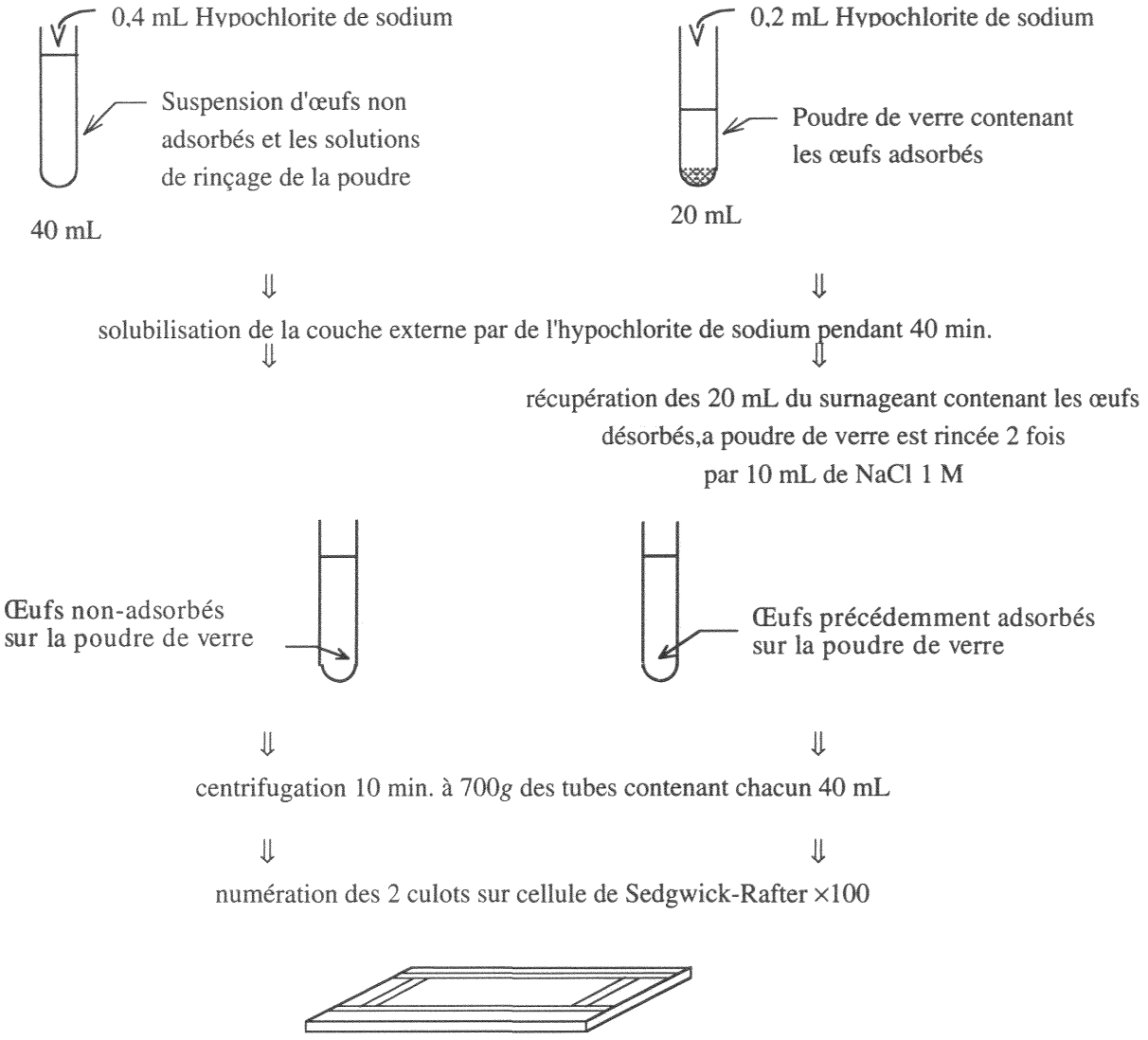
⇓

séparation du surnageant et de la poudre de verre

⇓

Pour récupérer les œufs n'ayant pas adhéré:
Surnageant (10 mL) et les 3 liquides de rinçage de la poudre de verre avec 3×10 mL de NaCl 1M sont réunis avec de 0,4 mL de NaOCl

Pour récupérer les œufs ayant adhéré :
La poudre de verre est transférée dans un second tube avec 20 mL de solution de NaCl 1 M et 0,2 mL de NaOCl



3.2.3 Etude du caractère hydrophobe

3.2.3.1 Protocole du test d'adhésion aux hydrocarbures

Le test d'adhésion des microorganismes aux hydrocarbures doit être adapté aux œufs d'*Ascaris*. La concentration bactérienne se déterminant par une lecture d'absorbance, il est impossible de procéder de façon identique pour des organismes de densité supérieure à 1.

suspension d'œufs de concentration connue dans 2,5 mL de tampon PUM (*cf.* 3.1.5)
⇓
addition de 1 mL d'hydrocarbure
⇓
agitation 120 s. puis repos 5 min.
⇓
aspiration de la phase organique et de l'interface (2 mL)
⇓
centrifugation de la phase aqueuse à 700*g* pendant 10 min.
et lecture du culot sur une cellule de Sedgwick-Rafter ×100

Des tubes contrôles sont réalisés pour chaque expérimentation, l'hydrocarbure est remplacé par du tampon PUM. Cette mesure permet d'estimer l'adhésion des œufs à la surface du tube.

Le pourcentage d'œufs adhérant aux émulsions d'hydrocarbures par des interactions hydrophobes est calculé par examen microscopique sur cellule de comptage avec :

$$A\ \% = [(nt - ne) / nt\ ] \times 100$$

où *A* est le potentiel d'hydrophobie exprimé en pourcentage représentant l'adhésion des œufs sur les émulsions,
nt est le nombre d'œufs présents dans la suspension témoin (après agitation),
ne est le nombre d'œufs présents dans la phase aqueuse (après agitation).

Lors de la numération, nous avons différencié 2 populations d'œufs :
- des œufs avec seulement une paroi composée de l'intérieur vers l'extérieur d'une couche lipidique, d'une couche chitineuse et d'une membrane vitelline,
- des œufs avec une paroi et une couche externe. Cette différenciation devrait permettre d'évaluer une éventuelle différence de distribution dans les phases aqueuse ou hydrophobe, en fonction de la présence ou de l'absence de cette couche externe.

3.2.3.2 Test statistique

Pour comparer la distribution des moyennes obtenues, un test de Kolmogorov-Smirnov est effectué sur les données. Les différences existant entre les distributions de fréquences relatives cumulées de deux échantillons sont calculées. Nous vérifions ensuite si la plus grande de ces différences (D_{obs}) est le fait de fluctuations fortuites d'échantillonnage ou non.

Deux hypothèses H_0 et H_1 sont émises :

⇒ H_0 les fréquences relatives cumulées des 2 distributions sont égales avec $f_{rel.cum.}(x_{i1})=f_{rel.cum.}(x_{i2})$,
⇒ et H_1 les fréquences relatives cumulées des 2 distributions sont différentes avec $f_{rel.cum.}(x_{i1})\neq f_{rel.cum.}(x_{i2})$.

H_0 est rejetée lorsque $n_1 n_2 D_{obs} \geq n_1 n_2 D_{_}$, il existe alors une différence significative entre les 2 distributions au risque α choisi.

3.2.4 Etude du caractère amphiphile

3.2.4.1 Test de partage de phase

3.2.4.1.1 Protocole de préparation des gels

Le test se réalise à température ambiante, avec du PEG 6000 et du dextran T500 :

- 20 mL de PEG 6000 à 4,40% (p/p) dans du tampon Tris 0,03 M (*cf.* 3.1.6.1 : Test de partage de phase),
- 20 mL de dextran T500 à 6,20% (p/p) dans du tampon Tris 0,03 M contenant 2 gouttes d'une solution de bleu d'Alcian à 0,1% (*cf.* 3.1.6.1).

Les gels sont préparés la veille avec une homogénéisation par agitation magnétique à 4°C pendant une nuit.

3.2.4.1.2 Protocole du test de partage de phase

Une quantité de 250 œufs est ajoutée au gel hydrophile (dextran 1,5 mL) et au gel hydrophobe (PEG 6000 1,5 mL), tous deux de densité 1,00 (Figure n°31). Après une agitation de 60 secondes au vortex (puissance maximum), l'échantillon est laissé au repos 5 minutes jusqu'à séparation de 2 phases. Le dénombrement des œufs est réalisé sur chacune d'entre elles ainsi qu'à l'interface :

1. phase supérieure (phase hydrophobe) contenant le PEG 6000
2. phase inférieure bleue (phase hydrophile) contenant le dextran T500
3. phase intermédiaire ou interface

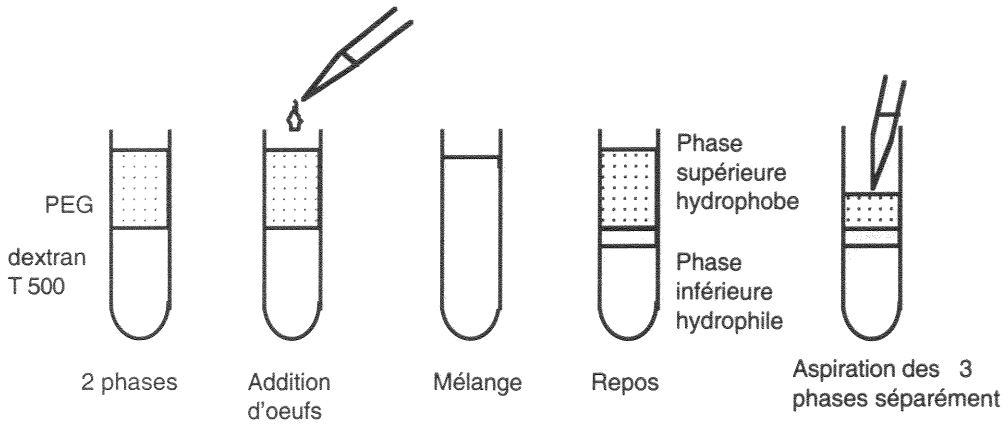


Figure n°31 : Protocole expérimental de séparation des œufs par le test de partage de phase.

Chacune des 3 phases d'un volume d'environ 1 mL est mise dans une cellule de comptage Sedgwick-Rafter, afin de quantifier la totalité des œufs d'*Ascaris* présents.

3.2.4.2 Chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophile en batch

3.2.4.2.1 Protocole de lavage et de préparation du gel

Le gel formé de microsphères de sépharose ou d'octyl-sépharose est lavé avec 10 volumes d'eau désionisée. Sur le gel décanté, nous ajoutons une solution tampon à base de phosphate, sulfate d'ammonium et d'éthanol (*cf.*

3.1.6.2 : Chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophile en batch), à raison de 25% de tampon pour 75% de gel décanté.

Au moment de l'utilisation, nous effectuons des lavages successifs sur 10 mL de gel décanté avec les solutions présentées dans le tableau n°45.

Tableau n°45 : Protocole de lavage des microsphères de sépharose et d'octyl-sépharose.

Volume (mL)	Solution
30	NaOH 1M pendant 4 heures
30	eau désionisée jusqu'à obtention d'un pH 7
30	tampon phosphate, sulfate d'ammonium, éthanol
30	éthanol à 70%
30	tampon phosphate, sulfate d'ammonium, éthanol

3.2.4.2.2 Protocole de chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophile en batch

Les œufs d'*Ascaris* étant de taille trop importante, les expérimentations ne peuvent se faire sur une colonne, car les effets stériques seraient conséquents. Les œufs ont donc été mis en contact directement avec le gel formé par les microsphères de sépharose ou d'octyl-sépharose en suspension.

A 3 mL de tampon (*cf.* 3.1.6.2), nous ajoutons 0,5 mL de gel décanté et 0,2 mL de suspension d'œufs (Figure n°32). Après agitation douce de 5 minutes, 5 rinçages sont effectués avec le tampon. Pour chaque rinçage, le surnageant est aspiré après la sédimentation du gel, pour ne garder que les œufs ayant adhéré sur les microsphères de sépharose ou d'octyl-sépharose. Le volume final est de 1 mL en vue d'une lecture en cellule de Sedgwick-Rafter.

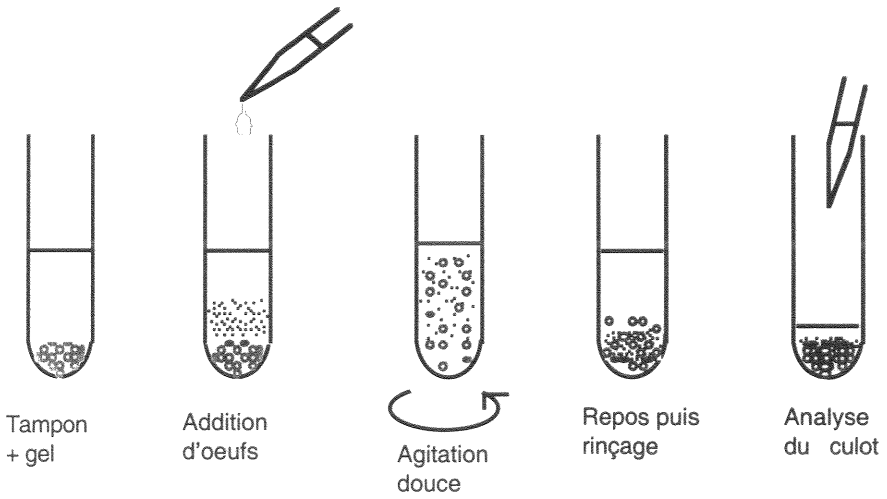


Figure n°32 : Protocole de l'adhésion des œufs d'*Ascaris* sur des microsphères de sépharose ou d'octyl-sépharose en batch.

3.2.4.3 Test d'adhésion sur des microsphères de latex hydrophobes et hydrophiles

Les suspensions d'œufs d'*Ascaris* sont mises en contact avec les microsphères jaunes hydrophiles et bleues hydrophobes (*cf.* 3.1.6.3.1 : Microsphères de latex) à raison de :

200 œufs d'*Ascaris* d'une suspension rincée dans du tampon PUM
+ 100 µL de suspension de microsphères bleues hydrophobes
+ 100 µL de suspension de microsphères jaunes hydrophiles
+ 1100 µL de tampon
⇩
agitation 5 min. au vortex à une puissance moyenne de 4
⇩
sédimentation pendant 10 min.
⇩
aspiration de 1,3 mL de solution en surface
⇩
3 lectures entre lame et lamelle de 20 µL au microscope grossissement ×400
pour définir le nombre de billes hydrophobes et hydrophiles adsorbées à la surface de l'œuf d'*Ascaris*.

La figure n°33 présente ce qui est visualisé au microscope. Les microsphères hydrophobes et hydrophiles sont numérées sur 20 œufs pour chacune des 3 lames réalisées. Une moyenne et un écart-type sont effectués sur le triplicata.

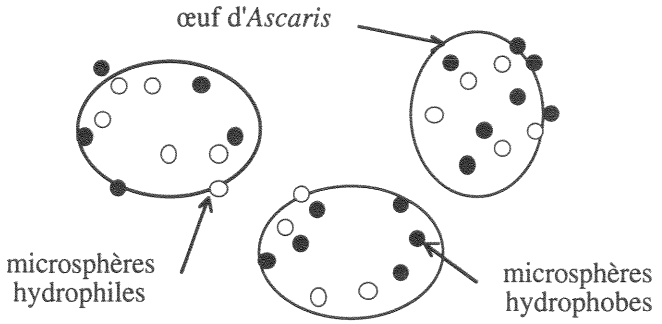


Figure n°33 : Représentation des œufs d'*Ascaris* après contact avec les microsphères de latex.

4 Résultats des études d'hydrophilie et d'hydrophobie de la surface des œufs d'*Ascaris*

4.1 Résultats des mesures de l'hydrophilie sur poudre de verre

Pour étudier les propriétés hydrophiles de la surface des œufs d'*Ascaris*, nous avons décidé d'effectuer des tests sur la poudre de verre borosilicatée. Ce composé de nature minérale a été choisi d'une part pour ses propriétés de surface, et d'autre part pour sa densité importante permettant une sédimentation rapide de la poudre.

Ce support a été utilisé par Gantzer *et al.* (1997) pour concentrer les entérovirus présents dans les eaux usées et par Gaspard *et al.* (1994) pour tester l'adhésion des œufs *d'Ascaris*.

4.1.1 Evaluation de l'adhésion au niveau des tubes

Nous avons remarqué lors des travaux préliminaires, que les œufs d'*Ascaris* adhèrent sur les tubes en polypropylène utilisés pour réaliser les expérimentations. Afin de quantifier ces pertes, nous avons réalisé des témoins d'adhésion sur la surface des tubes; les concentrations en œufs sont alors observées avant et après agitation.

Les pourcentages d'adhésion (Tableau n°46) déterminés selon les protocoles cités en 3.2.3.1. ont été obtenus à partir de 2 suspensions d'œufs. Elles proviennent de la dissection des sections distales des utérus (*cf.* 3.2.1.2) et titrent respectivement 400 et 1000 œufs/mL.

Tableau n°46 : Témoins d'adhésion pour 2 suspensions d'œufs avec une couche externe, avec et sans traitement à l'hypochlorite de sodium.

	Pourcentages d'œufs ayant adhéré au tube en polypropylène	
Suspension d'œufs	Sans NaOCl	Avec addition de NaOCl
A (n=3)	80,5	11,5
B (n=3)	81,8	7,0

Pour les deux suspensions d'œufs d'*Ascaris*, il est observé une adhésion à la surface des tubes, nous remarquons :

- En absence de NaOCl, nous avons en moyenne 81,15% des œufs d'*Ascaris* qui ont adhéré.
- En présence de NaOCl, nous avons en moyenne 9,25% des œufs d'*Ascaris* qui ont adhéré.

Nous observons une différence significative au seuil α de 0,05 (test de Kruskal-Wallis) entre les pourcentages d'adhésion en présence ou en absence d'hypochlorite de sodium. Nous devons tenir compte de cette différence lors des tests suivants en surchargeant en œufs les échantillons pour neutraliser les pertes dues aux adhésions à la surface des tubes.

4.1.2 Choix du matériel minimisant l'adhésion

Ayant démontré une adhésion à la surface des tubes, nous avons testé des tubes de 2 marques différentes pour mettre en évidence une éventuelle différence de comportement. Nous avons utilisé des tubes en polypropylène des marques Nunc® et Greiner® et 2 milieux différents (solution saline et eau désionisée).

Les analyses sont réalisées avec des œufs possédant une couche externe entière et intacte, provenant de la dissection des sections distales des utérus (*cf.* 3.2.1.2). Les résultats des expérimentations réalisées en triplicata sont regroupés dans le tableau n°47.

Tableau n°47 : Tests d'adhésion sur les surfaces des tubes Nunc® et Greiner® avec une solution saline ou de l'eau désionisée.

Tube	Milieu	Pourcentage d'œufs ayant adhéré
Nunc®	NaCl 1M pH=7	65,9±6,7*%
Greiner®	NaCl 1M pH=7	26,5±6,2%
Greiner®	eau désionisée pH=5,5	23,7±3,4%

* : Moyenne ± écart-type

☞ Le pourcentage d'adhésion des œufs est important quelque soit le type de tube en polypropylène, il s'échelonne de 23,7±3,4% pour des tubes Greiner® à 65,9±6,7% pour les tubes Nunc®.

Les propriétés d'adhésion des œufs semblent varier selon la surface des tubes tous deux en polypropylène. Greiner® annonce une qualité "cristal haute performance", qui pourrait être synonyme d'une meilleure finition des surfaces.

☞ Concernant le choix de la solution d'expérimentation, le pourcentage d'adhésion à la surface des tubes Greiner® est de 26,5±6,2% dans une solution de NaCl 1M et de 23,7±3,4% dans de l'eau désionisée, nous n'observons pas de différence significative des pourcentages d'adhésion.

La surface des œufs possède donc des propriétés d'adhésion, dont il faut tenir compte d'une part lors des déterminations du titre de la suspension à utiliser, et d'autre part lors du choix de la concentration pour réaliser les expérimentations.

Les tests d'adhésion seront donc systématiquement réalisés avec des tubes à centrifuger Greiner® en polypropylène. L'eau désionisée sera utilisée comme liquide de dilution.

4.1.3 Adhésion sur support hydrophile : la poudre de verre

Dans le but d'étudier l'adhésion des œufs d'*Ascaris* sur la poudre de verre, nous avons envisagé dans un première partie les facteurs intervenant dans les propriétés de l'adhésion comme le temps de contact et le pH. Dans une seconde partie, nous avons recherché les éventuelles modifications des propriétés de l'adhésion en fonction des différents stades de maturation de l'œuf.

La suspension d'œufs est obtenue à partir de la dissection de sections distales d'utérus, les œufs possèdent une couche externe. Les analyses ont été réalisées en triplicat (*cf.* 3.2.2.2 : Etude de l'adhésion des œufs à la poudre de verre).

4.1.3.1 Etude des paramètres pH et temps

4.1.3.1.1 Variation du pH

Le pH affecte fortement les caractéristiques de distribution des charges de surface et de la charge nette totale, il est par conséquent associé aux propriétés d'adhésion.

Les tests seront effectués à différents pH pour jouer sur les charges électrostatiques :

- à pH acide, les H^+ présents neutralisent les charges des groupements de surface et donnent une densité de charge positive, accentuant l'attraction pour les surfaces chargées négativement.
- au point isoélectrique, la densité de charge est nulle, les interactions électrostatiques s'annulent. Le point isoélectrique se détermine pour des macromolécules par mobilité électrophorétique, mais pour une surface complexe et hétérogène comme celle étudiée, nous ne pouvons déterminer le pH isoélectrique; le pH neutre sera donc choisi comme pH proche du point isoélectrique.
- à pH basique, la densité de charge est négative, accentuant l'attraction pour les surfaces chargées positivement.

Les expérimentations sont conduites à trois pH 1, 7 et 10, qui sont atteints en utilisant soit de l'acide sulfurique 0,1N, soit de la soude à 0,1 mM. Les résultats sont représentés dans la figure n°34.

☞ L'adhésion varie en fonction du pH, si nous comparons les données pour un temps de 15 minutes, l'adhésion est supérieure à pH acide avec un taux de fixation de 92,7±1,9%, par rapport aux pH neutre et basique, où les pourcentages sont respectivement de 69,2±4,9% et 76,3±6,4%.

3. Pour les pH de 7 et de 10, nous n'observons pas de différence significative (au seuil de 0,05) entre les pourcentages de fixation.

4.1.3.1.2 Variation du temps de contact

Nous avons également fait varier le temps de contact de 15 à 60 minutes. La figure n°34 rassemble les résultats des pourcentages moyens d'adhésion sur support hydrophile d'une suspension d'œufs avec couche externe.

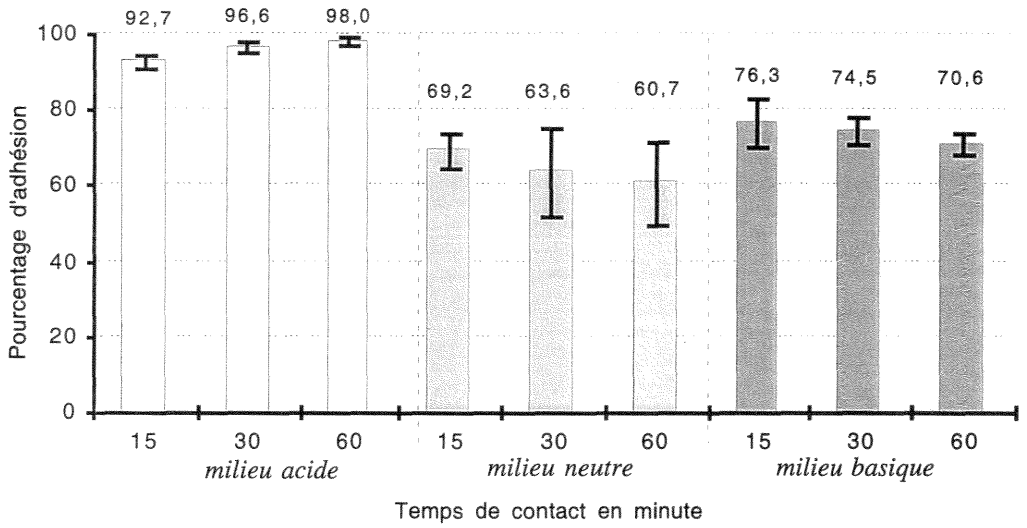


Figure n°34: Adhésion des œufs d'*Ascaris* sur poudre de verre à pH et temps de contact différents.

☞ L'adhésion est un phénomène rapide. Au bout de 15 minutes les œufs sont fixés au support, avec aucune différence significative (au seuil de 0,05) entre les pourcentages sur des périodes de contact variant de 15 à 60 minutes.

L'adhésion est donc un phénomène rapide plus important à pH acide avec 93% d'œufs fixés et seulement 77% à pH basique.

4.1.3.2 Influence du degré de maturation des œufs d'Ascaris

Pour démontrer le rôle de la couche externe dans les propriétés d'adhésion, nous effectuons des tests d'adhésion avec des œufs prélevés à différents niveaux de maturation :

- dans les oviductes juste avant la fécondation, ces œufs possèdent en surface une membrane vitelline,
- à l'entrée de l'utérus (ou partie proximale), les œufs sont alors fécondés, la coque de l'œuf se durcit, les couches chitineuse et lipidique apparaissent sous la membrane vitelline,
- dans la partie distale de l'utérus, l'œuf s'entoure de sécrétions utérines qui forment la couche externe visqueuse de l'œuf.

Pour ces expérimentations réalisées en triplicata (*cf.* 3.2.2.2 : Etude de l'adhésion des œufs à la poudre de verre), 3 suspensions d'œufs à divers niveaux de maturation ont permis de déterminer les œufs ayant adhéré et les œufs n'ayant pas adhéré à la poudre de verre. Des tubes témoins donnent le nombre d'œufs en absence de poudre de verre. La figure n°35 représente les moyennes et écarts-types pour ces 3 expérimentations.

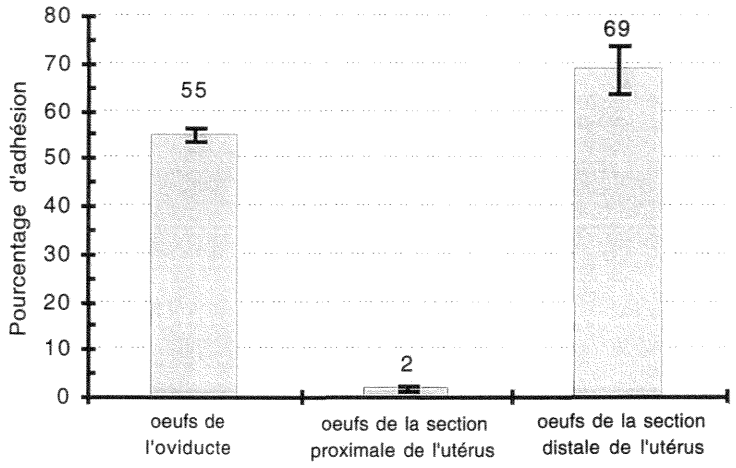


Figure n°35 : Adhésion sur la poudre de verre des œufs d'*Ascaris* selon leur degré de maturation

☞ Les œufs récupérés dans les oviductes ont une capacité d'adhésion moyenne avec un pourcentage proche de 50%, les propriétés d'hydrophilie sont donc peu marquées.

☞ La seconde expérimentation correspondant à des œufs fécondés dans la partie proximale de l'utérus, indique un pourcentage très faible d'adhésion (2%), témoignant de la présence d'un caractère hydrophobe marqué.

La fécondation transforme les propriétés de surface de l'œuf bien que les 2 couches nouvellement acquises (chitineuse et lipidique) soient disposées sous la membrane vitelline et non en surface.

☞ Pour la troisième expérimentation avec des œufs provenant de la partie distale de l'utérus, un pourcentage d'adhésion proche de 70% indiquerait l'apparition des propriétés de surface hydrophiles qui pourraient être rattachées à la présence de la couche externe.

4.2 Résultats des mesures de l'hydrophobie

Nous avons démontré que les œufs adhèrent aux tubes en polypropylène, de plus les œufs de la section proximale de l'utérus semblent avoir un caractère hydrophobe marqué, il nous a donc paru intéressant d'étudier les propriétés d'hydrophobie de surface des œufs. Des tests d'hydrophobie ont été réalisés avec le test TAMH effectué sur des émulsions de solvants apolaires (Rosenberg, 1991; Rosenberg *et al.*, 1980), le test a été modifié pour être appliqué aux œufs de Nématodes.

L'adhésion aux émulsions d'hydrocarbure peut être accrue par les propriétés acido-basiques et électrostatiques qui se cumulent aux propriétés d'hydrophobie. Pelletier *et al.* (1997), étudiant le caractère basique d'un lactobacille, réalisent des tests d'adhésion sur des émulsions de chloroforme (solvant polaire). De même, Bellon-Fontaine *et al.* (1990) utilisent du chloroforme et de l'acétate d'éthyle pour évaluer les propriétés acido-basiques intervenant dans l'adhésion et du nitrate de potassium à 0,1M pour déterminer les propriétés électrostatiques.

⇒ Dans une première partie, nous allons nous attacher à tester 2 hydrocarbures (hexadécane et octane) sur plusieurs types d'œufs provenant :

- du rinçage de la cuticule de vers adultes, soit des œufs récupérés après la ponte,
- de l'extraction à partir de boues, soit des œufs récupérés après séjour dans l'environnement,
- de la dissection de vers adultes, soit des œufs récupérés avant la ponte.

L'objectif est de déterminer les pourcentages d'hydrophobie pour chacun des 3 types d'œufs et de rechercher si la présence de cette couche externe modifierait les propriétés de surface, comme l'avaient indiquées les expérimentations précédentes.

⇒ Dans une seconde partie, la présence d'interactions électrostatiques et acido-basiques est étudiée, d'une part par addition de nitrate de potassium qui neutralise les charges électrostatiques et d'autre part en remplaçant l'hydrocarbure par du chloroforme ou de l'acétate d'éthyle, ce qui permet la mise en évidence de propriétés acido-basiques.

4.2.1 Test d'adhésion des œufs d'*Ascaris* aux hydrocarbures

4.2.1.1 Suspensions d'œufs d'Ascaris récupérés après la ponte

4.2.1.1.1 Pourcentage d'hydrophobie des œufs récupérés après la ponte

Deux séries de tests sont réalisées sur 2 suspensions d'œufs possédant une couche externe :

- la 1ère série avec une suspension d'œufs stockée à -20°C,
- la 2de série avec une suspension d'œufs fraîchement émis.

Les tests ont été effectués en utilisant l'octane (20 essais) et l'hexadécane (10 essais) pour évaluer le pourcentage d'hydrophobie avec ces 2 hydrocarbures. Les contrôles ont permis de déterminer les phénomènes d'adhésion à la surface des tubes.

✗ Suspension d'œufs stockés à -20°C

Les résultats des tests réalisés avec de l'octane (10 essais) et de l'hexadécane (10 essais) sont regroupés dans le tableau n°48.

Tableau n°48 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane et d'hexadécane obtenus sur une suspension d'œufs stockée à -20°C.

Suspension d'œufs stockée à -20°C	Tube témoin (n_1=5)	Essai (n_2=10)	Essai (n_3=10)
	Tampon PUM	*n*-Octane	*n*-Hexadécane
Nombre théorique d'œufs	250	250	250
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	202,5±24,3[a]	56,9±7,1	115,4±13,7
A % (potentiel d'hydrophobie)	0%	71,9±3,5%	43,0±6,9%

[a] : moyenne ± écart type

☞ Les concentrations théoriques de 250 œufs et les concentrations réellement observées pour les 5 tubes témoins (202,5±24,3) sont différentes, avec une perte d'environ 20% des œufs sur la surface du tube et sur le matériel de prélèvement.

Le pourcentage de perte de 20% correspond au pourcentage déterminé lors des tests d'adhésion effectués sur la surface des tubes Greiner®, le pourcentage étant de 23,7±3,4% (*cf.* 4.1.2).

☞ Le potentiel d'hydrophobie est important avec 71,8±3,5% des œufs ayant adhéré à la surface des émulsions d'octane et 43,0±6,9% des œufs ayant adhéré avec les émulsions d'hexadécane.

Les analyses réalisées sur les émulsions d'octane donnent un potentiel d'hydrophobie supérieur comparé au pourcentage obtenu avec les émulsions d'hexadécane. Les tests suivants seront effectués uniquement en utilisant l'octane.

✗ Suspension d'œufs fraîchement émis

Les résultats des tests regroupés dans le tableau n°49, sont réalisés avec 10 essais à l'octane et 5 témoins sur une suspension d'œufs fraîchement excrétés par les vers, provenant de rinçage de la cuticule.

Tableau n°49 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane obtenu sur une suspension d'œufs fraîchement émis.

Suspension d'œufs fraîchement émis	Tube témoin (n_4=5)	Essai (n_5=10)
	Tampon PUM	*n*-Octane
Nombre théorique d'œufs	290	290
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	187,5±21,3[a]	8,6±6,3
A % (potentiel d'hydrophobie)	0%	95,4±3,1%

[a] : moyenne ± écart type`

☞ Les concentrations théoriques par échantillons de 290 œufs et les concentrations réellement observées pour les 5 tubes témoins (187,5±21,3 œufs) sont différentes, avec une perte de 30% des œufs sur la surface du tube hydrophobe et sur le matériel de prélèvement.

☞ Le potentiel d'hydrophobie est important avec 95,4±3,1% des œufs ayant adhéré à la surface des émulsions d'octane.

Le potentiel d'hydrophobie déterminé par le pourcentage d'œufs ayant adhéré aux émulsions d'octane varie de 71,8±3,5% à 95,4±3,1% selon que la suspension d'œufs ait été congelée ou qu'elle soit utilisée immédiatement après la récupération des œufs d'*Ascaris* sur la cuticule des vers. La congélation modifie les propriétés de surface des œufs d'*Ascaris*, le potentiel d'hydrophobie semble diminuer avec ce mode de conservation.

4.2.1.1.2 Distribution des œufs avec couche externe

La nature physico-chimique de la couche externe pourrait favoriser le déplacement de l'œuf préférentiellement dans la phase aqueuse ou hydrophobe. Afin d'analyser les propriétés d'hydrophobie de cette couche externe, nous déterminons le pourcentage d'œufs (possédant cette structure) dans la phase aqueuse. Une modification de ce pourcentage d'œufs après la formation des émulsions d'hydrocarbure suggèrerait des propriétés de surface différentes selon que l'œuf possède ou non cette structure.

Dans la suspension stockée à -20°C, 68,1% des œufs possèdent une structure complète, c'est-à-dire qu'ils sont munis d'une couche externe recouvrant la coque (Tableau n°50).

Tableau n°50 : Pourcentage moyen d'œufs avec couche externe retrouvés dans la phase aqueuse pour les essais à l'octane et à l'hexadécane.

Suspension d'œufs stockée à -20°C	Suspension initiale	Tube témoin (n_1=5)	Essai (n_2=10)	Essai (n_3=10)
		Tampon PUM	*n*-Octane	*n*-hexadécane
Pourcentage moyen d'œufs avec une couche externe	68,1[a]%	56,9±4,7[b]%	61,2±5,2[b]%	58,2±4,4[b]%
Test de Kolmogorov-Smirnov			$n_1n_3D_\alpha = 40$ $n_1n_3D_{obs} = 20$	$n_1n_2D_\alpha = 40$ $n_1n_2D_{obs} = 15$

[a] : Pourcentage déterminé sur un dénombrement de 200 œufs.

[b] : Pourcentage déterminé sur la totalité des œufs présents dans la phase aqueuse après l'expérimentation.

☞ Pour les témoins, le pourcentage d'œufs avec une couche externe est de 56,9±4,7%. Avec l'hydrocarbure, le pourcentage d'œufs avec la couche externe dans la phase aqueuse est de 61,2±5,2% pour le test avec l'octane et de 58,2±4,4% pour le test avec l'hexadécane.

☞ Un test de comparaison des moyennes a été effectué entre les 5 témoins et les 2 séries de 10 essais. Le test de Kolmogorov-Smirnov au risque α de 0,05 donne un $n_1n_{2\text{-}3}D_\alpha$ de 40. En comparant les 5 témoins aux 10 essais du test à l'octane, puis aux 10 essais du test à l'hexadécane, nous obtenons 2 valeurs de $n_1n_2D_{obs}$ et $n_1n_3D_{obs}$ inférieures à la valeur seuil de $n_1n_{2\text{-}3}D_\alpha$.

Il n'a donc pas été démontré de différence significative entre les distributions des pourcentages d'œufs avec une couche externe selon le type de phases aqueuses ou hydrophobes.

4.2.1.2 Suspensions d'œufs récupérés à partir de boues

4.2.1.2.1 Pourcentage d'hydrophobie avec des œufs récupérés de boues

Une suspension d'œufs est obtenue à partir d'une boue résiduaire (*cf.* 3.2.1.3). Pour cette étude, le protocole TAMH est effectué sur 6 témoins et 20 expérimentations avec de l'octane uniquement. Les résultats figurent dans le tableau n°51.

Tableau n°51 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane obtenu pour des suspensions d'œufs extraits de boues résiduaires.

Suspension d'œufs récupérés à partir de boues	Tube témoin (n_6=6)	Essai (n_7=20)
	Tampon PUM	*n*-Octane
Nombre théorique d'œufs	220	220
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	158,6±10,0[a]	42,0±6,9
A % (potentiel d'hydrophobie)	0%	73,5±4,3%

[a] : moyenne ± écart type

☞ Le potentiel d'hydrophobie est de 73,5±4,3% sur des œufs provenant de boues résiduaires avec des émulsions d'octane, ce qui montrerait le caractère hydrophobe de la surface des œufs d'*Ascaris*.

Toutefois, le potentiel d'hydrophobie de 73,5±4,3% déterminé avec des œufs d'*Ascaris* récupérés de boues est inférieur au potentiel d'hydrophobie de 95,4±3,1% obtenu avec des œufs d'*Ascaris* fraîchement émis provenant du rinçage des vers.

4.2.1.2.2 Distribution des œufs avec couche externe

Dans la suspension d'œufs récupérés de boues, 49,5% des œufs possèdent une structure complète avec une couche externe. Les pourcentages d'œufs avec couche externe retrouvés dans les phases aqueuses des témoins et des essais sont présentés dans le tableau n°52.

Tableau n°52 : Pourcentage moyen d'œufs avec couche externe retrouvés dans la phase aqueuse pour les essais à l'octane.

Suspension d'œufs récupérés à partir de boues	Suspension initiale	Tube témoin (n_6=6)	Essai (n_7=20)
		Tampon PUM	*n*-Octane
Pourcentage moyen d'œufs avec une couche externe	49,5[a]%	53,8±9,3[b]%	58,5±4,7[b]%
Test de Kolmogorov-Smirnov			$n_6n_7D_\alpha = 72$
			$n_6n_7D_{obs} = 30$

[a] : Pourcentage déterminé sur un dénombrement de 200 œufs.

[b] : Pourcentage déterminé sur la totalité des œufs présents dans la phase aqueuse après l'expérimentation.

☞ Après la formation des émulsions avec l'hydrocarbure, le pourcentage d'œufs avec couche externe retrouvé dans la phase aqueuse est de 58,5±4,7% pour le test avec l'octane. Pour les témoins avec l'eau désionisée, le pourcentage d'œufs avec une couche externe est de 53,8±9,3%.

Le test de Kolmogorov-Smirnov au risque α de 0,05 donne un $n_6n_7D_\alpha$ de 72. En comparant les 6 témoins aux 20 essais du test à l'octane, nous obtenons une valeur de $n_6n_7D_{obs}$ inférieure à la valeur seuil de $n_6n_7D_\alpha$.

☞ Il n'a donc pas été démontré de différence significative entre les distributions des populations d'œufs de la phase aqueuse des témoins et des essais à l'octane. Les œufs d'*Ascaris* avec couche externe ne se retrouvent donc pas préférentiellement dans la phase aqueuse.

4.2.1.3 Suspensions d'œufs d'Ascaris provenant de dissection

De nouveaux essais à l'octane sont réalisés avec 2 types d'œufs provenant :

- de la partie distale de l'utérus (avec couche externe développée),
- de la partie centrale de l'utérus (sans couche externe).

4.2.1.3.1 Pourcentage d'hydrophobie des œufs provenant de la partie distale de l'utérus

Les expérimentations sont effectuées avec une suspension d'œufs d'*Ascaris* provenant de la dissection de la partie distale de l'utérus. Les résultats sont regroupés dans le tableau n°53.

Tableau n°53 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane obtenu pour des suspensions d'œufs provenant de la partie distale de l'utérus.

Suspension d'œufs de la partie distale de l'utérus	Tube témoin (n_8=5)	Essai (n_9=10)
	Tampon PUM	*n*-Octane
Nombre théorique d'œufs	460	460
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	18,5±15,6[a]	9,0±7,1
A % (potentiel d'hydrophobie)		ND

[a] : moyenne ± écart type

ND : non déterminé

☞ Le pourcentage d'hydrophobie ne peut se calculer, les œufs ne sont pas retrouvés dans les tubes témoins. Ils ont adhéré sur la surface hydrophobe du tube et ne sont pas déplacés vers la phase hydrophobe de l'octane.

Leur couche externe est de nature gélatineuse, elle apparaît collante et fragile à l'observation microscopique. Les œufs d'*Ascaris* adhèrent immédiatement aux parois du tube, ne nous permettant pas de réaliser les expérimentations.

4.2.1.3.2 Pourcentage d'hydrophobie des œufs provenant de la partie centrale de l'utérus

Les expérimentations sont effectuées avec une suspension d'œufs d'*Ascaris* provenant de la dissection de la partie centrale de l'utérus. Le tableau n°54 donne les résultats.

Tableau n°54 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane obtenu pour des suspensions d'œufs provenant de la partie centrale de l'utérus.

Suspension d'œufs de la partie centrale de l'utérus	Tube témoin (n_1=5)	Essai (n_2=10)
	Tampon PUM	*n*-Octane
Nombre théorique d'œufs	410	410
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	6,2±12,3[a]	6,4±10,6
A % (potentiel d'hydrophobie)		ND

[a] : moyenne ± écart type

ND : non déterminé

4. Le pourcentage d'hydrophobie ne peut se calculer pour les mêmes raisons que précédemment, car les œufs ne sont pas retrouvés dans les tubes témoins, ils ont adhéré sur la surface du tube hydrophobe et ne sont pas déplacés vers la phase hydrophobe de l'octane.

4.2.2 Caractérisation des interactions électrostatiques et acido-basiques à la surface de l'œuf d'*Ascaris*

Les mesures sont réalisées avec des suspensions d'œufs d'*Ascaris* récupérés après la ponte (provenant de rinçage) ou extraits de boues résiduaires, en présence de nitrate de potassium permettant de neutraliser les charges de surface et de vérifier si l'adhésion est due aux charges électrostatiques.

De plus, l'adhésion des œufs à l'octane est comparée d'une part à l'adhésion sur acétate d'éthyle ($CH_3COOCH_2CH_3$) solvant monopolaire basique réagissant avec les groupements acides de surface, et d'autre part à l'adhésion sur chloroforme ($CHCl_3$) solvant monopolaire acide réagissant avec les groupements basiques de surface.

4.2.2.1 Caractérisation des interactions électrostatiques à la surface de l'œuf d'Ascaris

4.2.2.1.1 Suspension d'œufs récupérés après la ponte

Le tampon PUM est utilisé à 2 concentrations en KNO_3, selon Bellon-Fontaine *et al.* (1990) :

- 0,1M qui neutralise les charges électrostatiques,
- 0,01M, avec laquelle les charges électrostatiques sont encore présentes.

Les résultats des 10 témoins et des 20 expérimentations sont regroupés dans le tableau n°55.

Tableau n°55 : Interactions électrostatiques à la surface d'émulsions d'octane en présence de KNO_3 (0,1M et 0,01M) sur des d'œufs récupérés après la ponte.

Suspension d'œufs récupérés après la ponte	Témoin (n=10)	*n*-Octane (n=10)	*n*-Octane (n=10)
Nitrate de potassium	0,1M	0,01M	0,1M
Nombre théorique d'œufs	250	250	250
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	115,0±10,9[a]	15,1±8,8	22,3±6,3
A % (potentiel d'hydrophobie)	0%	86,8±7,6%	80,6±5,4%

[a] : moyenne ± écart type

☞ Les concentrations théoriques par échantillons de 250 œufs et les concentrations réellement observées pour les 10 tubes témoins (115,0±10,9 œufs) sont différentes, avec une perte de 54% des œufs sur la surface du tube hydrophobe et sur le matériel de prélèvement.

Nous avons une perte importante des œufs sur la surface des tubes qui serait liée à la structure de la couche externe. En effet, ces œufs n'ont pas subi le passage dans l'intestin de leur hôte, ils ressemblent aux œufs provenant de dissection. Leur couche externe, transparente et fragile, présente une texture gélatineuse et collante.

☞ Le potentiel d'hydrophobie est important avec 86,8±7,6% des œufs ayant adhéré à la surface des émulsions d'octane, en présence de 0,01M de KNO_3, c'est-à-dire lorsque les charges électrostatiques ne sont pas neutralisées. Il est de 80,6±5,4% lorsque nous avons une concentration de 0,1M de KNO_3, lorsque les charges électrostatiques sont neutralisées.

Nous ne déterminons pas de différence significative du potentiel d'hydrophobie quelque soit la concentration en KNO_3. L'adhésion aux émulsions d'octane ne serait pas la conséquence de forces électrostatiques, mais la conséquence des propriétés d'hydrophobie de surface de l'œuf d'*Ascaris*.

4.2.2.1.2 Suspension d'œufs récupérés à partir de boues

La même expérimentation que précédemment est répétée avec une suspension d'œufs récupérés à partir de boues. Les résultats sont regroupés dans le tableau n°56.

Tableau n°56 : Interactions électrostatiques à la surface d'émulsions d'octane en présence de KNO_3 (0,1M et 0,01M) sur des d'œufs récupérés à partir de boues.

Suspension d'œufs récupérés à partir de boues	Témoin (n=10)	*n*-Octane (n=10)	*n*-Octane (n=10)
Nitrate de potassium	0,1M	0,01M	0,1M
Nombre théorique d'œufs	250	250	250
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	177,4±23,5[a]	35,3±11,3	50,5±12,8
A % (potentiel d'hydrophobie)	0%	80,1±6,7%	71,5±7,2%

[a] : moyenne ± écart type

☞ Les concentrations théoriques par échantillons de 250 œufs et les concentrations réellement observées pour les 10 tubes témoins (177,4±23,5 œufs) sont différentes, avec une perte de 29% des œufs sur la surface du tube hydrophobe et sur le matériel de prélèvement.

☞ Le potentiel d'hydrophobie est conséquent avec 80,1±6,7% des œufs ayant adhéré à la surface des émulsions d'octane, en présence de 0,01M de KNO_3. Le pourcentage d'hydrophobie est de 71,5±7,2% lorsque les charges électrostatiques sont neutralisées.

Nous ne déterminons pas de différence significative du potentiel d'hydrophobie quelque soit la concentration en KNO_3. Les forces électrostatiques ne sont donc pas responsables de l'adhésion aux émulsions d'octane, l'adhésion serait principalement due aux propriétés d'hydrophobie de surface de l'œuf.

4.2.2.2 Caractérisation des interactions acido-basiques à la surface de l'œuf d'Ascaris

Une suspension d'œufs d'*Ascaris* récupérés après la ponte est mise en contact avec :

- des émulsions d'octane solvant apolaire,
- d'acétate d'éthyle solvant monopolaire basique
- de chloroforme solvant monopolaire acide.

4.2.2.2.1 Suspension d'œufs récupérés après la ponte

Les analyses sont effectuées avec une suspension d'œufs d'*Ascaris* récupérés après la ponte, par rinçage des vers adultes. Les résultats sont regroupés dans le tableau n°57.

Tableau n°57: Interactions acido-basiques à la surface d'émulsions d'octane en présence de KNO_3 (0,1M et 0,01M) sur des d'œufs récupérés après la ponte.

Suspension d'œufs récupérés après la ponte	Témoin (n=10)	*n*-Octane (n=10)	Chloroforme (n=10)	Acétate d'éthyle (n=10)
Nitrate de potassium	0,1M	0,1M	0,1M	0,1M
Nombre théorique d'œufs	250	250	250	250
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	115,0±10,9[a]	22,3±6,3	ND	31,5±7,3
A % (potentiel d'hydrophobie)	0%	80,6±5,4%	ND	72,6±6,3%

[a] : moyenne ± écart type

ND : non déterminé

☞ En présence de 0,1M de KNO_3, le potentiel d'hydrophobie est de 80,6±5,4% avec l'octane (solvant apolaire) et de 72,6±6,3% avec l'acétate d'éthyle (solvant monopolaire basique). Nous n'observons pas de différence significative entre les potentiels d'hydrophobie quelque soit le solvant utilisé.

Les forces et les propriétés acides de surface n'interviendraient pas dans les phénomènes d'adhésion.

☞ Le chloroforme solvant monopolaire acide n'a pu être utilisé dans les tests d'hydrophobie pour déterminer la présence de propriétés basiques dans les phénomènes de l'adhésion.

En effet, lorsque le solvant est ajouté au tampon PUM, $CHCl_3$ se situe dans la phase inférieure et non dans la phase supérieure comme avec l'octane ou l'acétate d'éthyle. Après l'étape d'agitation durant laquelle les émulsions se forment, les œufs d'*Ascaris* présents dans la phase aqueuse sédimentent au niveau de l'interface $CHCl_3$/Tampon PUM. Nous ne pouvons alors différencier les œufs ayant adhéré sur les émulsions des œufs n'ayant pas adhéré, sédimentant de la phase aqueuse à l'interface.

4.2.2.2.2 Suspension d'œufs récupérés à partir de boues

Les résultats des analyses réalisées avec une suspension d'œufs d'*Ascaris* provenant de boues résiduaires sont regroupés dans le tableau n°58.

Tableau n°58 : Interactions acido-basiques à la surface d'émulsions d'octane en présence de KNO_3 (0,1M et 0,01M) sur des d'œufs récupérés à partir de boues.

Suspension d'œufs récupérés à partir de boues	Témoin (n=10)	*n*-Octane (n=10)	Acétate d'éthyle (n=10)
Nitrate de potassium	0,1M	0,1M	0,1M
Nombre théorique d'œufs	250	250	250
Nombre d'œufs dans la phase aqueuse	177,4±23,5[a]	50,5±12,8	43,2±9,9
A % (potentiel d'hydrophobie)	0%	71,5±7,2%	75,6±5,8%

[a] : moyenne ± écart type

☞ En présence de 0,1M de KNO_3, le potentiel d'hydrophobie est de 71,5±7,2% avec l'octane (solvant apolaire) et de 75,6±5,8% avec l'acétate d'éthyle (solvant monopolaire basique). Nous n'observons pas de différence significative entre les potentiels d'hydrophobie quelque soit le solvant utilisé.

L'adhésion n'est donc pas due à des forces ou à des propriétés acides de surface.

4.3 Résultats des mesures de l'amphiphilie

Afin d'étudier le caractère amphiphile, nous avons effectué 3 types de tests différents :

- sur 2 gels hydrophile et hydrophobe, le test TPP ou technique de partage de 2 phases liquides associe le dextran et le PEG ou polyéthylène glycol.
- sur des microsphères de sépharose et octyl-sépharose, qui ont respectivement un caractère hydrophile et hydrophobe, ce test s'apparente à un test CIH (ou chromatographie d'interaction hydrophobe) en batch (Rosenberg & Doyle, 1990) avec l'utilisation des microsphères de sépharose sans groupement octyle comme témoin,
- sur 2 types de microsphères de latex en polystyrène, ce test est voisin du test d'adhésion à des solides hydrophobes réalisé sur microsphères en polystyrène (Hazen & Hazen, 1987).

4.3.1 Test de partage de 2 phases

Afin de mettre en contact 2 gels, l'un de nature hydrophile et l'autre de nature hydrophobe, le test TPP a été réalisé avec du dextran T500 et du polyéthylène glycol (PEG 6000) selon les modalités décrites par Sharpe (1988) et Stendahl *et al.* (1973).

Les analyses sont réalisées avec une suspension d'œufs d'une concentration théorique de 250 œufs, récupérés après la ponte (*cf.* 3.2.4.1.2 : Protocole du test de partage de phase). Les résultats de la détermination du nombre d'œufs par phase sont regroupés dans le tableau n°59.

Tableau n°59 : Partage des œufs d'*Ascaris* entre l'interface et les 2 phases.

	Nombre d'œufs (n=10)	Pourcentage du nombre d'œufs
Phase supérieure hydrophobe	23,4±17,7	11,2±8,5%
Interface	54,0±22,9	25,8±10,9%
Phase inférieure hydrophile	132,0±36,7	63,0±17,5%

☞ Les concentrations sont plus élevées dans la phase hydrophile avec 63,0±17,5% des œufs, comparés à la phase hydrophobe contenant en moyenne 11,2±8,5% des œufs. Au niveau de l'interface, nous retrouvons 25,8±10,9% des œufs. Ces résultats montrent que les œufs semblent posséder un caractère plus hydrophile qu'hydrophobe.

La vitesse de sédimentation des œufs d'*Ascaris* en eau désionisée est de 26 cm/h (Shuval *et al.,* 1986), les œufs sédimentent à raison de 2,16 cm en 5 minutes. Comme la densité des gels est proche de 1,00, il est difficile de savoir si le gradient observé est dû à la sédimentation des œufs dans la phase inférieure, ou s'il représente une caractéristique physique de la surface de l'œuf.

Devant ces résultats, nous avons essayé d'augmenter les concentrations en dextran et PEG, dans l'objectif d'augmenter la densité des 2 gels. Les concentrations maximales en gels, au delà desquelles les gels ne sont plus solubles, ne permettraient pas d'atteindre une densité suffisante :

- le PEG à 50% a une densité de 1,075
- le dextran à 33,3% a une densité de 1,115.

Les analyses à ces concentrations seraient inutiles, car les œufs ont une densité de 1,17 (David & Lindquist, 1982),

La technique utilisant 2 gels simultanément, le dextran T500 et le PEG 6000, ne permet pas de conclure sur un caractère hydrophile supérieur au caractère hydrophobe, la densité des gels n'étant pas suffisante pour s'affranchir des phénomènes de sédimentation.

4.3.2 Chromatographie d'interaction hydrophile et hydrophobe en batch

Le test CIH se réalise avec des microsphères hydrophobes d'octyl-sépharose, nous y avons adjoint l'utilisation de microsphères hydrophiles de sépharose afin de pouvoir comparer les caractères hydrophobe et hydrophile.

Ce test CIH est réalisé en batch et non en colonne de chromatographie, du fait de la taille des œufs d'*Ascaris* (55×40 µm) qui auraient été prisonniers des microsphères de taille comprise entre 45 et 165 µm.

Les œufs avec couche externe proviennent du rinçage des vers adultes, ils sont récupérés après la ponte. L'analyse est réalisée sur les 2 types de gels séparément avec 0,2 mL de la même suspension d'œufs d'*Ascaris* (*cf.* 3.2.4.2.2 : Protocole de chromatographie d'interaction hydrophobe et hydrophile en batch).

Le gel de sépharose sert de témoin d'adhésion sur des microsphères en absence de ligand, ainsi l'adhésion sur le gel d'octyl-sépharose permet d'évaluer les interactions hydrophobes entre les œufs et les ligands $CH_3(CH_2)_6$—.

Les moyennes des résultats sur les 12 analyses, pour chacun des 2 gels, sont regroupées dans le tableau n°60.

Tableau n°60 : Adhésion des œufs d'*Ascaris* sur des microsphères de sépharose et d'octyl-sépharose.

Microsphères	Propriétés	Nombre moyen d'œufs (n=12)
sépharose	hydrophile	34,4±11,3[a]
octyl-sépharose	hydrophobe	115,7±41,1

[a] : moyenne ± écart-type

☞ Dans la première série des expérimentations, nous avons comptabilisé en moyenne sur 12 tests 34,4±11,3 œufs ayant adhéré sur les microsphères de sépharose (surface hydrophile).
☞ Dans la seconde série des expérimentations, nous avons comptabilisé en moyenne sur 12 tests 115,7±41,1 œufs ayant adhéré sur les microsphères d'octyl-sépharose (surface hydrophobe).

Pour une même suspension d'œufs d'*Ascaris*, le nombre d'œufs ayant adhéré est supérieur lorsque nous utilisons un support hydrophobe. Le caractère hydrophobe semblerait plus important que le caractère hydrophile.

Ces conclusions sont toutefois sujettes à caution, car la technique ne semble pas adaptée. Il est difficile de numérer les œufs d'une taille de 55×40 µm ayant adhéré sur des microsphères de 90 µm, les microsphères peuvent masquer les œufs d'*Ascaris*.

De plus, la surface de contact n'est pas assez importante, les courbures de ces microsphères étant trop importantes pour permettre une adhésion avec de nombreux sites de liaisons. Des microsphères de plus grandes tailles pourraient offrir une plus grande surface d'adhésion mais le problème de la lecture serait toujours présent.

4.3.3 Test d'adhésion sur microsphères de latex hydrophiles et hydrophobes

Une suspension d'œufs d'*Ascaris* est mise en contact avec 1 suspension mixte de microsphères hydrophile et hydrophobe de 2 µm de diamètre, les microsphères de couleurs différentes présentes à la surface des œufs d'*Ascaris* sont comptabilisées par examen microscopique (*cf.* 3.2.4.3).

Nous avons utilisé des suspensions d'œufs :

- provenant de dissections des sections centrales d'utérus, sans couche externe

- provenant du rinçage des vers adultes, avec couche externe
- extraits de boues résiduaires, avec couche externe

Dans un premier temps, des essais sur des suspensions d'œufs avec et sans couche externe, permettent de tester différents tampons, de choisir une concentration optimale de particules, d'étudier l'adhésion en absence de charges électrostatiques ou en présence de détergent.

Dans un second temps, la surface des œufs provenant du rinçage de vers ou récupérés de boues résiduaires est étudiée.

4.3.3.1 Détermination du protocole expérimental

4.3.3.1.1 Détermination de la quantité de particules dans la suspension

Afin de déterminer la concentration optimale de particules à utiliser pour une distribution homogène à la surface de l'œuf d'*Ascaris*, une série de 4 dilutions au $10^{ème}$ est effectuée en cascades. La gamme s'étend de 5.10^4 à 5.10^9 particules dans 1 mL d'eau désionisée.

Les solutions trop concentrées provoquent des phénomènes d'agrégation ou de répulsion des microsphères entre elles, rendant les billes indénombrables. Les concentrations trop faibles donnent des taux d'adhésion aléatoires pour permettre une comparaison des moyennes.

☞ Avec des suspensions d'œufs provenant de dissection des sections centrales des utérus, et récupérés de boues résiduaires, seule la concentration de 5.10^7/mL permet une lecture. Les expérimentations sont donc réalisées avec :

- 0,1 mL d'une solution à 5.10^7 microsphères hydrophobes par mL,
- 0,1 mL d'une solution à 5.10^7 microsphères hydrophiles par mL.

☞ Avec des suspensions d'œufs provenant du rinçage des vers adultes, la concentration de microsphères titrant 5.10^8 particules/mL est choisie. Les expérimentations sont donc réalisées avec :

- 0,1 mL d'une solution à 5.10^8 microsphères hydrophobes par mL,
- 0,1 mL d'une solution à 5.10^8 microsphères hydrophiles par mL.

4.3.3.1.2 Choix du tampon

Le tampon permet de stabiliser les charges et de maintenir un pH constant. De plus, les pH très acides sont à éviter, car dans ces conditions les propriétés des microsphères hydrophiles se modifient en caractère hydrophobe. Par contre les propriétés des microsphères hydrophobes sont indépendantes du pH. Pour choisir un tampon, 4 solutions de pH 3 à 9 sont testées.

Sur 60 œufs provenant de dissection des sections centrales des utérus, les moyennes et les écarts-types calculés sur le nombre de microsphères adsorbées, sont représentés dans la figure n°36.

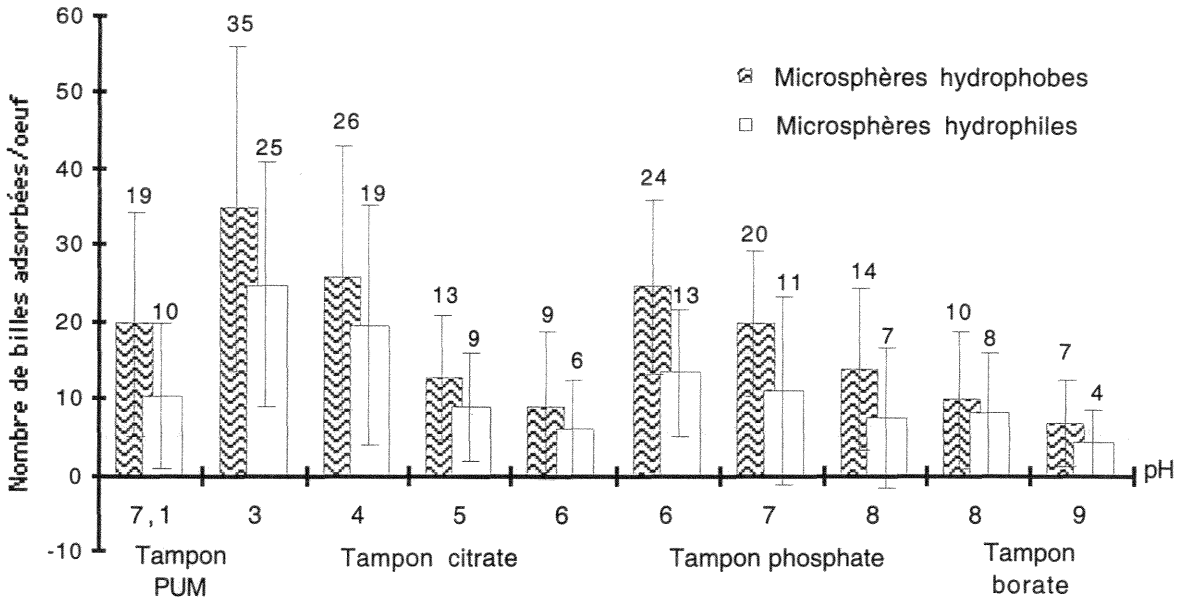


Figure n°36 : Adhésion des microsphères hydrophiles et hydrophobes à la surface des œufs en fonction du tampon.

☞ Nous remarquons que les moyennes ne sont pas significativement différentes car les écarts-types se chevauchent pour les différents tests quelque soit les microsphères de latex utilisées. Néanmoins, nous pouvons observer qu'il semblerait exister une variation du nombre de microsphères de latex adsorbées à la surface des œufs, qui serait fonction du pH, mais également du tampon.

Les propriétés de l'adhésion seraient plus fortes pour les microsphères hydrophobes quelque soit le pH, avec 17,4±8,4 microsphères hydrophobes adsorbées à la surface d'un œuf contre 11,1±6,0 microsphères hydrophiles adsorbées, mais les écarts-types sont trop importants pour véritablement conclure.

Nous choisissons pour poursuivre un pH neutre, nous n'avons pas de différence apparente entre le tampon phosphate et le tampon PUM. Hazen & Hazen (1987) utilisent le tampon PUM à pH 7,1 pour étudier l'adhésion des microsphères de polystyrène sur les surfaces des colonies de *Candida albicans,* ce tampon est donc gardé pour les tests suivants.

4.3.3.1.3 Action de détergents sur l'adhésion

L'action des détergents réalisée avec du Tween 20, du Triton X-100 et du SDS, à des concentrations de 0,1 et 1%, dans du tampon PUM, est testée dans le but de limiter les agrégations des microsphères et de noter les modifications des propriétés de l'adhésion à la surface des œufs.

Une suspension d'œufs d'*Ascaris* provenant de dissection est mise en contact avec 2×5.10^6 microsphères hydrophiles et hydrophobes. Le nombre moyen de microsphères adsorbées (moyenne ± écart-type) en fonction du détergent testé figure dans la figure n°37.

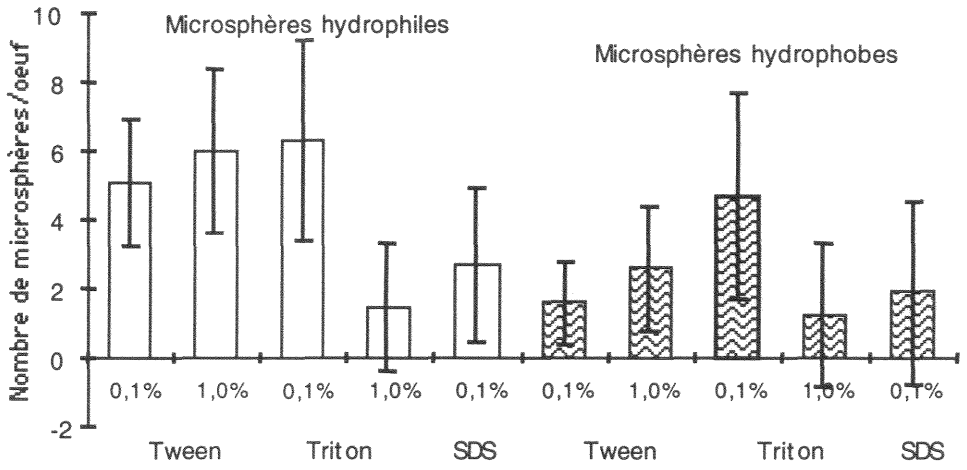


Figure n°37 : Action des détergents sur l'adhésion des microsphères hydrophiles et hydrophobes sur la surface des œufs.

☞ Sur les 60 œufs d'*Ascaris* observés pour chacun des 5 tests effectués, nous remarquons que les moyennes ne sont pas significativement différentes car les écarts-types se chevauchent pour les différents tests quelques soient les microsphères de latex utilisées.

☞ Toutes données confondues, la moyenne du nombre de microsphères adsorbées, est de 2,40±1,23 pour les microsphères hydrophobes et de 4,31±1,91 pour les microsphères hydrophiles.

L'ajout des détergents semblerait diminuer les phénomènes d'adhésion, par comparaison au graphe n°3, où nous avions 19,4±14,5 microsphères hydrophobes adsorbées par œuf et 10,2±9,5 microsphères hydrophiles adsorbées par œuf dans le tampon PUM, en absence de détergent.

4.3.3.1.4 Effets des concentrations des solutions salines sur l'adhésion

Nous avons testé la présence de sels sélectionnés en fonction de la série de Hofmeister (*cf.* 3.1.6.3.3). Nous avons choisi le sulfate d'ammonium et le nitrate de potassium dans les tests d'adhésion avec les microsphères. Le but est de :

- ◊ réduire les interactions électrostatiques pour favoriser les interactions hydrophiles et hydrophobes,
- ◊ réduire les écarts-types, pour pouvoir comparer significativement les données.

Pour étudier les interactions hydrophobes, Bellon-Fontaine *et al.* (1990) préconisent l'utilisation de nitrate de potassium à 0,1M pour neutraliser les charges électrostatiques.

De même, Brush *et al.* (1998) travaillent dans des conditions identiques pour mesurer l'hydrophobie de *Cryptosporidium* avec des microsphères de polystyrène. Le nitrate et le potassium sont des ions possédant des propriétés moyennes dans la série de Hofmeister (*cf.* 3.1.6.3.3 : Solutions salines).

✗ Sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium est testé à des molarités variant de 0,0 à 1,7M avec des œufs provenant de dissection.

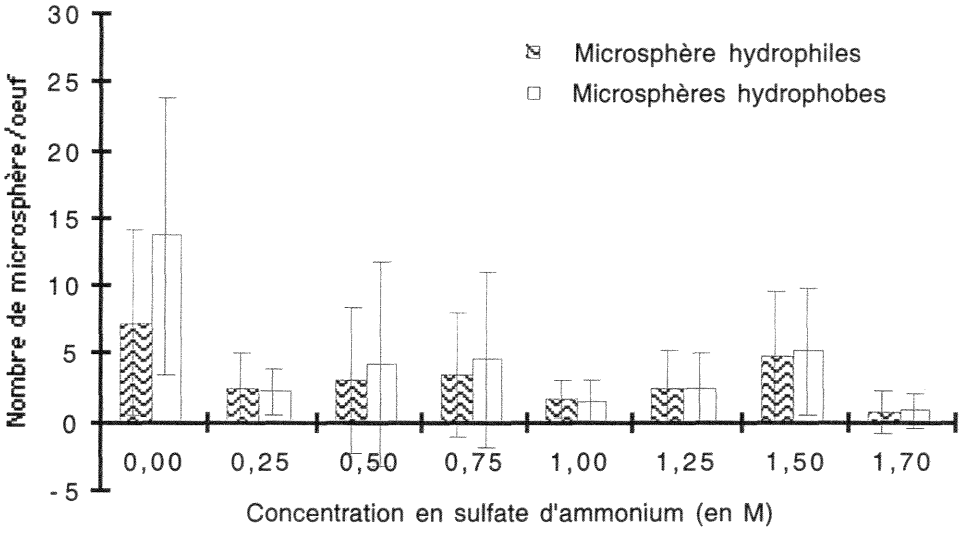


Figure n°38 : Comparaison de l'adhésion des microsphères hydrophiles et hydrophobes à la surface des œufs d'*Ascaris* en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium.

☞ En absence de $(NH_4)_2SO_4$, le caractère hydrophobe serait supérieur au caractère hydrophile, cependant les écarts-types sont toujours importants, la différence n'est pas significative.

☞ Pour des concentrations en $(NH_4)_2SO_4$ à 0,25M, sur les 60 œufs d'*Ascaris* observés, nous apercevons lors de l'examen microscopique une agrégation des billes entre elles, de plus elles ne s'adsorbent que faiblement sur la surface des œufs.

Le choix du $(NH_4)_2SO_4$ ne semblent pas convenir pour observer une évolution des phénomènes d'adhésion, car dès 0,25M, les billes s'aggrègent entre-elles.

✗ Nitrate de potassium

Dans du tampon PUM, l'élimination des charges électrostatiques est réalisée en ajoutant 0,1M de KNO_3. Le test d'adhésion des microsphères est réalisé en triplicat sur 20 œufs d'*Ascaris* provenant de dissection. Il est comparé avec un test en présence de tampon PUM contenant 0,01M de KNO_3, (concentration ne permettant pas une neutralisation des charges) (Figure n°39). Un test au tampon PUM seul est également effectué pour comparer avec les analyses précédentes.

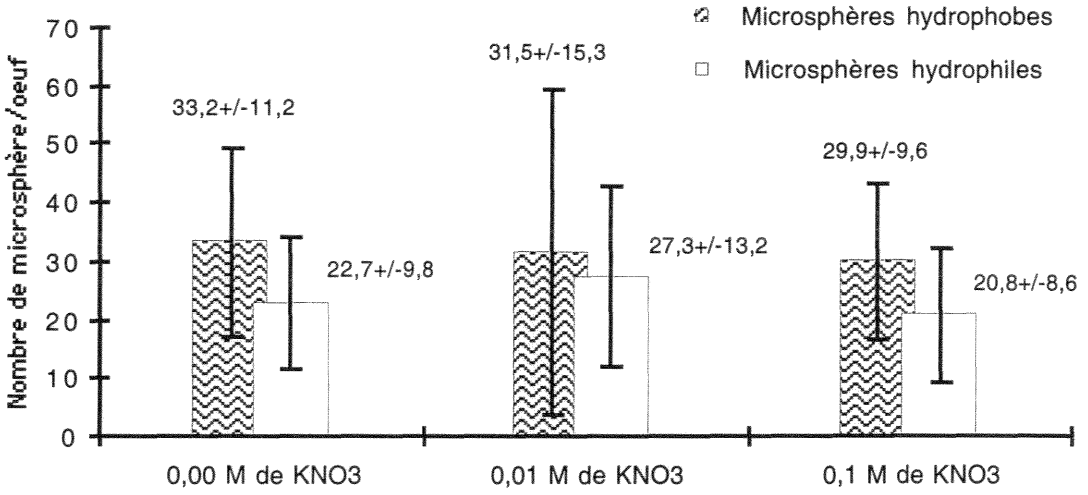


Figure n°39 : Comparaison de l'adhésion des microsphères hydrophiles et hydrophobes à la surface des œufs en fonction de la concentration en nitrate de potassium.

☞ Sur les 60 œufs d'*Ascaris* observés pour chacune des 3 concentrations en KNO_3, l'adhésion des microsphères hydrophobes semblerait supérieure à l'adhésion des microsphères hydrophiles.
Néanmoins, les écarts-types sont trop importants pour pouvoir réellement conclure sur un caractère hydrophobe prépondérant.

4.3.3.2 Adhésion des particules sur des suspensions d'œufs d'Ascaris

4.3.3.2.1 Expérimentations avec des suspensions d'œufs fraîchement émis

Les œufs proviennent du rinçage de vers adultes et possédent une importante couche externe translucide.

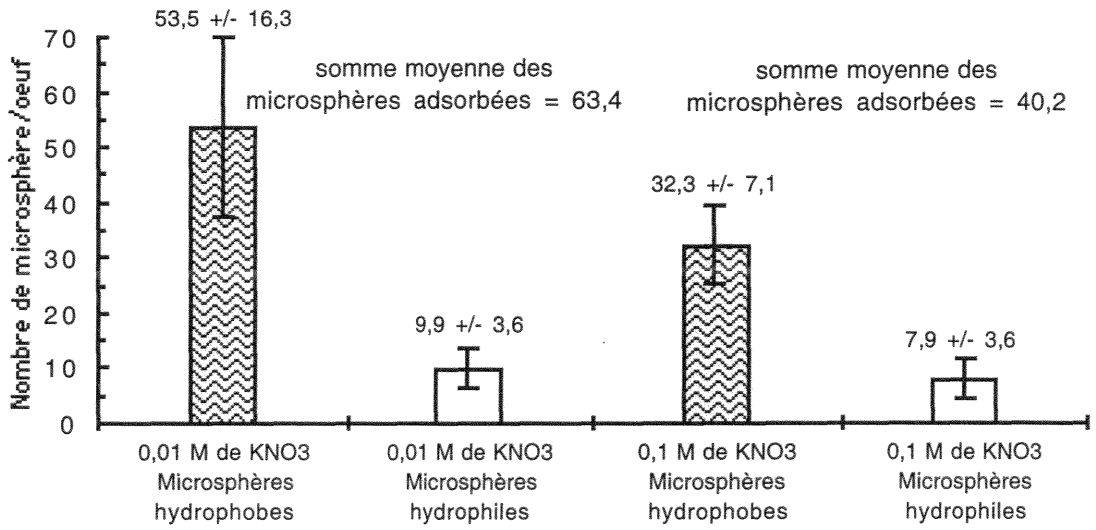


Figure n°40 : Adhésion des microsphères sur la surface des œufs d'*Ascaris* provenant du rinçage des vers, en fonction de la concentration en nitrate de potassium.

☞ Sur 120 œufs observés, le caractère hydrophobe est plus marqué que le caractère hydrophile quelque soit la concentration en KNO_3. Pour une concentration de 0,1M de KNO_3, nous avons une moyenne par œuf de

32,3±7,1 microsphères hydrophobes adsorbées pour 7,9±3,6 microsphères hydrophiles adsorbées à la surface de l'œuf. Le caractère hydrophobe est supérieur au caractère hydrophile.

☞ L'augmentation de la concentration en KNO_3 permet la neutralisation des charges électrostatiques, elle conduirait à une diminution du nombre de microsphères adsorbées. La somme des microsphères adsorbées est de 63,4±19,9 pour une concentration à 0,01M de KNO_3 et de 40,2±10,7 pour une concentration de 0,1M de KNO_3. La différence entre les 2 sommes moyennes n'est pas significative.

4.3.3.2.2 Expérimentations avec des suspensions d'œufs extraits de boues résiduaires

Les tests d'adhésion sont réalisés par observation microscopique des microsphères et des 60 œufs pour chacune des 2 concentrations en nitrate de potassium (0,01M et 0,1M). Les résultats des moyennes et écarts-types sont regroupés dans la figure n°41.

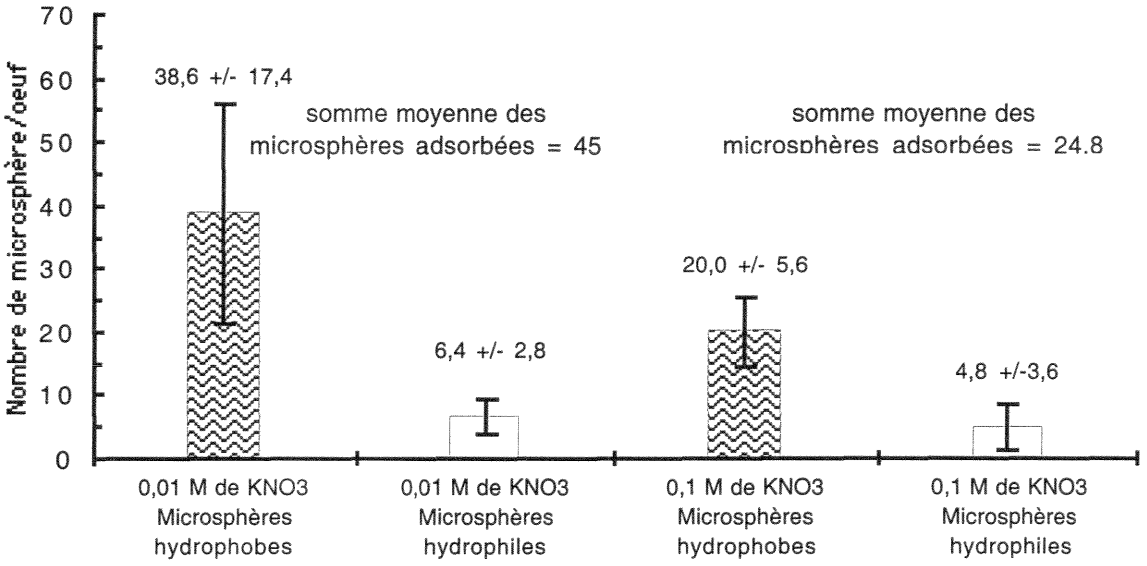


Figure n°41 : Adhésion des microsphères sur la surface des œufs extraits de boues, en fonction de la concentration en nitrate de potassium.

☞ Le caractère hydrophobe est plus marqué que le caractère hydrophile quelque soit la concentration en KNO_3. Nous avons en moyenne 5,5 fois plus de microsphères hydrophobes adsorbées que de microsphères hydrophiles.

☞ L'augmentation de la concentration en KNO_3 de 0,01M à 0,1M aurait pour conséquence une diminution du nombre de microsphères adsorbées, la somme des microsphères hydrophiles et hydrophobes adsorbées passant de 45,0±20,2 à 24,8±9,2 par neutralisation des charges électrostatiques à la surface des microsphères et des œufs.

Les caractéristiques électrostatiques de la surface des œufs d'*Ascaris* et des microsphères induiraient un potentiel d'adhésion, qui s'ajouterait au potentiel d'adhésion des propriétés hydrophobes.

5 Discussions et conclusion

5.1 Caractère hydrophile

La poudre et la laine de verre ont été utilisées par Gantzer *et al.* (1997) pour concentrer les virus présents dans les eaux usées, leurs propriétés électrostatiques de surface rendaient ces supports intéressants pour adsorber les virus. Gaspard *et al.* (1994) ont également employé les mêmes supports pour tester l'adhésion des œufs d'*Ascaris*. Pour la poudre de verre, les pourcentages d'adhésion étaient déterminés en observant par microscopie les œufs ayant adhéré sur la suspension de poudre de verre. Pour la laine de verre, le pourcentage d'œufs fixés était déterminé en comparant le nombre d'œufs en solution et les concentrations initiales. En absence de témoins, le pourcentage d'œufs ayant adhéré sur le matériel utilisé pour les expérimentations est considéré au même titre que les œufs ayant adhéré sur le support hydrophile.

Pour éliminer les erreurs inhérentes aux adhésions sur le matériel, un protocole a été mis au point en comparant les résultats à un témoin, afin de déterminer les pertes d'œufs provenant de leur adhésion à la surface des tubes. Le protocole combinant l'adhésion, les lavages et la désorption évite de comptabiliser dans les pourcentages d'œufs adsorbés, ceux qui seraient bloqués entre les particules de poudre de verre. Les résultats sont résumés dans le tableau n°61.

Tableau n°61 : Pourcentages d'adhésion des œufs d'*Ascaris* sur la poudre de verre : influence du pH et du stade de maturation de l'œuf.

	Milieu	Pourcentage d'adhésion
Influence du pH	acide	92,6±1,9%
	neutre	69,1±4,9%
	basique	76,3±6,4%
Influence du degré de maturation de l'œuf	récupérés dans l'oviducte	54,9±2,1%
	récupérés dans partie proximale	1,9±1,5%
	récupérés dans partie distale	68,9±5,9%

Notre étude démontre que l'adhésion :

- est un phénomène rapide réalisé en 15 minutes
- est influencée par le pH :

  Les pourcentages d'adhésion sont supérieurs à un pH acide avec 92,6±1,9% d'adhésion à pH 1 en 15 min. Ces résultats sont en désaccord avec Gaspard (1995) qui indique une adhésion des œufs maximale à un pH de 9, mais pour cette étude les analyses avaient été réalisées avec des œufs sans couche externe, dont la présence est primordiale pour l'étude des caractéristiques de surface.
- dépend également de l'état de maturation des œufs :

  1. Les œufs récupérés au niveau de l'oviducte ont des propriétés d'adhésion moyennes avec un pourcentage proche de 50%, nous ne pouvons déceler que les propriétés de surface spécifiques de la membrane vitelline.

2. Pour les œufs fécondés de la partie proximale de l'utérus, le pourcentage d'adhésion est très faible, montrant certainement un caractère hydrophobe important. La fécondation transforme les propriétés de surface de l'œuf bien que les 2 couches chitineuse et lipidique apparaissent sous la membrane vitelline et non en surface.

3. Les œufs fécondés de la partie distale de l'utérus présentent un pourcentage d'adhésion proche de 70%, démontrant l'apparition des propriétés de surface hydrophiles concomitant à la formation de la couche externe. La présence de cette structure constituée de mucopolysaccharides serait donc responsable des propriétés hydrophiles.

Les tests effectués semblent montrer que les œufs possèdent un caractère hydrophile marqué, leur capacité d'adhésion sur support hydrophile comme la poudre de verre est importante (70% à pH neutre). Les pourcentages d'adhésion obtenus avec la laine de verre étaient de 99% (Gaspard *et al.*, 1994), cependant ce pourcentage englobe à la fois les œufs ayant adhéré sur les tubes et sur la laine de verre. L'hydrophilie serait donc due à la présence de charges négatives sur la couche externe. La densité de charge proviendrait de la structure biochimique mucopolysaccharidique, les groupements sulfates et carboxyles de certains glycosaminoglycannes contribueraient aux propriétés hydrophiles de surface.

5.2 Caractère hydrophobe

5.2.1 Détermination du potentiel d'hydrophobie des œufs d'*Ascaris*

Rosenberg *et al.* (1980) ont étudié l'adhésion de différentes bactéries sur des émulsions d'octane, hexadécane et xylène. Vanhaecke & Pijck (cité dans Rosenberg & Doyle, 1990) ont montré que l'hexadécane ne provoque pas de dommage sur l'intégrité des cellules microbiennes durant les tests, des résultats similaires ont été obtenus avec l'octane. Par contre, l'emploi du xylène peut engendrer une lyse cellulaire. Nous avons choisi d'utiliser l'hexadécane et l'octane comme hydrocarbures pour cette étude. Les résultats sont regroupés dans le tableau n°62.

Tableau n°62 : Pourcentages d'hydrophobie pour les différents types d'œufs.

Mode de récupération des œufs	Potentiel d'hydrophobie	
	n-Octane	*n*-Hexadécane
Suspension d'œufs après congélation -20°C	71,9±3,5%	43,0±6,9%
Suspension d'œufs provenant du rinçage des vers adultes	95,4±3,1%	
Suspension d'œufs provenant de dissection des utérus	irréalisable	irréalisable
Suspension d'œufs récupérés à partir de boues résiduaires	73,5±4,3%	

Dans les tests utilisant des émulsions d'octane et la suspension d'œufs matures stockées à -20°C, le potentiel d'hydrophobie est de 71,9±3,5%. Le potentiel d'hydrophobie avec les émulsions d'hexadécane est plus faible avec 43,0±6,9%. L'octane aurait une meilleure affinité pour la surface des œufs d'*Ascaris suum*.

Medrzycka (1991) a démontré que les gouttes d'hexadécane dans une suspension aqueuse, sont fortement chargées. Par conséquent, la méthode TAMH pourrait ne pas refléter les propriétés d'hydrophobie de surface, mais également les caractéristiques de charge de surface (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1993).

Le potentiel passe de 95,4±3,1% lorsque les œufs sont utilisés pour le test TAMH immédiatement après le rinçage, à 71,9±3,5% après 3 mois de conservation à -20°C. Les œufs d'*Ascaris* stockés à -20°C subiraient une modification de leur propriété de surface par une transformation externe de la structure de leur paroi.

Pour les œufs d'*Ascaris* fraîchement émis, le potentiel d'hydrophobie obtenu avec des émulsions d'octane est de 95,4±3,1%. Pour les œufs provenant de l'extraction de boues déshydratées, le potentiel est de 73,5±4,3%. Les propriétés hydrophobes des œufs d'*Ascaris* seraient diminuées après une période de transition dans l'environnement. La matrice (boue, eaux usées) ou le temps de latence modifieraient les propriétés de surface des œufs d'*Ascaris suum.*

Il faut cependant noter que les boues sont purifiées par un protocole utilisant une étape diphasique associant du diéthyle oxyde (solution hydrophobe) et une solution hydrophile à base d'acide et d'alcool. Lors de la purification, les œufs sont prélevés dans la phase aqueuse hydrophile. Le protocole effectué permet de ne récupérer que les œufs se dirigeant préférentiellement dans la phase aqueuse lors de la centrifugation à 660*g*.

Nous ne pouvons déterminer si les œufs, dont la surface serait de nature hydrophobe, resteraient à l'interface des 2 solutions mises en jeu ou si la centrifugation obligerait les œufs à se regrouper dans le culot de la phase aqueuse.

Trois hypothèses sont émises :

- soit le protocole EPA interfère sur la détermination de l'hydrophobie des œufs,
- soit les œufs possèdent un potentiel hydrophile supérieur au potentiel hydrophobe, facilitant leur concentration dans la phase aqueuse,
- soit une centrifugation à 660*g* pendant 5 minutes concentre les œufs quelque soit leur caractère hydrophile ou hydrophobe..

Drozd & Schwartzbrod (1996) ont déterminé l'hydrophobie de *Cryptosporidium.* Les résultats des tests d'adhésion à l'octane ne démontrent pas un caractère hydrophobe pour des oocystes de *Cryptosporidium* (dans des gammes de pH correspondant à celles observées dans les eaux de surface). L'adhésion des oocystes à l'octane est proche de 20% en moyenne, alors qu'elle varie de 95,4 ± 3,1 à 71,8 ± 3,5% pour les œufs d'*Ascaris suum.*

Rosenberg (1991) pondère les résultats des tests TAMH. Les aspects des effets hydrophobes sont encore considérablement controversés pour les mesures et définitions de l'hydrophobie. Une simple technique ne peut pas proposer une mesure de l'hydrophobie de tous les microorganismes. Le TAMH doit être pris non comme valeur absolue mais comme une mesure de la tendance des microorganismes à s'adhérer à une interface d'eau et d'hydrocarbure (Rosenberg, 1991). Les analyses réalisées sur la surface des œufs d'*Ascaris* ont permis de déterminer un potentiel d'hydrophobie sous certaines conditions, et non une propriété hydrophobe de surface.

5.2.2 Propriétés de la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*

Dans l'*Ascaris*, le matériel dense sécrété par les cellules utérines adhère à la surface de l'œuf et forme la couche utérine ou couche externe (Foor 1967, Ubelaker & Allison 1975). La fonction de cette couche est incertaine pour Fairbain (1957), son épaisseur sert évidemment de protection contre la dessiccation ou l'action des solvants. Pour Monné & Hönig (1954), la couche externe est une gelée constituée de protéines et de mucopolysaccharides. Il semblerait que cette structure externe apporte des charges de surfaces négatives et des propriétés de surface hydrophiles.

En ce qui concerne les distributions des œufs avec et sans couche externe, l'objectif était de rechercher une variation de la distribution des œufs entre la suspension initiale et la suspension dans la phase aqueuse après agitation avec l'hydrocarbure. Le but était de mettre en évidence des modifications des propriétés d'adhésion en présence ou en absence de la couche externe à la surface de l'œuf.

Une diminution des pourcentages du nombre d'œufs avec couche externe dans les phases aqueuses des essais par rapport à la suspension initiale, aurait démontré le rôle de la couche externe dans les phénomènes d'hydrophobie de surface.

Le test de Kolmogorov-Smirnov effectué sur les distributions des populations d'œufs avec et sans couche externe, ne montre pas de différence significative. Les résultats des pourcentages d'œufs avec et sans couche externe, comptabilisés dans les phases aqueuses des témoins et des essais, ne permettent pas de conclure sur le rôle et les propriétés de la couche externe. Cette structure externe ne semblerait pas modifier les caractéristiques d'hydrophobie de surface.

Au niveau biochimique, Jaskoski (1962) a recherché la présence des acides aminés dans les différentes couches des œufs d'*Ascaris*. Neuf acides aminés ont été identifiés à partir de la membrane vitelline et seize acides aminés ont été identifiés à partir de la couche externe.

Le tryptophane, la phénylalanine, la tyrosine et la proline sont présents dans les 2 couches. Ce sont des acides aminés cycliques (aromatiques et hétérocycliques) apportant des propriétés hydrophobes. La présence de ces 4 acides aminés dans les 2 couches pourrait expliquer qu'en absence de la couche externe, la membrane vitelline étant en surface, les propriétés d'hydrophobie restent alors inchangées. Wharton (1980) montre également que la membrane vitelline serait constituée de lipoprotéines, qui conféreraient des propriétés de surface hydrophobes.

5.2.3 Interactions acido-basiques et électrostatiques

Les mesures du caractère hydrophobe de la surface des œufs d'*Ascaris* peuvent être faussées par la présence de propriétés acido-basiques et de charges électrostatiques s'ajoutant aux interactions hydrophobes. Afin de séparer les différentes forces mises en jeu dans les phénomènes d'adhésion :

✗ Nous avons d'une part comparé les potentiels d'hydrophobie avec des émulsions d'octane aux potentiels d'hydrophobie à partir des émulsions d'acétate d'éthyle et de chloroforme. L'octane est un solvant apolaire, tandis que l'acétate d'éthyle est un solvant monopolaire basique permettant de mettre en évidence les groupements acides de surface (Bellon-Fontaine *et al.*, 1990). L'adhésion aux émulsions de chloroforme, solvant monopolaire acide permettant de mettre en évidence les groupements basiques de surface, n'a pu être réalisée. La densité du chloroforme supérieure à celle de l'eau ne permet pas de récupérer les œufs d'*Ascaris* dans la phase aqueuse sans que ceux-ci ne sédimentent sur l'interface.

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative entre les potentiels d'hydrophobie quelque soit le solvant utilisé (octane ou acétate d'éthyle). Il ne semblerait pas y avoir de groupements acides à la surface des œufs d'*Ascaris* qui pourrait favoriser l'adhésion.

✗ D'autre part, nous avons différencié les interactions électrostatiques des interactions hydrophobes par l'ajout d'une solution saline dans le tampon PUM composé de phosphate, urée et sulfate de magnésium. En présence de 0,1M de nitrate de potassium, les charges électrostatiques sont neutralisées, seules les interactions hydrophobes sont responsables des propriétés d'adhésion de la surface des œufs d'*Ascaris*.

Nous ne déterminons pas de différence significative du potentiel d'hydrophobie quelque soit la concentration en KNO_3. L'adhésion aux émulsions d'octane ne serait pas la conséquence de forces électrostatiques, mais la conséquence des propriétés d'hydrophobie de surface de l'œuf d'*Ascaris*.

Nous pouvons supposer après ces différentes analyses, que le potentiel déterminé par le test TAMH correspond à une mesure des interactions hydrophiles/hydrophobes, les interactions électrostatiques et acido-basiques étant inexistantes.

5.3 Caractère amphiphile

Les différentes analyses effectuées sont résumées dans le tableau n°63. Les tests effectués montrent des pourcentages d'adhésion supérieurs pour les supports hydrophobes, au niveau des expérimentations avec des microsphères d'octyl-sépharose et des microsphères de latex à groupements aldéhydes de surface et sulfates. Par contre pour le TPP, les résultats diffèrent, mais la sédimentation des œufs lors du test semblerait modifier les résultats des analyses.

Tableau n°63 : Pourcentages d'adhésion des œufs d'*Ascaris* avec couche externe avec le CIH en batch, le test d'adhésion aux microsphères de latex et le test TPP.

Méthode	Support ou phase	Pourcentage d'adhésion
Chromatographie d'interaction hydrophobe en batch	Octyl-sépharose hydrophobe	77,1±27,4%
	Sépharose hydrophile	22,9±7,5%
Microsphères de latex hydrophiles et hydrophobes	avec 0,01M de KNO_3 :	
	Microsphères hydrophobes	84,4±25,7%
	Microsphères hydrophiles	15,6± 5,6%
	avec 0,1M de KNO_3 :	
	Microsphères hydrophobes	80,3±17,6%
	Microsphères hydrophiles	19,6±8,9%
Test de Partage de Phase	Phase hydrophobe : PEG 6000	11,2± 8,5%
	Interface	25,8±10,9%
	Phase hydrophile : dextran T500	63,0±17,5%

5.3.1 Chromatographie d'interaction hydrophobe en batch

Pour 100 œufs d'*Ascaris* comptabilisés sur les 2 types de gel, nous en retrouvons 77,1±27,4 sur les microsphères d'octyl-sépharose et 22,9±7,5 sur les microsphères de sépharose. Les œufs adsorbent sur les 2 types de microsphères, mais le caractère hydrophobe semble plus marqué que le caractère hydrophile.

Cependant Rosenberg & Doyle (1990) conseillent de déduire le pourcentage d'adhésion sur les microsphères de sépharose témoin (22,9%), du pourcentage d'adhésion sur les microsphères hydrophobes (77,1%). Dans ce cas, seulement 54,2% des œufs ont réellement adhéré grâce aux propriétés hydrophobes des groupements octyles.

Par conséquent, la surface des œufs d'*Ascaris* a un pourcentage d'hydrophobie moyen de 54,2%, en utilisant le test CIH en batch, et en déduisant les interactions sur les microsphères témoins.

Néanmoins, l'adaptation de la technique à la surface des œufs d'*Ascaris* ne semble pas concluante, il est difficile de numérer les œufs ayant adhéré qui peuvent être masqués par les microsphères de taille trop importante.

5.3.2 Microsphères de latex hydrophiles et hydrophobes

Les microsphères de latex présentent une forte densité de groupes fonctionnels de surface. La forte densité de groupes réactifs fournit un grand nombre de sites de fixation covalente, nous avons sélectionné des microsphères hydrophobes en polystyrène super-actifs modifiés aldéhyde/sulfate, ainsi que des microsphères hydrophiles en polystyrène super-actifs modifiées acide carboxylique

Les microsphères hydrophiles sont obtenues à partir des latex sulfates hydrophobes, où sont greffés des polymères d'acide carboxylique à la surface de la particule pour produire une couche de surface à très forte charge. Le groupe de surface prédominant est le carboxyle avec un nombre restreint de groupes sulfates.

- Pour une concentration de 0,1M de KNO_3, le nombre total de microsphères adsorbées est de 40,2±10,7 dont 80,3±17,6% de microsphères hydrophobes.

- Pour une concentration de 0,01M de KNO_3, le nombre total de microsphères adsorbées est de 63,4±19,9 dont 84,4±25,7% de microsphères hydrophobes.

Lors des expérimentations avec les œufs d'*Ascaris* fraîchement émis avec couche externe, le nombre de microsphères hydrophobes ayant adhéré est plus important que le nombre de microsphères hydrophiles. Les propriétés hydrophobes seraient supérieures aux propriétés hydrophiles.

La présence de sel dans le tampon ne modifierait pas les caractéristiques d'hydrophobie (80,3±17,6% de microsphères bleues avec 0,1M de KNO_3 et 84,4±25,7% de microsphères bleues avec de 0,01M de KNO_3), mais induirait une diminution du nombre de microsphères adsorbées, mais la différence n'est cependant pas significative. Les charges électrostatiques provoqueraient des interactions entre les microsphères, qui s'attirent entre elles et s'agrègent à la surface de l'œuf. La neutralisation des forces électrostatiques diminuerait les interactions inter-particules pour favoriser les interactions spécifiques œuf-particules.

En conclusion, le pourcentage d'hydrophobie déterminé par cette analyse avec 0,1M de KNO_3 est de 80,3±17,6% pour des œufs d'*Ascaris* avec couche externe.

5.3.3 Test de partage de phases

Nous remarquons que les résultats indiquent des concentrations supérieures dans la phase hydrophile avec 63,0±17,5% des œufs, comparés à la phase hydrophobe contenant en moyenne 11,2±8,5% des œufs. Au niveau de l'interface, nous retrouvons 25,8±10,9% des œufs. Ces résultats montrent que les œufs semblent posséder un caractère hydrophile supérieur au caractère hydrophobe.

Les conclusions sont contraires à celles des autres tests réalisés (TAMH, CIH), cependant la technique utilisant 2 gels pose un problème, la densité des gels n'est pas suffisante pour éviter les phénomènes de sédimentation. Nous ne pouvons donc conclure sur des propriétés hydrophiles de la surface des œufs, le TPP est inadapté pour étudier la surface des œufs *d'Ascaris*.

5.4 Conclusions

Les résultats sur l'étude des caractéristiques physiques de la surface des œufs d'*Ascaris* avec couche externe sont regroupés dans le tableau n°64.

Tableau n°64 : Résultats sur les tests de mesure d'hydrophilie et d'hydrophobie.

	Test	***Résultats***
Hydrophilie	Adhésion à la poudre de verre	Phénomène rapide et supérieur à pH acide Dépend de la présence et de la qualité de la couche externe Potentiel hydrophile de 92,6% à pH acide
Hydrophobie	TAMH	Pourcentage d'hydrophobie de 95,5% avec de l'octane
Hydrophobie et hydrophilie	CIH en batch	77,1% d'œufs ayant adhéré sur l'octyl-sépharose, 22,9% d'œufs ayant adhéré sur le sépharose. Potentiel d'hydrophobie de 54%
	Microsphère de latex	80,3±17,6% d'œufs ayant adhéré sur microsphères hydrophobes 19,6± 8,9% d'œufs ayant adhéré sur microsphères hydrophiles
	TPP	Test inexploitable.

Inactivation des oeufs d'Ascaris par irradiation

Inactivation des œufs d'*Ascaris* par irradiation

Ce chapitre sur l'inactivation des œufs d'*Ascaris* par irradiation se compose en 6 parties :

1 Introduction sur la problématique des boues 174

2 L'utilisation de l'irradiation en environnement 182

3 Objectifs 190

4 Matériels et méthodes 192

5 Résultats des expérimentations sur les œufs d'*Ascaris* 198

6 Conclusion 205

1 Introduction sur la problématique des boues

1.1 Problématique des boues

La société produit divers déchets dont l'eau usée, ainsi la consommation journalière en eau varie de 100 à 600 litres d'eau par habitant et le traitement de cette eau aboutit à la production de 15 à 20 kg de matière sèche/habitant/an. De plus la tendance actuelle en matière d'assainissement passe par la construction de nouvelles stations d'épuration et la mise en oeuvre de traitements d'eaux usées plus performants (Bittner, 1994). En France, une enquête réalisée en 1994 par les agences de l'eau et le ministère français de l'environnement montrait qu'en 1992, le nombre de stations d'épuration s'élevait à 11310 avec pour 2002 une estimation portant cette valeur à 12000. Il en résultera une augmentation constante de la production en boues urbaines.

Les données concernant la situation actuelle ainsi qu'une projection possible en France pour les années 2002 sont présentées dans le tableau n°65.

Tableau n°65 : Evolution des modes d'utilisation et d'élimination des boues entre 1983 et 1995 (Bouché, 1995).

Références	Production de boues		Modes d'utilisation et /ou d'élimination (en %)			
	Pays	Quantité[a]	Agriculture	Décharge	Incinération	Autres[b]
Hannan & Collins, 1983	Europe	6.10^6	29	46	7	18
Davis, 1992	Europe	$6,6.10^6$	38	43	10	9
Villessot & Fery, 1994	France	7.10^5	50	35	15	0
Bebin, 1995 (estimation 2002)	France	$1,3.10^6$	32 ou 48	0	68 ou 52	0

[a] : Tonnes de Matière Sèche par an (T/an de MS)

[b] : rejets en mer....

Actuellement la production annuelle de boues pour l'Union Européenne est de l'ordre de $6,6.10^6$ T/an de MS. En 1996, les boues issues des stations d'épuration françaises ont atteint un volume de $0,9.10^6$ tonnes de MS. La proportion valorisée en agriculture représente une part non négligeable avec 38% des boues pour l'Union Européenne et 50% pour la France.

A l'horizon 2002 en France, il est annoncé un doublement de la quantité de boues avec une production de $1,35.10^6$ T/an de MS. La mise en application de la directive 91/271/CEE sur le traitement des eaux usées entraînera l'augmentation de la production de boues via la construction de stations d'épuration dans les petites villes.

Par ailleurs, les décharges devront répondre à une nouvelle réglementation en 2002 (directive 75/442/CEE) modifiée par la loi de 13 juillet 1992. En effet, la mise en décharge sera interdite à partir de 2002, les boues résiduaires valorisables en agriculture ne pourront plus répondre à la définition de déchets ultimes. Deux modes d'éliminatation sont encore disponibles, l'incinération et la valorisation agricole :

⇒ L'incinération devrait connaître un fort développement avec 52 à 68% des boues qui pourraient être à terme éliminées par ce procédé (Bebin, 1995) alors que la proportion est actuellement de 15%, mais l'incinération reste une technique coûteuse estimée à 700 francs/T.

⇒ La valorisation agricole fait l'objet de débats avec pour conséquence une estimation de ce mode d'élimination pouvant varier de 32 à 48% pour 2002, alors qu'il était de 50% en 1994 (Villessot & Fery, 1994). Le coût reste moindre comparé à l'incinération, il est estimé à 120 francs/T.

Actuellement le problème qui se pose relève de la qualité sanitaire des boues car si les solutions de valorisation des boues paraissent intéressantes, il faut admettre que ces boues résiduaires peuvent renfermer des métaux lourds (Pb, Cd, Zn.....), des micropolluants organiques (hexachlorobenzène, hydrocarbures aromatiques, DDT, phtalates.....) et des microorganismes pathogènes comme les virus, les bactéries et les parasites (Yanko, 1988).

Il convient donc de développer une connaissance suffisante pour déterminer les risques réels pour les plantes et pour la santé des populations humaines et animales.

Ce travail porte plus particulièrement sur l'étude des œufs d'helminthes. Ces œufs de parasites intestinaux sont présents dans les eaux usées et se retrouvent dans les boues résiduaires à des concentrations variables selon les régions (Tableau n°66).

Tableau n°66 : Données quantitatives sur des concentrations en œufs d'helminthes dans les boues résiduaires en Europe et aux USA.

Pays	Concentrations (en œufs de Nématodes et Cestodes / 100 g de MS)	Références
France	3 258 à 4 420	Barbier *et al.* (1990)
France	150 à 240	Rosaz (1993)
Allemagne	110	Schuh *et al.* (1985)
Angleterre	60 à 600	Crewe & Owen (1983)
USA	≈ 400	Fitzgerald & Ashley (1977) Reimers *et al.* (1981)
USA	10 à 100	Kabrick & Jewell (1982) Wallis & Lehman (1984)

En France, les concentrations en œufs d'helminthes varient de 3258 à 4420 œufs/100g de MS pour Barbier *et al.* (1990) et de 150 à 240 œufs/100g de MS pour Rosaz (1993), nous remarquons un facteur de 20 entre les 2 données témoignant d'une variabilité entre les types de boues. En Europe, les valeurs s'échelonnent de 60 à 110 œufs/100g de MS. Aux USA, les concentrations varient selon les auteurs de 10 à 400 œufs d'helminthes pour 100g de MS.

1.2 Réglementation française

Les décrets pris en application de la loi sur l'eau de 1992, ont institué les principes de déclaration ou d'autorisation en cas d'épandage des boues. Le code de bonnes pratiques agricoles du Journal Officiel du 5 janvier 1994 devient un cadre à respecter. La directive 86/278/CEE a été suivie par le décret n°97-1133 du 8 décembre 1997 et par l'arrêté du 8 janvier 1998. L'application de la norme NFU 44 041 a été abrogée en février 1998.

Le décret relatif à l'épandage des boues définit les conditions dans lesquelles sont épandus les sédiments résiduaires des installations de traitement ou de prétraitement biologique, physique ou physico-chimique des eaux usées. Il concerne l'épandage sur les sols agricoles, forestiers ou en voie de reconstitution ou de revégétalisation et il fixe les règles générales d'hygiène et toutes autres mesures propres à préserver la santé de l'Homme.

L'arrêté fixe les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles, il donne :

- la conception et le gestion des épandages,
- la qualité des boues et les précautions d'usage,
- les modalités de surveillance,
- l'exécution.

Les distances d'isolement et les délais de réalisation peuvent être diminués si les boues sont hygiénisées. Dans ce cas, les boues doivent avoir subi un traitement réduisant à un niveau non détectable les 3 types d'agents pathogènes : *Salmonella*, entérovirus, œufs d'helminthes viables. Une boue hygiénisée devra présenter en sortie de filière de traitement les concentrations suivantes :

- ✗ *Salmonella* <8 NPP/10 g MS
- ✗ Entérovirus <3 NPPUC/10 g MS
- ✗ Œufs d'helminthes pathogènes viables <3/10 g MS

La circulaire 97/655 du 30 septembre 1997 portant publication de recommandations sanitaires de la section des eaux du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France vis-à-vis des risques liés à l'épandage des boues résiduaires des stations d'épuration urbaines ou mixtes propose que :

- la vérification du critère de conformité concernant la recherche de salmonelles, virus, œufs d'helminthes, soit effectuée lors de l'isolement des performances d'une nouvelle filière et lors de la mise en service d'une installation nouvelle avec une filière connue,
- un contrôle simple de recherche de coliformes thermotolérants soit effectué au moment de l'usage pour évaluer les phénomènes de croissance et/ou recontamination; les systèmes d'acquisition de données permettant de montrer, lors des contrôles, que les installations sont gérées dans les règles de l'art.
- d'autres indicateurs d'efficacité de traitement (taux de matières organiques, de matières sèches) soient suivis régulièrement,
- un carnet sanitaire consigne l'ensemble des données obtenues sur les boues.

1.3 Etude des différentes filières de traitement des boues

Nous pouvons classer les traitements existants en 3 grands groupes :

- ✗ les traitements physiques (température, irradiation, ultrasons et stockage)
- ✗ les traitements biologiques (digestion anaérobie, digestion aérobie et compostage)
- ✗ les traitements chimiques (chaulage, fertilisants).

1.3.1 Traitements physiques

L'élimination des œufs d'helminthes présents dans les boues peut intervenir sous l'action de la température, des radiations γ ou β, des ultrasons et après un stockage. Les conditions nécessaires pour obtenir l'élimination du caractère viable des œufs sont présentées dans le tableau n°67.

Tableau n°67 : Traitements physiques efficaces sur les œufs d'helminthes.

Type de traitement	Caractéristiques	Référence
Température	55°C pendant 20 min pour des selles pour des œufs d'*Ascaris*	Reyes *et al.* (1963)
	55°C pendant 2 h : traitement recommandé pour les boues	Carrington (1985)
	55°C pendant 15 min : digestion anaérobie pour *Ascaris*	Pike *et al.* (1988)
Irradiation	Microondes de fréquence 2450 MHz, λ: 12 cm, à une de puissance 600 W, 20 sec	Bouchet (1985)
	Radiations γ 1 Mrad pour des œufs d'*Ascaris*	Yeager & O'Brien (1983)
	Radiations β 0,11 Mrad	Horàk (1994)
Ultrasons	49 KHz pendant 6 min pour des œufs de*Toxocara* dans l'eau, inefficace sur des œufs d'*Ascaris*	Reimers *et al.* (1981)
Chaulage	pH > 12 au moins 3 mois pour des œufs d'*Ascaris*	Eriksen *et al.* (1995)
Stockage	16 mois à 25°C (*Ascaris*) dans boues de digestion anaérobie	
	10 mois à 25°C (*Toxocara*) dans boues de digestion anaérobie	O'Donnell *et al.* (1984)

On dispose donc pour l'élimination du caractère viable des œufs d'un certain nombre de traitements efficaces. Cependant, on peut noter que les conditions de traitement sont contraignantes et les coûts associés à ces traitements réduisent leur utilisation à des conditions spécifiques. (valorisation importante du produit obtenu, boues fortement contaminées, etc...).

De plus, il est à noter que le facteur "durée de traitement" est primordial. Ainsi pour le chaulage, il est indiqué un pH>12 durant au moins 3 moins (Eriksen *et al.*, 1995). En effet, un chaulage de pH>12 pendant 7 jours n'a pas d'action ovicide, la perte de viabilité n'est que de 3,6% (Plachy *et al.*, 1996).

Par contre d'autres types de traitement présentent une efficacité faible ou nulle (Tableau n°68). Ainsi l'action du froid ou un stockage à 4°C se sont révélés totalement inefficaces alors que la dessiccation sur lit de séchage a montré un intérêt qu'il conviendrait cependant de confirmer.

Tableau n°68 : Traitements physiques peu ou pas efficaces sur les œufs d'helminthes (Gaspard, 1995).

Traitement	Caractéristiques	Référence
Froid	-25°C pendant 7 jours : inefficace sur les œufs d'*Ascaris*	Sanin *et al.*, 1994
Dessiccation	Boues à 20% d'humidité sur lit de séchage : efficace si exposition suffisamment longue	Reimers *et al.*, 1981
Stockage	Stockage à une température de 4°C : peu efficace sur les œufs de*Toxocara* et d'*Ascaris*	O'Donnell *et al.*, 1984

1.3.2 Traitements biologiques

Un certain nombre de traitements biologiques sont décrits comme présentant une bonne efficacité pour l'élimination des œufs d'helminthes : digestions aérobies et anaérobies thermophiles, compostage. La caractéristique majeure commune à tous ces traitements est bien entendu l'aspect thermophile avec une adaptation des durées de traitement en fonction des températures appliquées. Les différentes conditions de traitement sont présentées dans le tableau n°69.

Tableau n°69 : Performances des traitements biologiques sur les œufs d'helminthes.

Traitements	Caractéristiques	Viabilité	Références
Digestion aérobie mésophile	33 à 38°C pendant 72 heures	33 à 37%	Plachy *et al.* (1995)
Digestion anaérobie mésophile	35°C pendant 15 jours	77 à 100%	Black *et al.* (1982)
	35°C pendant 20 jours	50%	Pike *et al.* (1988)
	35°C pendant 20 jours	25%	Barbier *et al.* (1990)
	35°C pendant 15 à 20 jours	42 à 90%	Gaspard *et al.* (1995)
	30-35°C pendant 5 semaines	50%	Johnson *et al.* (1998)
Digestion aérobie thermophile	55°C pendant 2 heures	0%	Reimers *et al.* (1981)
	45°C pendant 2 jours	0%	Reimers *et al.* (1981)
	48,5°C pendant 120 heures	0%	Plachy *et al.* (1995)
Digestion anaérobie thermophile	45°C pendant 2 jours	0%	Reimers *et al.* (1981)
	49°C pendant 10 à 20 jours	0%	Pike *et al.* (1983)
	55°C pendant 24 heures	0%	Forshell (1995)
Compostage	température maximale de 39°C pendant 10 jours	100%	Nell *et al.* (1983)
	température comprise entre 60 et 70°C pendant 8 jours	0%	Nell *et al.* (1983)
	fermentation de 4 à 7 semaines et maturation de 3 mois	0 à 57%	Gaspard *et al.* (1995)

En effet pour des températures inférieures à 50°C, les traitements conseillés sont relativement longs (de quelques jours à 30 jours) alors que pour des températures supérieures à 50°C, la durée peut se limiter à quelques heures.

Dans le cas particulier du compostage, il est important d'obtenir une bonne homogénéité pour permettre un impact de la température dans toute la masse. La température est donc le paramètre favorisant la destruction des œufs d'helminthes , il convient donc de parfaitement la contrôler et la maîtriser si l'on veut atteindre les objectifs en terme d'élimination des œufs d'helminthes.

Ainsi la réaction exothermique obtenue lors de l'hydratation de la chaux vive peut également permettre l'élimination des œufs d'helminthes à condition que la température atteigne environ 60°C pendant une durée de 30 min (Marcinkowski, 1985).

1.3.3 Traitements chimiques

Les œufs d'helminthes présentent une forte résistance à de nombreux traitements chimiques liée essentiellement à la structure de la coque. Le traitement à la chaux fournit de bons résultats avec une diminution de la viabilité de 98,5% mais uniquement dans le cas de pH très important de l'ordre de 12,5 associé à un stockage de 2 à 4 mois (Schuh *et al.*, 1985).

Plachy *et al.* (1996) testent l'application de chaux éteinte à 10 $g.L^{-1}$ (pH 12,7) sur des boues primaires. Ils n'observent aucune réduction de la viabilité des œufs d'*Ascaris* au bout d'une semaine. Par contre, au bout de 10 semaines, Eriksen *et al.* (1995) obtiennent une inhibition totale de la viabilité dans des boues à 10% de chaux vive (pH > 12).

De même Ghiglietti *et al.* (1997) étudient l'impact de l'hydroxyde d'ammonium à des concentrations de 1%, 2% et 4% dans des boues résiduaires (10% de MS) (Figure n°42).

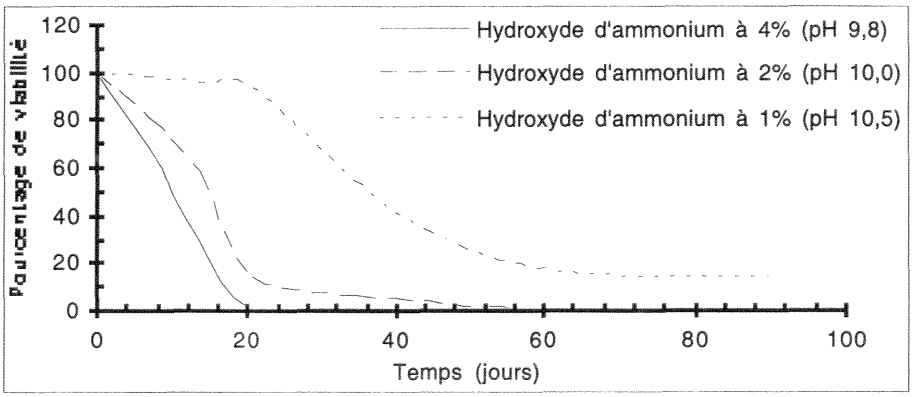


Figure n°42: Pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris suum* dans des boues à 22°C en fonction de l'hydroxyde d'ammonium additionné (Ghiglietti *et al.*, 1997).

Alors que les pourcentages de viabilité restent supérieurs à 92% dans les boues non-traitées, la survie des œufs d'*Ascaris* diminue en fonction du temps et de la quantité de NH_4OH. Ainsi, Ghiglietti *et al.* (1997) montrent que l'alcalinisation des boues avec 1% de NH_4OH réduit la viabilité des œufs d'*Ascaris suum* avec une viabilité de 41% au bout de 40 jours de contact. Après 21 jours, aucun œuf viable n'est retouvé dans les boues contenant 4% de NH_4OH ou après 40 jours dans celles à 2%.

L'efficacité de ce traitement est corrélée majoritairement à la quantité de NH_4OH additionnée et plus modestement à l'augmentation du pH de la boue. La diminution de la viabilité des œufs d'*Ascaris suum* résulterait de l'action chimique du réactif sur l'embryogénèse des œufs, à laquelle s'ajoute en partie l'effet des pH basiques.

En conclusion, la majorité des traitements efficaces sur les œufs d'helminthes sont :
- soit des traitements physiques (irradiation, ...),
- soit des traitements biologiques (digestion thermophile, ...),
- soit des traitements chimiques (chaulage, ...).

En réalité, la destruction et/ou la perte de viabilité est la résultante de plusieurs mécanismes; l'action du couple température et pH dans le chaulage, l'action de la température et de l'anaérobiose dans la digestion anérobie thermophile.

A partir de diverses données bibliographiques et expérimentales, l'Environmental Protection Agency (EPA, 1992a) a classé les procédés de traitements de boues en 2 catégories :
- PFRP : Process to Further Reduce Pathogens,
- PSRP : Process to Significantly Reduce Pathogens.

1.4 Procédés réduisant encore davantage les germes pathogènes (PFRP)

Les boues ayant subi ces filières de traitements peuvent être utilisées sans restriction. Elles remplissent les critères microbiologiques suivant (EPA, 1992a) :
- *Salmonella sp* < 3 NPP / 4 g MS
- Entérovirus < 1 NPPUC / 4 g MS
- Œufs d'helminthes pathogènes viables < 1 / 4 g MS

1.4.1 Digestion aérobie thermophile

Les boues liquides sont brassées en présence d'air ou d'oxygène pour maintenir des conditions aérobioses pendant 10 jours à des températures comprises entre 55 et 60°C.

1.4.2 Compostage

Lors d'un compostage par ventilation forcée, en réacteur ou en andains statiques, la température de la boue doit se maintenir à une température supérieure ou égale à 55°C pendant 3 jours. Par contre, s'il s'agit d'une méthode de compostage par retournements, la température de la boue doit se maintenir à 55°C pendant au moins 15 jours. Au cours de la période, les andains sont retournés au minimum 5 fois.

1.4.3 Séchage thermique, traitement thermique et pasteurisation

Le séchage de la boue est réalisé par contact direct ou indirect avec des gaz chauds pour réduire la teneur en eau des boues à une valeur inférieure ou égale à 10%. Les boues quittent le séchoir à une température dépassant les 80°C.

Pour le traitement thermique, la boue liquide est chauffée à une température supérieure ou égale à 180°C pendant 30 minutes, tandis que pour la pasteurisation, la température de la boue est maintenue au minimum à 70°C pendant au minimum 30 minutes.

1.4.4 Irradiation

La boue est irradiée soit par des rayonnements β fournis par un accélérateur assurant une dose minimale de 1 megarad à la température de 20°C, soit par des rayonnements γ fournis par certains isotopes, tels que le Cobalt 60 et le Césium 137, à la température de 20°C.

1.5 Procédés réduisant significativement les germes pathogènes (PSRP)

Les procédés (PSRP : Process to Significantly Reduce Pathogens) qui tout en ne permettant pas une élimination totale de tous les germes pathogènes assurent cependant une très forte réduction de la contamination microbiologique. Les boues remplissant ces critères ont des restrictions d'usage. Au niveau du critère microbiologique, les concentrations en coliformes fécaux doivent être inférieurs à 1 000 NPP par gramme de MS (EPA, 1992a).

1.5.1 Digestions aérobie et anaérobie

Pour maintenir des conditions aérobies, la boue résiduaire est brassée avec de l'air ou de l'oxygène pendant 40 jours à 20°C ou 60 jours à 15°C.

Pour l'obtention de conditions anaérobies, elle est par contre traitée en l'absence d'air pendant 15 jours à une température comprise entre 35 et 55°C ou pendant 60 jours à 20°C.

1.5.2 Séchage à l'air

La boue résiduaire est séchée sur des lits de séchage ou dans des bassins pavés ou non. La durée de séchage de la boue est au minimum de 3 mois. Pendant les 2/3 du temps, la température ambiante journalière est supérieure à 0°C.

1.5.3 Compostage

Quelle que soit la méthode de compostage utilisée, la température doit s'élever et se maintenir à 40°C ou plus pendant 5 jours. Pendant 4 heures au cours de ces 5 jours, la température au sein de la masse doit dépasser 55°C.

1.5.4 Stabilisation

Au cours de ce procédé, le pH de la boue doit être supérieur à 12 durant au moins deux heures. Ces pH élevés sont atteints par mélange de la boue avec une quantité suffisante de chaux.

2 L'utilisation de l'irradiation en environnement

2.1 Caractéristiques de l'irradiation

2.1.1 Rayonnements γ et β

L'irradiation consiste à soumettre un milieu à des rayonnements, qui peuvent être soit de type γ, soit de type β. L'effet ionisant varie selon l'intensité du rayonnement. Les interactions aboutissent, en fonction de la nature du rayonnement, à la formation d'ions et de radicaux libres, à la rupture de certaines molécules et à la formation de nouvelles liaisons.

Les doses d'application pour une inactivation sont différentes selon le type de rayonnement, mais également selon la source irradiante. Le tableau n°70 résume les différences entre ces deux types de rayonnements.

Tableau n°70 : Comparaison entre les deux types de rayonnement (γ et β).

	Rayons γ	Rayons β
Type	électromagnétiques	corpusculaires
Production	sources radioactives (^{60}Co - ^{137}Cs) ou convecteur X	accélérateurs
Energie	^{60}Co 1,17 et 1,33 MeV ^{137}Cs 0,66 MeV	0,1 à 10 MeV suivant l'accélérateur et la législation
Pouvoir pénétrant	plusieurs dizaines de cm	quelques mm à quelques cm
Temps d'exposition pour 10 kGy	supérieur à 1 heure	environ 1 seconde

Nous remarquons deux différences fondamentales :

⇒ la première concerne la source des rayons qui est soit de nature radioactive, soit constituée d'électrons,

⇒ la seconde différence concerne les propriétés des rayons, avec un pouroir pénétrant plus important pour les rayons γ, mais avec un temps d'exposition plus court pour les rayonnements de type β.

2.1.1.1 Rayonnement γ

Il est caractérisé par 3 effets :

① Effet photoélectrique. Il est surtout observé pour les photons de faible énergie (< 0,1 MeV). Le photon incident transfère son énergie à un électron lié. Cet électron est éjecté avec une énergie cinétique égale à l'énergie du rayonnement diminuée de l'énergie de liaison de l'électron.

② Effet Compton. Prédominant de 0,1 à 1 MeV, il est dû à l'interaction du photon incident avec un électron libre ou peu lié. L'électron acquiert de l'énergie cinétique (recul) et un photon secondaire diffusé est émis.

③ Effet de paire. Pour une énergie du photon incident supérieure à 1,022 MeV apparaît l'effet de paire. Le photon est totalement absorbé et il y a création d'une paire de e^+e^-. Le positon e^+ peut s'annihiler avec un électron du milieu en donnant de 2 rayonnements γ de 511 kMeV, émis dans des directions opposées.

2.1.1.2 Rayonnement β

Les particules chargées interagissent avec la matière par des phénomènes coulombiens. Il se produit alors une ionisation et une excitation. La particule perd son énergie dans des collisions successives avec les électrons du milieu, l'énergie perdue est transmise à l'électron. Les phénomènes induits sont multiples, ils peuvent conduire à la fragmentation des molécules et à la production de radicaux libres.

Pour des cinétiques supérieures à M_0c^2 (avec M_0 pour la masse de la particule incidente et c pour la vitesse de la lumière), la perte d'énergie se fait partiellement par émission d'un rayonnement électromagnétique.

Il est à remarquer que pour l'irradiation par des particules chargées ou par rayonnement γ, l'importance quantitative des interactions dépend de la dose D reçue par le produit ou quantité totale d'énergie absorbée par unité de masse. La dose est calculée en tenant compte de l'énergie du rayonnement, de son efficacité et du temps d'exposition.

2.1.2 Paramètres

L'évaluation des procédés à faisceaux d'électron requiert la considération de 3 facteurs majeurs : la dose, la pénétration et l'efficacité.

2.1.2.1 Dose

Les applications pour les procédés à faisceaux d'électron sont nombreuses et la sélection d'un niveau de dose, propre à chaque application, est importante. La dose moyenne est la quantité totale de l'énergie absorbée par unité de masse du matériel. L'unité de dose est le gray, défini comme l'absorption énergétique de 1 Joule par kilo de matière, le kilogray est l'unité pratiquée. La dose absorbée peut être exprimée en termes industriels plus communs, en énergie électrique et calorique.

Doses équivalentes :

1 Gray (Gy) = 100 Rads

1 mégarad (MRad) = 10^4 ergs.g^{-1} = 2,39 cal.g^{-1}= 10 watt-sec.g^{-1}

1 kGy = 0,1 MRad = 1 kW-sec.kg^{-1}

2.1.2.2 Pénétration

L'épaisseur irradiée est proportionnelle à l'énergie du faisceau et inversement proportionnelle à la densité (ou gravité spécifique) du matériel traité. Pour une énergie de faisceau d'électron, la pénétration peut être exprimée

en terme de poids par unité de surface. Pour cette raison, la pénétration est communément exprimée en gramme par centimètre carré.

Pénétration de $1 g.cm^{-2}$ = Pénétration de 1 cm dans de l'eau

A 1 MeV, le faisceau d'électron a une pénétration maximum d'environ 0,5 cm dans l'eau. La profondeur de pénétration est très faible comparée à celle des rayonnements γ du cobalt 60 qui est d'environ 11 cm dans l'eau (Hashimoto *et al.*, 1986).

2.1.2.3 Efficacité

La taille et la forme du produit ainsi que la technique de présentation influencent l'efficacité du faisceau d'électron. Pour une efficacité optimale et un coût minimum, il est nécessaire que la plupart de l'énergie soit absorbée par le produit et que la dose soit uniforme sur toute la surface. Le surdosage ainsi que l'excédent énergétique doivent cependant être minimisés.

Le maximum de dose relative absorbée se trouve à une profondeur précise, définie selon la densité et l'épaisseur du produit, et selon l'énergie du faisceau d'électron.

2.2 Action de l'irradiation sur les organismes vivants

2.2.1 Irradiation d'une population de cellules

Nous définissons la survie d'une population irradiée comme $S = N/N_0$, où N_0 est le nombre de cellule initiale de la population et N le nombre de cellules restées vivantes après l'action des radiations. La figure n°43 présente deux types de courbes survie/dose :

- courbe A, survie suivant une loi statistique
- courbe B, survie ne suivant pas une loi statistique, avec présence d'un épaulement pour les faibles doses d'irradiation indiquant une résistance aux radiations de faibles intensité (Poretti, 1988).

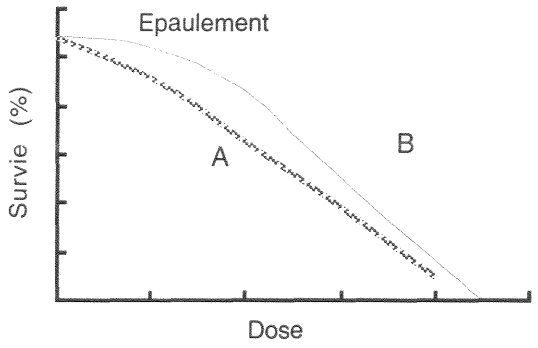


Figure n°43 : Courbes schématiques survie/dose pour des cellules irradiées.

2.2.1.1 Effets directs

L'énergie des photons irradiants interagit avec l'ADN des organismes. Il en résulte un impact sur la synthèse cellulaire des composés et sur la reproduction. Ce type de dommage est appelé effet direct des radiations ionisantes.

2.2.1.2 Effets indirects

Les effets indirects des radiations sont les dommages subséquentiels provoqués par la formation de radicaux libres dans le milieu. Une grande majorité des lésions de l'ADN serait due à l'action des radicaux produits dans l'eau. Poretti (1988) précise que 70% des effets des radiations sont dus à ces effets indirects. Il décrit la radiosensibilité du noyau cellulaire ainsi que sa capacité à se défendre en réparant certaines lésions.

Dans un environnement dilué aqueux, la plupart des radiations produisent des altérations de type indirect. Par contre, en présence de fortes concentrations en substances organiques, les effets sont de type direct (Yeager & O'Brien, 1983).

2.2.2 Effets variables sur les organismes

2.2.2.1 Variabilité en fonction de l'organisme

Les organismes réagissant différemment aux irradiations, les doses d'inactivation réduisant la population de 90% sont très variables. Le tableau n°71 donne les doses de rayonnement β et γ (source Césium) permettant d'obtenir une D_{90} pour différents microorganismes (bactéries, virus et champignons pathogènes).

Tableau n°71 : D_{90} après irradiations γ et β pour des bactéries, des entérovirus et des champignons dans des boues liquides.

Microorganismes	Dose D_{90}* (en kGy)	
	Irradiation γ (^{137}Cs) Yeager & O'Brien, 1983	Irradiation β (Anonyme, 1982)
E. coli	0,22	0,25
Klebsiella sp.	0,48	
Salmonella typhimurium	< 0,54	0,26
Proteus mirabilis	< 0,24	
Streptococcus sp.	1,30	1,10-1,57
Entérovirus	3,30	3,65-4,00
Aspergillus	0,50-0,60	

* : D_{90} est la dose émise réduisant la population de 90%

Les doses d'irradiations γ s'échelonnent de 0,22 pour *E. coli* à 3,30 kGy pour les entérovirus; les doses d'irradiations β s'échelonnent de 0,25 kGy pour *E. coli* à 4,00 kGy pour les entérovirus.

Pour les bactéries, les valeurs citées dans le tableau n°7, sont partiellement en accord avec les données de Montiel & Welté (1992) qui rapportent des doses d'irradiation γ par une source au Cobalt 60 comprises entre 0,32 et 3,50 kGy pour obtenir une réduction de la population bactérienne de 99% (Tableau n°72) sans préciser le milieu dans lequel ont été réalisées les expérimentations (eaux potables, eaux usées et boues).

Tableau n°72 : Doses de d'irradiation par rayonnement γ permettant une réduction de 99% de la population (Montiel & Welté, 1992).

Microorganismes	Dose D_{99}* (en kGy)
Bacillus subtilis var niger	3,50
Mycobacterium smegmatis	1,40
Escherichia coli	0,65
Micrococcus pyogenes var aureus	0,58

* : D_{99} est la dose émise réduisant la population de 99%

Par ailleurs, Yeager & O'Brien (1983) comparant les D_{90} des deux types de radiations γet β, concluent à l'absence de différence entre les 2 rayonnements, pour l'inactivation des virus entériques dans des boues résiduaires.

2.2.2.2 Variabilité en fonction du taux d'hydratation

La teneur en eau de l'échantillon à irradier est un facteur modifiant la dose d'inactivation pour certaines bactéries comme l'indique le tableau n°73.

Tableau n°73: Dose d'inactivation de 90% de la population de bactéries par rayonnement γ suivant la teneur en eau de la boue (Yeager & O'Brien, 1983).

Types de boues (% de MS)	*E. coli* (en kGy)	*Enterobacter* (en kGy)	*Salmonella* (en kGy)	*Proteus* (en kGy)	*Streptococcus* (en kGy)
Liquide (5%)	0,22	0,36	<0,54	<0,24	1,30
Décantée (42-57%)	0,22	0,42	<0,60	<0,22	1,30
Déshydratée (94-95%)	0,22	0,50	1,20	<0,50	1,60

Si la D_{90} de *E. coli* n'est pas modifiée pour les 3 types de boue, par contre pour 4 autres microorganismes, la D_{90} augmente proportionnellement à la quantité de matière sèche présente.

2.2.2.3 Variabilité selon le stade de développement et le sexe

La radiosensibilité de la cellule animale dépend de la phase du cycle cellulaire au moment de l'irradiation. Une population de cellules en division fréquente ou un organisme en développement rapide comme un foetus est particulièrement radiosensible (Poretti, 1988).

Hartman *et al.* (1996) comparent les sensibilités relatives de *Caenorhabditis elegans* (Nématodes) aux irradiations γ générées par du Césium et du Cobalt, en fonction du stade de développement et du sexe (Tableau n°74).

Tableau n°74 : Comparaison de la sensibilité relative de *C. elegans* aux irradiations γ (Hartman *et al.*, 1996).

Lignée	Stade	Sexe	Dose inactivant 37% de la population	
			Césium (en Gy)	Cobalt (en Gy)
CB1467	embryon	mâle	16	160
		hermaphrodite	27	410
	larve	mâle	200	250
		hermaphrodite	430	950
PH69	embryon	mâle	3,3	130
		hermaphrodite	8,5	110
	larve	mâle	33	420
		hermaphrodite	80	580

Hartman *et al.* (1996) remarquent que *C. elegans* est plus sensible aux irradiations γ générées par ^{137}Cs que par ^{60}Co, d'un facteur variant de 1,3 pour CB1467 à 39,4 pour PH69. Ces observations reflètent des mécanismes différents dans les processus de dommages induits à l'ADN par les 2 types d'irradiations.

Les différences de sensibilité dépendent de la lignée, du stade de développement et du sexe. Les œufs au stade embryonnaire sont plus sensibles aux irradiations, car ils sont en cours de division celluaire. Les mâles sont plus sensibles aux irradiations ionisantes que les hermaphrodites, cette différence résulterait du nombre inférieur de chromosomes que possèdent les mâles (Hartman *et al.*, 1996).

2.2.3 Effet de la dose de radiation sur les œufs de parasites

Les œufs d'helminthes présents dans les boues résiduaires sont généralement résistants aux procédés classiques d'inactivation physiques et chimiques. Ces microorganismes sont plus résistants que les bactéries et les virus, et doivent être éliminés ou détruits par des traitements supplémentaires pour une utilisation de la boue sans risque pour la santé publique.

En terme d'impact, les radiations affectent leur viabilité, qui décroît en fonction de la dose suivant la loi d'ordre 1 : $D_{90} = 1/V$ où V est la perte de viabilité.

- Radiations β :

Les valeurs des doses d'inactivation sont variables (Tableau n°75).

Tableau n°75 : Doses de radiations β pour l'inactivation des œufs *d'Ascaris* (Horàk, 1994).

Auteurs	Doses (en kGy)
Sivinski (1975)	0,95
Brandon (1978)	1,00
Yeager & Ward (1980)	1,50
Horàk (1994)	1,10
Hess & Breer (1976)	3,00
Heuer & Hofmann (1979)	3,00
Keller (1983)	3,00
Enigk *et al.* (1975)	4,00
Burger *et al.* (1978)	4,80

Les doses nécessaires pour une destruction des œufs d'*Ascaris* s'échelonnent de 0,95 à 4,80 kGy suivant les auteurs. Cette variabilité proviendrait des conditions expérimentales qui ne sont pas identiques d'une étude à l'autre.

❖ Radiations γ :

Selon Melmed & Comninos (1977) et Yeager & O'Brien (1983), la D_{90} est atteinte pour des doses respectives de 0,40 et 0,62 kGy.

Des études plus fines ont été réalisées sur des œufs récupérés à divers stades de développement; selon Elissalde (1993) les stades zygotes et larvaires seraient plus résistants.

Yeager & O'Brien (1983) ont réalisé des études d'irradiation γ (Tableau n°76) sur des œufs récupérés :

- soit à partir d'utérus de vers adultes,
- soit à partir de fèces de porc (avec et sans couche externe).

Tableau n°76 : Inactivation des œufs d'*Ascaris* dans les boues par radiations γ (Yeager & O'Brien, 1983).

Origine des œufs	Valeur de D_{90} (en kGy)*
Fèces de porc / avec couche externe	0,62
Fèces de porc / sans couche externe	0,45
Utérus de vers adultes / sans couche externe	0,45

* : Dose nécessaire pour une inactivation de 90% des organismes

Trois types d'œufs d'*Ascaris* sont utilisés pour la contamination artificielle de boues à irradier. Les résultats montrent le rôle protecteur de la couche externe vis à vis de l'irradiation, avec une valeur de D_{90} plus élevée dans le cas où les œufs possèdent la couche externe. Par contre aucune différence n'est visible concernant les œufs de fèces de porc ou d'utérus de vers adultes.

Les œufs d'*Ascaris* de porc provenant de fèces ont un stade de maturation plus long, avec le passage dans l'intestin de l'hôte, comparé aux œufs provenant de la dissection des utérus des femelles. Oksanen *et al.* (1990) ont montré que les œufs d'utérus disséqués et les œufs présents dans les fèces de porc ont une infectiosité identique. Pour cette raison, la pratique commune d'utilisation des œufs d'*Ascaris* disséqués à partir des vers femelles pour les expérimentations est justifiée.

2.3 Irradiation dans le traitement des boues et eaux usées

Les systèmes d'irradiations couramment utilisés dans des opérations de traitements de déchets sont les irradiations γ, les faisceaux d'électron (ou rayon β), les rayons ultraviolets et les rayons X.

- Les irradiations γ, produites par une source d'énergie radioactive au cobalt 60, ont été utilisées depuis les années 1960 pour la stérilisation des produits médicaux. A partir de 1974, leur effet hygiénisant ont été démontrés en Allemagne sur les boues, avec du Cobalt 60 comme source de rayons γ (Bryan, 1984). Les boues sont ensuite recyclées en agriculture et sur des terres de pâture. Thompson & Blatchley (1999) en travaillant sur la désinfection des effluents d'eaux usées avec une source au cobalt 60, montrent que les irradiations γ induisent une toxicité inférieure, en terme de survie et de reproduction de *Ceriodaphnia dubia*, à celle observée après la chloration.

- Les accélérateurs d'électrons (ou irradiations β) sont utilisés dans des procédés industriels. Les irradiations β permettent de détruire par oxydation avec un radical hydroxyl $OH^{\cdot}$ les molécules aromatiques toxiques de type benzène et toluène (Nickelsen *et al.*, 1994). L'efficacité de cette technologie a également été démontrée pour la désinfection des eaux usées aux USA (Kurucz *et al.*, 1991).

- Les irradiations par ultraviolets à des longueurs d'ondes de 254 nm sont employées pour le traitement des eaux usées comme alternatives à la chloration et à ses produits toxiques dérivés. Les rayons agissent sur l'ADN. Cependant il peut exister certains problèmes de photoréactivation pour des longueurs d'ondes supérieures à 320 nm et de réparation à l'obscurité, entraînant une reviviscence des bactéries (Montiel & Welté, 1992). L'efficacité des UV dépend de la turbidité dispersant et diffractant l'énergie lumineuse. De plus, une partie de l'énergie des rayonnements est absorbée par les matières en suspension. Par conséquent, l'irradiation par ultraviolets ne peut être appliquée pour la désinfection de boues résiduaires. Par ailleurs, les irradiations par UV, n'ont aucun effet sur la qualité chimique des eaux usées et/ou sur les molécules toxiques présentes (Iske *et al.*, 1996).

3 Objectifs

La prise de conscience du risque potentiel pour la santé publique a mis en évidence les méthodes insuffisantes et inappropriées du recyclage des déchets, stimulant ainsi la recherche de traitements alternatifs efficaces. En ce qui concerne les déchets, les difficultés sont de deux ordres :

- ils contiennent d'une part des substances chimiques toxiques,
- ils sont contaminés avec des microorganismes potentiellement infectieux, présents dans les déchets biomédicaux, dans les eaux usées et dans les boues urbaines.

La présence des œufs d'helminthes dans les effluents et les boues est rapportée par de nombreux auteurs (O'Donnell *et al.*, 1984; Bouchet, 1985; Carrington, 1985; Barbier *et al*, 1990; Rosaz, 1993; Horàk, 1994, Eriksen *et al.*, 1995; Forshell, 1995; Plachy *et al.*, 1995). Ces microorganismes sont caractérisés par une très grande résistance dans l'environnement (eau, sol, végétaux) associée à une faible Dose Minimale Infectieuse (DMI).

Cette étude doit permettre de tester l'impact sur les œufs d'*Ascaris* choisis comme modèle d'un nouveau procédé d'hygiénisation des boues résiduaires ne nécessitant ni traitement thermique, ni temps de contact importants. Par ailleurs l'irradiation par faisceaux d'électron (ou rayonnement β) possède la propriété de ne pas donner de déchets par rapport à l'irradiation γ nécessitant le retraitement des sources radioactives de Cobalt ou de Césium.

Par ailleurs les œufs de Nématodes intestinaux résistent à divers agents physico-chimiques (pH, température) impliqués dans des filières de traitement des eaux usées et des boues (Stien, 1989). La structure de la couche externe joue un rôle de protection et de barrière, ne laissant passer que des petites molécules comme l'oxygène et la vapeur d'eau (Foor, 1967). Il serait intéressant de tester les propriétés de la couche externe de l'œuf d'*Ascaris* face à l'irradiation.

Les objectifs sont donc de déterminer par cette étude :

⌦ les effets visibles de l'irradiation sur la morphologie et l'intégrité des œufs.

⌦ de mesurer les doses d'irradiation ovicides dans des milieux différents :

⇒ eau désionisée

⇒ boues contaminées avec différents types d'œufs.

Cette étude a été conduite en deux temps :

1. Une étude préliminaire visant à choisir les doses d'irradiation et ensuite à observer les conséquences de l'irradiation sur les œufs *d'Ascaris* :
   - destruction totale aboutissant à une disparition de l'œuf,
   - destruction du contenu se traduisant par une modification de la viabilité.

2. Des expérimentations sur plusieurs types d'œufs afin d'évaluer les cibles des radiations, nous avons sélectionné des œufs d'*Ascaris* :
   - à plusieurs stades de maturation,
   - en présence ou en absence de couche externe,
   - provenant de la dissection de vers femelles adultes ou d'extraction à partir de boues résiduaires.

Ce travail a nécessité un accélérateur électrostatique Van de Graaff et des œufs d'*Ascaris*. Pour une facilité d'approvisionnement, nous avons utilisé des œufs d'*Ascaris suum* (*Ascaris* de porc), car les œufs d'*Ascaris lumbricoïdes* (*Ascaris* parasitant l'Homme) sont très peu différents d'*Ascaris suum*. Aucun travail de recherche publié n'a jamais démontré de différence de comportement entre ces 2 types d'œufs.

Ce travail a été réalisé avec l'aide de Madame Arlette Chevallier de l'institut de Recherche subatomique (IReS à Strasbourg) ainsi qu'avec la collaboration de Monsieur Michel Letournel de la société Vivirad localisée à Handschuheim en Alsace.

4 Matériels et méthodes

4.1 Matériels

4.1.1 Outils

Pour le protocole d'extraction-purification des boues, nous avons utilisé :

⇒ Bain-marie Jouan J30 Bain Universel
⇒ Broyeur Waring Blendor : Poly Labo*réf.* 35061
⇒ Cellule de comptage Mac-Master 2x0,1 mL: Poly Labo*réf.* 99520
⇒ Cellule de comptage Sedgwick-Rafter de 1 mL : Thomas Scientific *réf.* 9851020
⇒ Centrifugeuse Jouan GT 422
⇒ Filtre Scrynel Polyester 102 µm : Poly Labo*réf.* 87440
⇒ Flacon de conservation en polypropylène 40 mL : Poly Labo*réf.* 96616
⇒ Polybroyeur de tissu 5 mL PV22 avec un piston en Téflon : Poly Labo*réf.* 06030
⇒ Support de filtration 25 mm avec seringue, surface de filtration 3,4 cm^2 : Poly Labo*réf.* 84827
⇒ Tamis d'analyse 160 µm en inox de 200 mm de diamètre sur 50 mm de hauteur : Retscho *réf.* 35061

4.1.2 Réactifs

4.1.2.1 Dissection des vers d'Ascaris

Solution de NaCl à 0,9%
Solution d'hypochlorite de sodium à 1,60 $mg.L^{-1}$
Solution antifongique-antibactérienne à 10% à partir d'ATBF (SIGMA cell culture *réf.* A5955).

4.1.2.2 Protocole de détermination de la concentration parasitaire

❶ $ZnSO_4$ de densité 1,3 à 573 $g.L^{-1}$ (Sulfate de zinc technique : Labosi *réf.* A4930653)
❷ H_2SO_4 à 0,1N (Acide sulfurique à 95-97% : Fluka Chemika *réf.* R00493)
2,8 mL d'acide à 95% et à 98,07 $g.mol^{-1}$ qsp à 1 L avec de l'eau désionisée
❸ H_2SO_4 à 0,1 N à 35% d'éthanol
2,8 mL d'acide et 350 mL d'éthanol absolu, qsp à 1 L avec de l'eau désionisée
❹ Ether rectapur (Diéthyl oxyde : Prolabo *réf.* 23 809.363)

4.1.3 Accélérateur d'électron

L'accélérateur électrostatique est de type Van de Graaff d'une puissance de 300 W opérant à 2 MeV. Les traitements d'irradiation sont réalisés à Strasbourg à la société Vivirad en collaboration avec l'Institut de Recherches Subatomiques. Afin de contrôler que les doses émises correspondent aux doses demandées, une dosimètrie est réalisée, basée sur la résonance des électrons des radicaux libres radioinduits de l'acide aminé alanine. L'irradiateur est entièrement automatisé.

4.1.4 *Ascaris*

Les *Ascaris* proviennent d'un abattoir de porcs (Cooperl Lamballe Côtes d'Armor). Le transport est effectué par camion frigorifique et les parasites sont disséqués dès leur arrivée au laboratoire.

4.1.5 Boues résiduaires

Nous avons utilisé des boues résiduaires à 12,15% de siccité, provenant d'une station d'épuration raccordée à un abattoir de porcs, ayant uniquement subi une sédimentation.

4.2 Méthodes

4.2.1 Récupération des œufs d'*Ascaris*

4.2.1.1 Obtention des œufs d'Ascaris avec et sans couche externe par rinçage des vers

Ils sont obtenus à partir de vers adultes d'*Ascaris suum*. Les œufs pondus par les femelles ont adhéré sur la cuticule des vers et sont récupérés par rinçages successifs avec une solution saline isotonique à 0,9% de NaCl.

✗ Œufs sans couche externe

La suspension d'œufs d'*Ascaris* sans couche externe s'obtient en 8 étapes :

- Les œufs d'*Ascaris* provenant du rinçage sont concentrés par sédimentation de l'eau de rinçage pendant 2 heures dans des flacons à col large de 1 litre en polypropylène placés dans un bain de glace pour limiter le développement de microorganismes.
- Le surnageant est éliminé, tandis que le concentrat est rincé et centrifugé 3 fois dans de l'eau désionisée à 400*g* pendant 5 minutes.
- Le culot est remis en suspension dans de l'eau désionisée et filtré à travers un filtre Scrynel en polyester 102 µm.
- La suspension filtrée est additionnée d'une solution d'hypochlorite de sodium titrant 1,60 $mg.L^{-1}$ pendant 2 heures pour ôter la couche externe.
- Elle est rincée et centrifugée 3 fois dans de l'eau désionisée à 400*g* pendant 5 minutes.
- Elle est additionnée d'une solution ATBF à 10%,
- Elle est numérée avec une cellule de Mac-Master, et stockée à 4°C.

A partir de la suspension mère obtenue, des suspensions d'un volume de 1 mL titrant 10, 25, 50, 75 et 100 œufs/mL sont préparées.

✗ Œufs avec couche externe

Le protocole est identique, seules les étapes n°4 et n°5 ne sont pas effectuées. Le culot remis en suspension est filtré et additionné d'une solution antifongique-antibactérienne puis numéré sur cellule de Mac-Master.

4.2.1.2 Obtention des œufs d'Ascaris par dissection

La dissection des vers s'effectue en 3 phases (*cf.* Second chapitre, 4.1.2.1 : Obtention des suspensions d'œufs d'*Ascaris*) :

- dissection des femelles pour récupérer l'appareil génital,
- récupération de la partie distale de l'utérus,
- obtention des œufs de l'utérus.

4.2.1.3 Détermination des concentrations en œufs d'Ascaris des boues résiduaires

Les boues sont mixées et tamisées puis subissent une flottation et une séparation par une solution diphasique. Le protocole de purification-concentration est le suivant :

Une quantité de boues correspondant à 10 g de matière sèche est mixée 20 secondes à 22 000 RPM avec un Broyeur Waring Blendor avec 200 mL d'eau désionisée

⇓

filtration sur tamis de 160 µm et sédimentation de 3 heures

⇓

aspiration du surnageant avec une trompe à vide
récupération du sédiment dans 1 flacon de 450 mL à centrifuger
centrifugation à 400*g* pendant 5 min

⇓

remise en suspension du culot avec 150 mL de $ZnSO_4$ (d=1,3)
repos de 10 min., puis centrifugation à 400*g* pendant 5 min.

⇓

récupération du surnageant dans 500 mL d'H_2O et sédimentation de 3 h

⇓

aspiration avec une trompe à vide du filtrat et récupération du sédiment dans 1 tube de 50 mL
centrifugation à 480*g* pendant 5 min.

⇓

ajout de 15 mL de solution acide-alcool et de 10 mL d'éther éthylique
remise en suspension par agitation mécanique et centrifugation à 660*g* pendant 5 min.

⇓

obtention de 3 phases : une phase aqueuse au fond du tube
une phase étherée en surface
et une interface en forme d'anneau composé des débris

⇓

aspiration avec une trompe à vide de la phase étherée, de l'anneau de débris et de la phase aqueuse
regroupement des culots

⇓

numération de la suspension sur cellule de Mac-Master.

4.2.1.4 Contamination parasitaire de la boue

Les échantillons de 20 mL à 4% de MS sont artificiellement contaminés pour atteindre une concentration finale par échantillon :

- d'une part de 200 œufs extraits de boues résiduaires soit 160 œufs/g de MS.
  Les œufs sont récupérés par extraction-purification d'une quantité de 8 kg de boues selon le protocole cité en 4.2.1.3 (Détermination des concentrations en œufs d'*Ascaris* des boues résiduaires). Le regroupement des différents extraits est réalisé avant la numération, qui est effectuée sur la suspension finale.

- d'autre part de 500 œufs provenant de la dissection de la partie distale de l'utérus, soit 400 œufs/g de MS.

La contamination avec les œufs obtenus par dissection est plus importante car les rendements du protocole d'extraction-purification sont généralement inférieurs avec des œufs qui possèdent de fortes propriétés d'adhésion. Les œufs des deux catégories sont au même stade unicellulaire. Les œufs extraits des boues se différencient par un passage dans l'intestin du porc qui leur confère une couche externe brune.

4.2.2 Irradiation des œufs d'*Ascaris*

4.2.2.1 Irradiation des œufs d'Ascaris dans de l'eau désionisée

Pour une pénétration homogène des rayonnements β dans les échantillons, les suspensions d'œufs sont irradiées dans des tubes à hémolyse en polypropylène pour laisser pénétrer les rayonnements; les tubes sont disposés horizontalement, de sorte que l'épaisseur de l'échantillon n'excède pas 5 mm.
L'irradiation est effectuée à 3 doses de 1, 5 et 10 kGy (Tableau n°77).

Tableau n°77 : Energie et intensité du faisceau d'électron de l'accélérateur électrostatique en fonction de la dose.

Dose (kGy)	Energie (MeV)	Intensité (µA)
1	2.2	50
5	2.2	100
10	2.2	100

4.2.2.2 Irradiation des œufs d'Ascaris dans les boues résiduaires

Pour avoir une irradiation homogène dans tout l'échantillon, les expérimentations sont effectuées sur des volumes de 20 mL dans des boîtes de Pétri de diamètre 60 mm, avec une épaisseur de boue ne dépassant jamais 5 mm. Les irradiations sont réalisées à des doses variant de 0,20 à 1,25 kGy à raison de 3 essais par dose avec une boue à 4% de MS (ou 40 $g.L^{-1}$).

4.2.3 Extraction des œufs d'*Ascaris* à partir d'échantillons de boues irradiées

La boue des échantillons irradiés est récupérée à partir des boîtes de Pétri, puis rincée à l'eau désionisée. La boue et les eaux de rinçages recueillies dans des tubes de 50 mL subissent le protocole d'extraction-purification proche de celui décrit en 4.2.1.3, mais qui a dû être adapté à une prise d'essai plus faible. Ainsi les étapes de mixage et tamisage ont été supprimées pour limiter les pertes.

centrifugation des 50 mL du mélange (échantillon et eau de rinçage) à 400*g* pendant 5 min.

⇓

addition de 20 mL de $ZnSO_4$ de densité 1,3 et homogénéisation par agitation manuelle
repos de 10 min. pour permettre la flottation des œufs
et centrifugation à 440*g* pendant 5 min. et récupération du surnageant (≈20 mL)

⇓

ajout de 30 mL d'eau désionisée au surnageant et centrifugation à 660*g* pendant 5 min.

⇓

addition de 15 mL d'une solution d'acide-alcool et de 10 mL d'éther au culot
agitation au vortex et centrifugation à 660*g* pendant 5 min.

⇓

rinçage du culot avec addition de 10 mL d'une solution acide sulfurique 0,1N
centrifugation à 660*g* pendant 5 min.

⇓

remise en suspension du culot avec 10 mL d'une solution acide sulfurique 0,1N
mise en incubation à 26°C pendant 3 semaines

⇓

centrifugation à 660*g* pendant 5 min.
numération de la suspension sur cellule de Sedgwick-Rafter.

4.2.4 Détermination du pourcentage d'œufs viables

Après les différents traitements, les tubes témoins et les échantillons sont mis à incuber à 26°C pendant 3 semaines dans un bain-marie. Les œufs sont observés au microscope ×100 sur cellule de Sedgwick-Rafter de 1 mL. Les œufs sont considérés comme viables lorsqu'une larve est visible à l'intérieur de la coque, les œufs non développés ou en cours d'embryogenèse sont considérés comme morts. Le pourcentage d'inactivation ou de perte de viabilité est déterminé à partir de la viabilité des œufs de la suspension des tubes témoins non irradiés.

$(V_{Echantillon} \times 100)/V_{Témoin}$= Pourcentage de viabilité ou $V_{Dose}(\%)$
$100 - V_{Dose}$ = Perte de viabilité ou le pourcentage d'inactivation

avec $V_{Echantillon}$ Pourcentage de viabilité lors de la lecture de l'échantillon irradié
avec $V_{Témoin}$ Pourcentage de viabilité lors de la lecture du témoin non irradié
et avec V_{Dose} Pourcentage d'œufs viables non affectés par les rayonnements.

Les échantillons subissent 6 niveaux d'irradiations de 0,20 0,40 0,50 0,75 1,00 et 1,25 kGy, avec une énergie de 2,2 MeV. Après les différents traitements, les témoins et les échantillons sont mis à incuber à 26°C pendant 3 semaines.

4.2.5 Détermination de la D_{90} et D_{100}

4.2.5.1 Détermination graphique

Une courbe est tracée à partir des pourcentages de viabilité obtenus pour les différentes doses d'irradiations. Nous déterminons graphiquement :

- la D_{100} ou dose minimale d'inactivation totale pour laquelle $V_{Dose} = 0\%$,
- la D_{90} ou dose minimale d'inactivation totale pour laquelle $V_{Dose} = 10\%$.

4.2.5.2 Détermination statistique

Il s'agit de déterminer la meilleure relation existant entre le pourcentage de viabilité et la dose. La mortalité est une fonction géométrique de la dose; il existe donc une relation linéaire liant le logarithme de la dose à la mortalité. Le pourcentage de mortalité est supposé être réparti de manière aléatoire autour de cette dose moyenne, donc suivre une loi Normale centrée sur cette dose. C'est pourquoi, il est utilisé non pas une relation directe entre le pourcentage de mortalité et le $\log_{10}$ de la dose, mais une relation entre l'écart centré réduit et le $\log_{10}$ de la dose.

Cet écart centré réduit est donné par la table des "probits". Cette table correspond à la table de la loi Normale centrée réduite, à qui l'on a fait subir une translation en ajoutant 5 à toutes les valeurs, de telle manière à ce qu'il n'y ait pas de valeur négative.

Connaissant les pourcentages de mortalité pour un certain nombre de doses, une méthode d'ajustement linéaire permet de calculer la meilleure relation existant entre le $\log_{10}$ de la dose et la mortalité. Cette méthode est réalisée sous la contrainte que les réactions individuelles (mort ou survie) suivent une distribution normale.

L'équation de la droite obtenue permet de déterminer les relations effet/dose pour une inactivation des œufs d'*Ascaris* de 90% et 99,9%.

5 Résultats des expérimentations sur les œufs d'*Ascaris*

5.1 Essais préliminaires d'irradiation des œufs d'Ascaris en eau désionisée

Les premières analyses s'attachent à déterminer si l'irradiation provoque une disparition physique des œufs ou simplement une désorganisation interne, avec des conséquences sur la viabilité et donc sur le pouvoir infectieux.

5.1.1 Effets des irradiations sur les concentrations et sur la viabilité des œufs

Nous avons effectué les analyses sur des œufs provenant de rinçages des vers avec une solution de chlorure de sodium à 0,9%. Nous avons préparé des suspensions d'un volume de 1 mL titrant 10, 25, 50, 75 et 100 œufs/mL à partir de la suspension d'œufs sans couche externe. Toutes les analyses ont été réalisées sur des œufs dont la couche externe a été éliminée, en triplicata avec un tube témoin pour chaque triplicata.

5.1.1.1 Effet de l'irradiation sur la population d'œufs d'Ascaris

Quelque soit la charge parasitaire, nous n'observons pas de différence significative entre les numérations effectuées sur les échantillons irradiés et les témoins. En effet à l'examen microscopique, les œufs ne sont pas éclatés, la coque semble intacte, seul l'embryon à l'intérieur de la coque est granuleux et détérioré. L'irradiation ne provoque pas de destruction physique de l'œuf d'*Ascaris*.

5.1.1.2 Effet de l'irradiation sur la viabilité des œufs d'Ascaris

Le tableau n°78 présente les résultats d'une étude de la viabilité réalisée à partir d'œufs sans couche externe.

Tableau n°78 : Pourcentages de viabilité pour les échantillons et les témoins en fonction des doses d'irradiation.

Dose (kGy)	Pourcentage des œufs viables (%)[c]	
	Témoin œufs non irradiés (n=5)[a]	Œufs irradiés (n=15)[b]
1	91,6±6,6	0,0±0,0
5	90,2±7,6	0,0±0,0
10	89,7±4,7	0,0±0,0

[a] : les 5 expérimentations pour chacune des 3 doses correspondent aux tubes témoins réalisés pour les 5 concentrations d'œufs (10, 25, 50, 75, 100 œufs/mL),

[b] : les 15 expérimentations pour chacune des 3 doses correspondent aux tests réalisés en triplicata pour les 5 concentrations d'œufs (10, 25, 50, 75, 100 œufs/mL).

[c] : moyenne±écart type

☞ Le pourcentage moyen de viabilité pour les témoins non irradiés est de 90,5±6,3%.

☞ Quelque soit les doses d'irradiation, nous ne retrouvons aucun œuf viable : $V_1=V_5=V_{10}=$ 0,0%. Les rayonnements à 1, 5 et 10 kGy inactivent totalement les œufs d'*Ascaris*.

Au vu de ces résultats (perte totale de la viabilité pour des œufs sans couche externe à une dose de 1 kGy), il a été décidé de poursuivre l'étude avec 2 types d'œufs (avec et sans couche externe) à des doses comprises entre 0,2 et 1,25 kGy.

Pour une homogénéité des résultats, les suspensions d'œufs sont préparées d'une manière identique à celles testées lors des essais préliminaires. Deux suspensions sont préparées à des concentrations de 50 œufs/mL d'eau désionisée, permettant de déterminer un pourcentage de la viabilité des œufs d'*Ascaris* après irradiation.

5.1.1.2.1 Détermination de la dose d'irradiation provoquant 100% d'inactivation des œufs d'*Ascaris* ou D_{100}

La figure n°44 représente l'effet de la dose d'irradiation sur le pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris* dans de l'eau désionisée. Les 3 témoins présentent une viabilité moyenne de 85,6±3,0%.

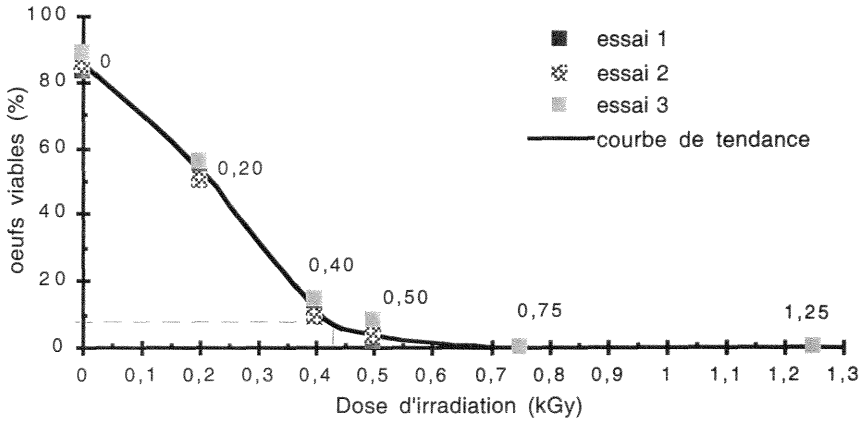


Figure n°44 : Relation entre pourcentage de viabilité et les doses d'irradiation sur des suspensions d'œufs sans couche externe.

☞ Après une exposition de 0,20 kGy, une diminution du pourcentage d'œufs viables est observable avec une viabilité de 53,4±2,9%.

☞ A partir de 0,75 kGy, aucun œuf viable n'est retouvé. La D_{100} est comprise entre 0,5 et 0,75 kGy

☞ La détermination statistique par les probits donne une $D_{99,9}$ de 0,96 kGy avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,74 à 1,23 kGy.

Sivinski (1975), Brandon (1978), et Horàk (1994) indiquent une D_{100} comprise entre 0,95 et 1,00 kGy. Yeager & Ward (1980) donnent une valeur supérieure avec 1,50 kGy. La valeur que nous avons déterminée est plus faible (D_{100} = 0,59 kGy), cette différence pourrait s'expliquer par une viabilité des témoins qui est seulement de 85,6±3,0%.

Sachant que la moyenne de la viabilité des témoins est de 85,6±3,0%, une perte de 90% de la viabilité conduit à un pourcentage de viabilité de 8,56% sur les échantillons irradiés.

☞ La D_{90} par détermination graphique (Figure n°3) donne une valeur comprise entre 0,40 et 0,45 kGy.

☞ La détermination statistique par les probits donne une D_{90} de 0,42 kGy avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,38 à 0,47 kGy.

Melmed & Comninos (1977) déterminent une D_{90} de 0,40 kGy pour une irradiation d'œufs d'*Ascaris* sans couche externe en suspension dans une boue liquide, soit une valeur en accord avec nos résultats. Par contre, Crewe & Owen (1983) indiquent une dose très élevée de 1,2 MRads soit 12 kGy pour tuer 75% des œufs d'*Ascaris suum* sans couche externe en suspension dans de l'eau.

5.1.2 Effet de l'irradiation sur la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*

L'expérimentation a pour but de déterminer si la présence de la couche externe protège l'œuf vis à vis d'agent physique comme l'irradiation. Des suspensions d'œufs avec et sans couche externe sont irradiées à 2 doses 0,2 et 0,3 kGy à raison de 10 échantillons pour chaque niveau, soit un total de 40 échantillons irradiés et 20 échantillons témoins.

La figure n°45 montre la diminution de la viabilité avec l'accroissement de l'intensité d'irradiation à 0,2 et 0,3 kGy pour des œufs d'*Ascaris* avec et sans couche externe dans de l'eau désionisée.

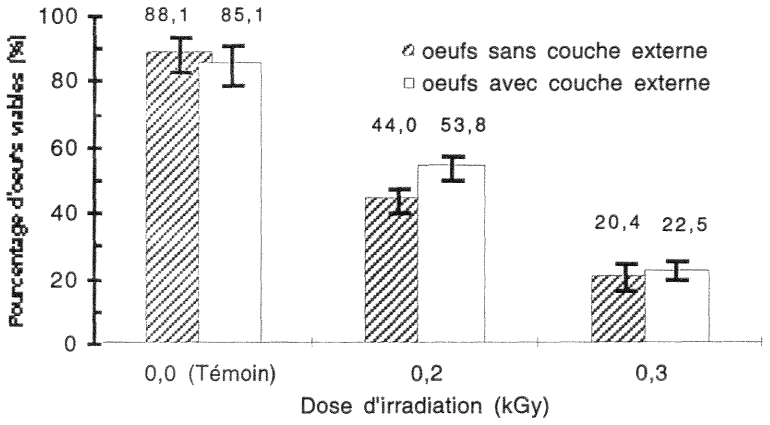


Figure n°45 : Pourcentage d'œufs d'*Ascaris* viables avec et sans couche externe en fonction des doses d'irradiation appliquées.

☞ Pour les 2 doses testées et quelque soit le type d'œufs, une diminution de la viabilité est visible, par comparaison aux témoins.

☞ Il existe une différence entre les pourcentages de viabilité des 2 lots d'œufs d'*Ascaris* à 0,2 kGy alors que cette différence disparaît à une dose de 0,3 kGy.

⇒ Pour une irradiation de 0,2 kGy, nous observons une viabilité supérieure avec les œufs complets possédant cette couche avec 53,8±3,7% d'œufs viables, au lieu de 44,0±3,9% de viabilité pour les œufs sans couche externe,

⇒ Pour une irradiation de 0,3 kGy, nous n'observons pas de différence significative avec 20,4±4,1% et 22,5±2,9% de viabilité pour des œufs sans et avec couche externe respectivement.

Après une irradiation de 0,2 kGy, le pourcentage d'œufs viables, est significativement plus élevé pour des œufs avec couche externe. Ces résultats semblent indiquer qu'à faibles doses d'irradiation la couche externe jouerait un rôle protecteur. Pour des doses d'irradiation plus élevées (0,3 kGy), aucune différence de comportement entre les 2 types d'œufs n'est constatée.

Ces observations sont en accord avec les travaux de Yeager & O'Brien (1983), qui observent également avec une irradiation de type γ, une D_{90} de 0,62 kGy pour des œufs possédant cette structure alors qu'elle était de 0,45 kGy pour des œufs sans couche externe.

5.2 Résultats des irradiations des œufs dans des boues résiduaires

Les précédentes analyses ont été réalisées en eau désionisée. Afin de vérifier si la présence de boues résiduaires modifie ou non les doses d'inactivation déterminées, nous effectuons des irradiations sur des échantillons de boues résiduaires contaminés :

- d'une part avec des œufs d'*Ascaris* provenant de dissection,
- et d'autre part avec des œufs d'*Ascaris* récupérés de boues contaminées.

La boue possède une concentration parasitaire initiale de 52±9 œufs d'*Ascaris* /10 g de MS déterminée par le protocole de purification/extraction cité en 4.2.1.3. Les échantillons sont de 20 mL à 4% de MS, soit une concentration initiale d'environ 4 œufs d'*Ascaris* par échantillon.

Pour tous les niveaux d'irradiation, les analyses sont effectuées en triplicata avec un témoin non-irradié.

5.2.1 Boues contaminées avec des œufs obtenus après dissection

✗ Première expérimentation

Les analyses sont effectuées avec une suspension d'œufs stockée à 4°C dont la viabilité est de 53,8±3,8%. Les tests sont réalisés en triplicata avec une contamination de 160 œufs par échantillon. Les résultats de l'effet de l'irradiation sur ces œufs d'*Ascaris* irradiés à 6 doses (de 0,20 à 1,00 kGy), sont représentés dans la figure n°46.

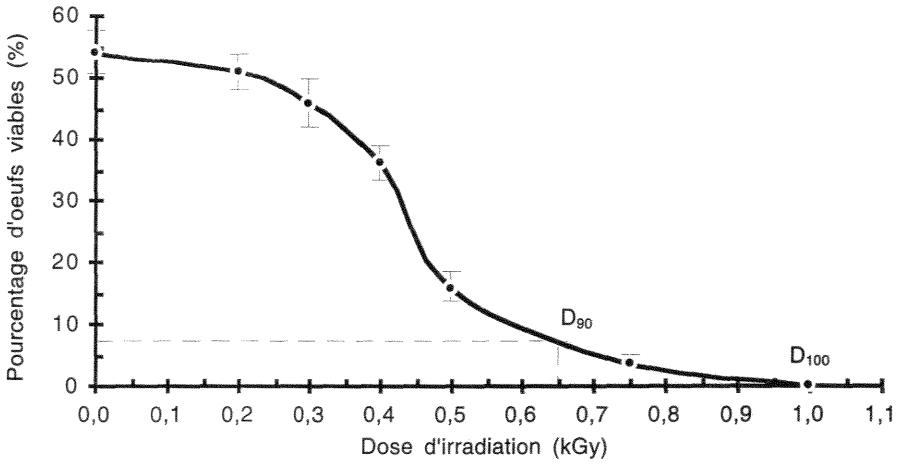


Figure n°46 : Pourcentage de viabilité des œufs après irradiation de boues contaminées en œufs d'*Ascaris* provenant de dissection.

☞ Dans l'échantillon irradié à une dose de 1,00 kGy, aucun œuf viable n'a été observé, la D_{100} est donc comprise entre 0,75 et 1,00 kGy.

☞ La D_{90} est d'environ 0,65 kGy par détermination graphique.

☞ La détermination statistique par les probits donne une D_{90} de 0,66 kGy avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,59 à 0,73 kGy.

Yeager & O'Brien (1983) indiquent une valeur de D_{90} de 0,45 kGy avec des irradiations par rayonnement γ. Leur étude était réalisée à partir d'une boue liquide dopée avec des œufs sans couche externe. Par contre, Horàk (1994) détermine une D_{90} de 0,70 kGy avec des irradiations par rayonnement β. Son travail a été effectué avec une boue de digestion aérobie (à 15% de MS) contaminée artificiellement avec des œufs provenant de dissection de la partie distale de l'utérus, à raison de 10^2-10^3 œufs/g de boue.

Il est à noter que le pourcentage de viabilité de la suspension témoin étant faible, les résultats obtenus ne reflétent peut être pas exactement la sensibilité réelle des œufs *d'Ascaris*.

✗ Seconde expérimentation

Pour examiner l'hypothèse d'une suspension d'œufs "fragiles", les expérimentations sont répétées avec une suspension d'œufs d'*Ascaris* fraîchement préparée dont la viabilité est de 85,3±5,2%. Les œufs sont irradiés à 8 doses de 0,10 à 1,00 kGy et les résultats sont représentés sur la figure n°47.

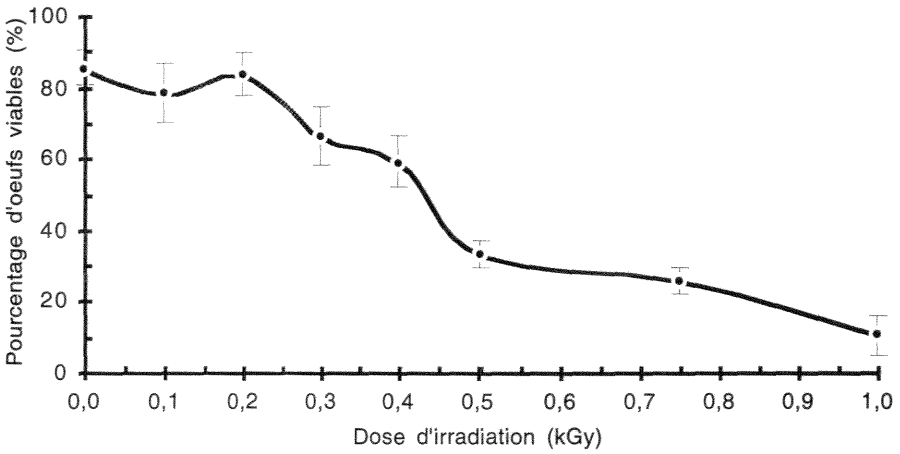


Figure n°47 : Pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris* après irradiation des boues contaminées en œufs provenant de dissection.

☞ La D_{90} est par détermination graphique de l'ordre de 1,00 kGy.

☞ La D_{100} ne peut être déterminée dans cette expérimentation mais elle est supérieure à 1,00 kGy.

☞ La détermination statistique par les probits donne une D_{90} de 1,12 kGy avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,80 à 1,58 kGy. La $D_{99,9}$ par le calcul des probits donne une dose élevée de 3,67 kGy avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 1,67 à 8,07 kGy.

Dans cet essai, si l'allure générale de la courbe traduit la même tendance que la première expérimentation, il faut signaler une plus grande variabilité des résultats avec des écarts-types importants pour les faibles doses d'irradiation. La courbe de la figure n°6 a plus de régularité que la courbe de la figure n°7. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que :

- dans une suspension stockée à 4°C, se trouverait une population plus homogène constituée par les œufs les plus résistants,
- à l'inverse dans la suspension d'œufs fraîchement préparée, il y aurait une population plus hétérogène d'œufs avec des sensibilités diverses aux irradiations.

Il est donc difficile de déterminer une dose létale en utilisant des œufs d'*Ascaris* provenant de dissection, ils n'ont pas tous la même sensibilité aux faibles doses d'irradiation.

5.2.2 Boues contaminées à partir d'œufs extraits de boues résiduaires

Les œufs récupérés à partir des boues présentent un pourcentage de viabilité de 84,2%. Les pourcentages de viabilité suivant les doses d'irradiation appliquées sont représentés sur la figure n°48.

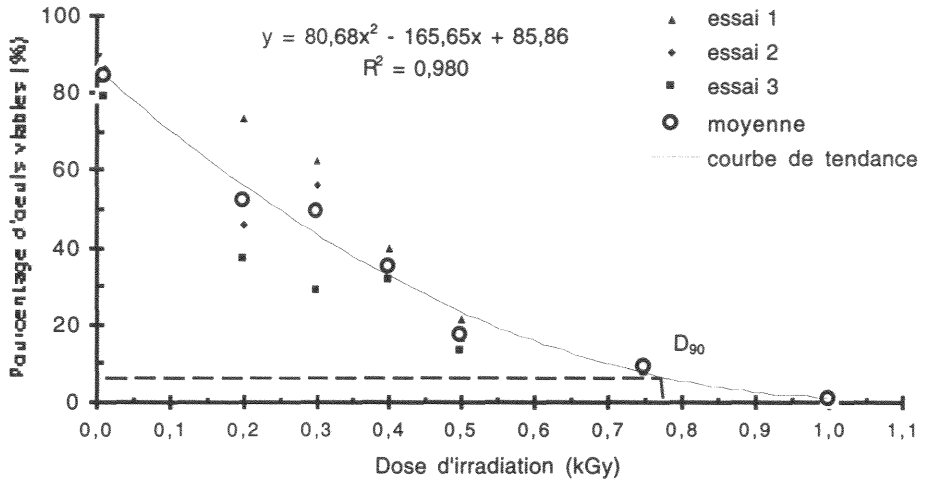


Figure n°48 : Pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris* après irradiation des boues contaminées en œufs extraits de boues résiduaires.

☞ Aucun œuf viable n'est observable pour une dose de 1,00 kGy. La D_{100} serait comprise entre 0,75 et 1,00 kGy.

☞ A partir de l'équation de la courbe de tendance, la D_{90} est estimée à 0,78 kGy.

☞ La détermination statistique par les probits donne une D_{90} de 0,79 kGy avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0,53 à 1,17 kGy. La $D_{99,9}$ par le calcul des probits donne une dose élevée de 3,05 kGy avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 1,14 à 8,16 kGy.

☞ Nous pouvons remarquer que les écarts entre les valeurs des triplicata sont faibles, sauf pour les doses de 0,20 et de 0,30 kGy où les pourcentages de viabilité oscillent fortement, l'impact des irradiations semble plus dispersif pour les doses de faible intensité.

Ce phénomène n'a pas été observé lors de l'irradiation à 0,20 et 0,30 kGy dans l'eau désionisée contaminée en œufs avec et sans couche externe provenant de dissection. La matrice boue semble être à l'origine de la présence des écarts-types, ce phénomène peut s'expliquer :

- soit par un problème méthodologique avec une difficulté d'extraction,
- soit par un rôle protecteur de la matrice boue.

Nous observons de légères différences entre les D_{90} déterminées par les pourcentages de viabilité et la transformation logarithmique des données. Tous les résultats sont regroupés dans la conclusion en vue d'une comparaison.

6 Conclusion

6.1 Effet sur la structure et sur la viabilité de l'œuf d'Ascaris

6.1.1 Conséquence visible de l'irradiation sur la structure de l'œuf d'*Ascaris*

Les numérations des suspensions parasitaires sur des échantillons non-irradiés et irradiés ne sont pas différentes. Par conséquent, l'irradiation n'entraîne pas la disparition des œufs par suite de rupture ou d'éclatement. L'embryon est atteint à l'intérieur de sa coque et se transforme en granules gris et denses. Les irradiations agissent en induisant des mutations sur l'ADN. Du fait de divisions cellulaires intensives durant la période du développement de la larve, les œufs de parasite sont très sensibles aux mutations génomiques provoquées par les irradiations (Yeager & O'Brien, 1983).

Horàk (1994) observe également après irradiation des altérations de développement des cellules germinales de l'œuf de Nématodes et une destruction interne de l'embryon. Il suppose que la perméabilité de l'enveloppe ne serait pas touchée. Les rayonnements pénétreraient probablement à l'intérieur de l'œuf sans modification des caractéristiques physiques de la couche externe. Les particules chargées interagiraient directement avec l'ADN de l'embryon, provoquant des mutations importantes du génome. L'embryogenèse est bloquée sans destruction de la structure du génome, l'embryon ne se développe pas et meurt donc à l'intérieur de sa coque. Cette mort se traduirait par la formation de granules denses à l'intérieur de l'embryon (Horàk, 1994).

6.1.2 Conséquence de l'irradiation sur la viabilité de l'œuf d'*Ascaris*

Bien que sa coque ne semble pas altérée, le pouvoir infectieux de l'œuf irradié est diminué, le tableau n°79 donne les doses provoquant une diminution de 90 et 100% de la viabilité.

Tableau n°79 : Effets de l'irradiation sur des œufs provenant de dissection ou extraits de boues résiduaires en fonction du milieu irradié.

Milieu irradié	Type d'œufs	Couche externe	D_{90} (kGy)	D_{100} (kGy)
Eau désionisée	provenant de dissection	absente	~ 0,43[a] 0,42±0,04[b]	0,50-0,75[a]
Boue résiduaire	provenant de dissection avec une suspension stockée à 4°C	absente	~ 0,65[a] 0,66±0,07[b]	0,75-1,00[a]
	provenant de dissection avec une suspension fraîchement émise	absente	~ 1,00[a] 1,12±0,15[b]	> 1,00[a]
	récupérés à partir de boue	présente	~ 0,78[a] 0,79±0,17[b]	0,75-1,00[a]

[a] : détermination graphique à partir des pourcentages de viabilité

[b] : détermination statistique par les probits : moyenne ± intervalle de confiance

La D_{100} n'a pas été déterminée par la méthode des probits. L'estimation d'une D_{100} est théorique et donne des valeurs extrêmes. Cependant, nous avons essayé de calculer les $D_{99,9}$; elles ont été calculées pour certaines analyses, mais ces doses estimées statistiquement ne relatent que ce qui est visualisé sur les figures.

6.1.2.1 Selon le milieu subissant l'irradiation

Les résultats montrent une différence des D_{90} ou D_{100} en fonction du milieu dans lequel est pratiquée l'irradiation :

- La D_{90} la plus faible enregistrée dans les boues est de 0,65 kGy, tandis que la D_{90} la plus forte enregistrée dans l'eau désionisée est de 0,45 kGy.
- Il en est de même avec la D_{100} où nous obtenons des valeurs de 1,00 kGy pour des irradiations dans des boues et une valeur maximale de 0,75 kGy dans de l'eau désionisée.

Ainsi, la D_{90} et la D_{100} dans la boue résiduaire sont significativement différentes de celles obtenues dans de l'eau désionisée.

Dans les mécanismes d'irradiations, nous avons vu qu'il existait des modes d'action de types direct et indirect. Dans un environnement dilué aqueux, la plupart des radiations produisent des altérations par action indirecte. Par contre, en présence de fortes concentrations en substances organiques, les effets sont de type direct (Yeager & O'Brien, 1983).

⇒ Dans nos échantillons de boue contaminée, riches en matière organique, l'action des rayonnements est majoritairement de type direct.
⇒ Dans nos échantillons d'eau désionisée contaminée, les effets par mode d'action indirecte sont plus importants. Par conséquent, durant l'incubation des échantillons, l'action des radicaux libres inactivant les œufs d'*Ascaris* se poursuit.

Dans les boues représentant un environnement complexe, l'inactivation par irradiation ionisante des microorganismes est probablement due exclusivement à un effet direct (Yeager & O'Brien, 1983). Crewe & Owen (1983) remarquent également qu'à dose identique, les œufs d'*Ascaris suum* présents dans de la boue sont moins inactivés que les œufs dans de l'eau. Ils émettent l'hypothèse que les particules de boues protègent les œufs des rayonnements.

6.1.2.2 Selon le type d'œufs d'Ascaris

6.1.2.2.1 Œufs provenant de dissection ou récupérés à partir de boue

Dans les boues résiduaires, il n'a pas été fait de différence de sensibilité selon la provenance des œufs *d'Ascaris* (dissection ou récupérés de boue).

6.1.2.2.2 Œufs avec et sans couche externe

⇒ Fortes doses d'irradiation

Il n'a pas été observé de différence de comportement entre les œufs d'*Ascaris* avec et sans couche externe pour des doses d'irradiation supérieures à 0,2 kGy.

⇒ Faibles doses d'irradiation

La couche externe protège l'œuf des faibles doses d'irradiations, la diminution du pourcentage de viabilité est plus importante pour les œufs ne possédant pas cette structure, avec une différence de viabilité de 13,3±8,8% entre les 2 types d'œufs, pour 0,2 kGy de dose irradiante. Pour une dose de 0,3 kGy, il n'a pas été montré de différence significative. Ces résultats sont en accord avec ceux de Yeager & O'Brien (1983) qui déterminent 2 valeurs de D_{90} en fonction de la présence ou absence de la couche externe de l'œuf : avec D_{90} = 0,62 et 0,45 kGy pour des œufs avec et sans cette structure externe respectivement.

D'après ces résultats, la couche externe recouvrant l'œuf offrirait des propriétés protectrices à l'embryon dans le milieu extérieur. En effet, cette structure de nature mucopolysaccharidique, permettrait un accroissement de la protection devant les faibles radiations naturelles telles que les radiations solaires.

6.2 Efficacité d'un procédé hygiénisant

Les œufs de Nématodes sont des embryons nécessitant pour leur développement larvaire, une étape d'un minimum de 3 semaines en environnement humide et tempéré. Un des points faibles de ce parasite est son passage du stade unicellulaire à un stade larvaire. Lors de divisions cellulaires intenses, les mutations provoquées par les irradiations entraînent des lésions de l'ADN (Poretti, 1988). L'embryon est dans l'impossibilité de se développer la larve.

L'irradiation semble un procédé d'hygiénisation efficace sur les œufs d'*Ascaris*, qui sont des indicateurs biologiques intéressants du fait de leur résistance à de nombreux traitements.

Notre étude sur les œufs d'*Ascaris suum* a permis de démontrer, qu'une dose de 1 kGy à une énergie de 2 MeV avec une hauteur d'échantillon inférieure à 8 mm est suffisante pour inactiver la totalité des œufs présents dans une boue résiduaire. Hashimoto *et al.* (1986) préconisent pour l'irradiation des boues des larges bandes de boues de fine épaisseur pour l'obtention d'une haute capacité de traitement. Pour une irradiation de 5 kGy appliquée sur une boue de 6,5 mm d'épaisseur à une dose de 65 MGy/h dans l'air, une énergie de 2 MeV sera nécessaire pour obtenir une distribution uniforme de la dose.

Farooq *et al.* (1993) comparent l'efficacité des irradiations γ au cobalt 60 et β sur les effluents d'eaux usées, avec 3 groupes de microorganismes (coliphages, coliformes fécaux et totaux) Pour une dose de 5 kGy, ils observent une réduction de 3 logs pour les 3 microorganismes. Cependant, l'inactivation avec les irradiations γ à doses similaires est supérieure de 1 à 2 ordres de magnitude comparée aux irradiations β.

6.3 Doses préconisées

Alors que les procédés industriels nécessitent des doses supérieures à 100 kGy, la stérilisation est effectuée avec des doses comprises entre 10 et 50 kGy. L'utilisation de l'irradiation en désinfection est réalisée avec des doses faibles de 5-10 kGy, qui provoquent alors une réduction très importante supérieure à 6 log des populations d'organismes.

Les résultats obtenus montrent que les doses nécessaires pour une inactivation de 100% des œufs d'*Ascaris* sont faibles, de l'ordre de 2 kGy. Il semble bien que le facteur limitant pour ce procédé soit la nécessité d'une fine épaisseur de boue.

Malgré cette restriction, ce procédé est retenu par US EPA en tant que traitement de type PFRP (Process to Further Reduce Pathogens) avec une dose de radiation recommandée de 10 kGy, largement calculée pour réaliser l'inactivation des œufs d'*Ascaris* est réalisée.

Etude métrologique du flux d'oeufs d'helminthes dans les eaux usées

ETUDE METROLOGIQUE DU FLUX D'ŒUFS D'HELMINTHES DANS LES EAUX USEES

Ce chapitre concernant les flux d'œufs d'helminthes dans les eaux usées se compose de 5 parties :

1 Etude bibliographique sur les œufs d'helminthes et la pollution des eaux pluviales 210

2 Objectifs 219

3 Matériels et méthodes 220

4 Résultats 226

5 Conclusion 249

1 Etude bibliographique sur les œufs d'helminthes et la pollution des eaux pluviales

Les œufs d'helminthes, parasites intestinaux de l'Homme et des animaux, se retrouvent dans le réseau urbain de collecte. Les concentrations d'œufs de parasites dans les eaux résiduaires dépendent du taux de contamination de la population, mais également des animaux domestiques et des oiseaux. En effet, lors des précipitations se produit un lessivage des surfaces urbaines et du réseau d'assainissement, les eaux pluviales contenant des œufs se cumulent dans les canalisations avec les eaux résiduaires urbaines.

1.1 Œufs d'helminthes dans les eaux résiduaires

1.1.1 Législation

Selon l'EPA (1992b), le contrôle des œufs d'helminthes parasites intestinaux pathogènes pour l'Homme concerne l'étude des Ascaridés (*Ascaris lumbricoïdes* et *Toxocara)*, des vers en forme de "fouets" (*Trichuris* sp.) des vers en forme de "ruban" (*Hymenolepis* sp. et *Taenia* sp.).

Cependant, il reste très difficile de différencier les œufs d'*Ascaris suum* parasitant le porc des œufs d'*Ascaris lumbricoïdes* parasitant l'Homme, lors de l'observation microscopique. De plus, les œufs de *Capillaria* (Nématodes) sont également pris en considération, car la capillariose est une infestation humaine fréquente dans certains pays.

Concernant la réutilisation des eaux brutes en irrigation, l'Organisation Mondiale pour la Santé a publié des directrices pour la réutilisation de l'eau usée en agriculture et en aquaculture (WHO, 1989). Afin de protéger contre le risque d'infection par les Nématodes, d'une part les consommateurs de végétaux irrigués et d'autre part les travailleurs en contact avec les eaux usées, l'OMS a déterminé une concentration seuil de 1 œuf/L d'eaux usées au dessus de laquelle, l'eau ne devrait pas être utilisée pour l'irrigation. Pour Blumenthal *et al.* (1996), des directives plus strictes devraient être requises, avec des concentrations ≤0,5 œuf/L pour protéger les agriculteurs et leurs familles, spécialement leurs enfants.

1.1.2 Pathologie et épidémiologie des œufs de Nématodes et Cestodes

1.1.2.1 Classification

Dans l'embranchement des Plathelminthes ou vers plats, Nozais et al. (1996) discernent différentes classes dont la classe des Cestodes qui nous intéressent plus particulièrement avec les familles des Teniidés (*Taenia*) et des Hymenolepididés (*Hymenolepis*). Dans l'embranchement des Némathelminthes ou vers ronds, il existe 3 classes dont la classe des Nématodes comportant des Ascaroidés (*Ascaris* et *Toxocara*) et des Trichuroïdés (*Trichuris* et *Capillaria*).

1.1.2.2 Pathologie et épidémiologie

Les parasitoses intestinales à helminthes sont provoquées par l'ingestion d'aliments ou d'eaux souillés par des excréments contenant des œufs d'helminthes pathogènes. Les œufs sont retrouvés dans les eaux résiduaires et se

concentrent dans les boues. Le risque parasitaire est lié à l'utilisation soit d'eaux usées non-traitées en irrigation, soit de boues non-hygiénisées en valorisation agricole. Différents Cestodes (*Taenia* et *Hymenolepis*) et Nématodes intestinaux (*Ascaris, Toxocara*, *Trichuris* et *Capillaria*) pathogènes pour l'Homme, susceptibles d'être rencontrés dans l'environnement sont passés en revue.

1.1.2.2.1 *Taenia*

Taenia est un ver plat segmenté mesurant jusqu'à 10 mètres de long. Il parasite l'intestin de l'être humain, après avoir transité chez le bœuf pour *Taenia saginata* ou chez le porc pour *Taenia solium*.

La téniase se manifeste surtout dans les régions où les surveillances vétérinaires du cheptel bovin ou porcin sont défaillantes, et dans les régions où la viande est consommée peu cuite. En effet, il faut d'une part que les animaux consomment une nourriture contenant des œufs provenant d'êtres humains contaminés et d'autre part que les cysticerques présents dans de la viande crue ou insuffisamment cuite soient ingérés par l'Homme.

Si la téniase est une parasitose généralement asymptomatique, il n'en est pas de même de la cysticercose, une affection causée par le développement des larves de *Taenia solium*, appelées *Cysticercus cellulosae*. Ces larves provoquent divers troubles, en particulier des troubles neurologiques, toujours plus graves que la parasitose causée par la présence du ver adulte dans l'intestin. L'infestation par les embryophores survient par l'intermédiaire des excréments humains qui souillent les aliments. On assiste alors à une cysticercose, comme chez le porc, dans ce cas l'être humain est considéré comme l'hôte intermédiaire du parasite.

1.1.2.2.2 Hymenolepis

Hymenolepis nana est le Cestode provoquant la plus commune des téniases humaines, elle survient surtout chez l'enfant, dans les pays du bassin méditerranéen, d'Asie ou d'Amérique latine. Ces vers plats mesurant de 10 à 50 mm de long, vivent par centaines dans l'intestin, mais la parasitose induite reste dans la plupart des cas asymptomatique.

Le cycle parasitaire peut être monoxène ou hétéroxène :

- Le mode habituel de contamination est réalisé sans hôte intermédiaire, l'œuf est avalé par l'Homme et se fixe aux villosités intestinales. En 72 heures, l'embryon hexacanthe devient un cysticercoïde. La villosité se rompt, libérant la larve qui devient adulte en 15 jours.
- Le cycle peut comporter un hôte intermédiaire, l'œuf est avalé par un insecte (blatte, ver de farine, puce, ...). Dans la cavité générale, l'embryon se transforme en larve infestante. L'ingestion accidentelle de ces insectes avec les aliments est alors le mode d'infestation de l'Homme.

1.1.2.2.3 Ascaris

Les symptômes varient selon la gravité de l'infestation, mais la parasitose reste asymptomatique la plupart du temps. Le passage des larves dans les poumons est généralement marqué par une réaction allergique locale.

Au niveau épidémiologique, l'ascaridiose est une parasitose intestinale cosmopolite, environ le quart de l'humanité serait parasité par des *Ascaris,* ver rond de 20 à 25 cm de long. Même si elle est présente dans tous les continents, l'ascaridiose est plus fréquente en zone tropicale, où plus de 50% de la population en est souvent atteinte. Les enfants âgés de 3 à 8 ans sont les plus affectés.

Concernant le cycle parasitaire, l'œuf émis dans le milieu extérieur devient infestant après 30 à 40 jours dans le milieu extérieur. Il peut vivre au ralenti jusqu'à ce qu'il soit ingéré par l'Homme avec des aliments souillés de terre ou de l'eau de boisson. Dans l'estomac de son hôte, il perd sa coque, la larve effectue alors une migration à travers le foie, le cœur, le poumon et remonte les bronches pour être déglutie. elle atteint sa forme adulte dans l'intestin pour y pondre 200 000 œufs par jours (Golvan, 1979).

1.1.2.2.4 Toxocara

La toxocarose est une parasitose provoquée par les larves de *Toxocara canis*. Chez l'être humain, ce ver n'atteint jamais l'état adulte, il y a une impasse parasitaire. Ce sont surtout les enfants de 16 mois à 4 ans qui sont atteints (les causes favorisantes sont la géophagie), ainsi que les individus en contact avec de jeunes chiens et chats.

La toxocarose est une pathologie de type de *Larva migrans* viscérale, car la maladie est provoquée par la présence des larves migrant du tube digestif pour s'installer dans différents organes. Les œufs ingérés avec la terre souillée par les déjections de chiens, parviennent dans l'estomac où les larves sont libérées (Bouchet & Léger, 1984).

1.1.2.2.5 Trichuris

La trichocéphalose est une parasitose intestinale, presque toujours bénigne, provoquée par un ver nématode, *Trichuris trichiura* ou Trichocéphale. Elle se rencontre partout dans le monde, toutefois, les régions chaudes, humides sont plus propices à la résistance de l'œuf embryonné. Richards (1993) estime à 355 millions de personnes parasitées par *Trichuris trichiura*. C'est la parasitose due à un Nématode la plus commune après l'ascaridiose et l'oxyurose. Dans certaines localités des Etats-Unis, l'incidence peut atteindre 20 à 25% chez les jeunes enfants (Schmidt & Roberts, 1977 cité par Richards, 1993) et cette verminose toucherait 10 à 20% des Français métropolitains (O'Fel, 1998).

Le cycle parasitaire est monoxène et ressemble à celui de l'*Ascaris*, les œufs libérés dans les selles s'embryonnent et ne deviennent infestants qu'en 6 à 12 mois dans le milieu extérieur et le restent plusieurs années sous nos climats, alors qu'il ne suffit que d'un mois dans les pays chauds pour obtenir un œuf mature et infestant (O'Fel, 1998). Les œufs embryonnés sont ingérés et éclosent dans l'intestin. Les larves libérées séjournent 10 à 15 jours dans la muqueuse du côlon et reviennent dans le lumière intestinale où elles atteignent une taille de 3 à 5 cm au stade adulte.

1.1.2.2.6 Capillaria

La capillariose est une infestation humaine rare, que l'on rencontre dans certains pays : 8% à Panama où la contamination se fait par consommation de foies crus de singes, mais elle a été signalée en Sibérie, aux Etats-Unis, en Europe orientale (Golvan, 1979). Le parasite est cosmopolite, pouvant évoluer chez de nombreux Mammifères, mais il n'entraîne aucune manifestation pathologique.

Capillaria hepatica est un voisin des Trichocéphales, c'est un Nématode de petite taille (20 mm de long), très fragile qui vit dans le foie et y pond des œufs. Tant que l'hôte est vivant, les œufs sont bloqués dans leur développement au stade 8 blastomères, ils ne sont libérés qu'à la mort de l'hôte infesté. Les œufs sont

disséminés dans la nature et s'embryonnent en 1 à 2 mois. Ingérés par un hôte définitif, les larves éclosent dans l'intestin et gagnent le foie.

1.1.3 Concentration en œufs d'helminthes dans les eaux usées

1.1.3.1 Données quantitatives

Les tableaux n°80 et n°81 indiquent les taux de contamination en œufs d'helminthes des eaux usées brutes de plusieurs pays.

Tableau n°80 : Concentrations en œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes (Gaspard, 1995).

	Concentration (en œufs/L)
France	0-8
Pays Européens	0-30
Pays Anglo-saxons	0-60
Pays en voie de développement	10-2000

Les concentrations parasitaires dans les eaux brutes sont variables d'un pays à l'autre. En Europe, elles s'échelonnent de 0 à 60 œufs d'helminthes/L. Dans les pays en voie de développement, elles sont plus élevées, avec des concentrations pouvant atteindre jusqu'à 2000 œufs d'helminthes/L (Gaspard, 1995). Dixo *et al.* (1995) trouvent des valeurs encore supérieures avec des contaminations maximales de 24 828 œufs par litre d'eaux usées brutes au Brésil (Tableau n°81).

Tableau n°81 : Concentrations en œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes.

Pays	Concentration	Référence
Afrique du Sud	93 et 125 œufs d'helminthes viables/L	Jagals & Lues (1996)
Mexico, Mexique	16-38 œufs d'helminthes/L	Jiménez *et al.* (1998)
Campina Grande, Brésil	8720-24828 œufs d'helminthes/L	Dixo *et al.* (1995)
Nakuru, Kenya	158 œufs d'helminthes/L	Ayres *et al.* (1993)
Ouarzazate, Maroc	13 œufs d'helminthes/L	El Hamouri *et al.* (1998)
El Azzouzia, Maroc	32 œufs d'helminthes/L	Mandi *et al.* (1992)
Marrakech, Maroc	4-32 œufs d'helminthes/L	Ouazzani *et al.* (1995)
Ismailia, Egypte	3-90 œufs d'helminthes/L	Stott *et al.* (1997)
Evora, Portugal	56,2 œufs d'helminthes/L	Marecos do Monte *et al.* (1996)
Kenya	17,5-133,3 œufs d'*Ascaris*/L	Grimason *et al.* (1996)
Ouagadougou, Burkina Faso	1-7 œufs d'*Ascaris*/L	Klutse & Baleux (1995)
Grand Cayman	0-32 œufs d'*Ascaris*/L	Ellis *et al.* (1993)
	0-273 œufs de *Trichuris*/L	
Chine	840 œufs d'*Ascaris*/L	Feachem *et al.* (1983)
Kharkov, Ukraine	60 œufs d'*Ascaris*/L	Feachem *et al.* (1983)

Les concentrations parasitaires dans les eaux brutes sont le reflet du niveau sanitaire de la population. Elles sont exprimées de manières variées, soit en œufs d'helminthes, soit en types d'œufs (*Ascaris* ou *Trichuris*). Par contre, Jagals & Lues (1996) nous renseignent sur le risque infectieux en indiquant les concentrations en œufs d'helminthes viables par litre d'eaux usées brutes.

1.1.3.2 Données qualitatives

Le tableau n°82 indique les fréquences relatives des différentes espèces rencontrées dans les eaux usées brutes.

Tableau n°82 : Fréquence relative des œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes à Baccarat et à Nancy (Stien, 1989), à El Azzouzia (Mandi *et al.*, 1992) et à Ismailia (Stott *et al.*, 1997).

Espèces	Baccarat, France	Nancy, France	El Azzouzia, Maroc	Ismailia, Egypte
Hymenolepis		4,5%	32,3%	38,0%
Taenia	36%	18,6%	15,3%	0,0%
Ascaris	48%	56,3%	23,1%	53,5%
Toxocara	16%	16,5%	0,0%	
Trichuris		4,1%	29,3%	3,5%
Autres				5,0%

Les fréquences relatives des espèces parasitaires sont différentes d'une station d'épuration à une autre. Les fréquences relatives des œufs de Nématodes sont supérieures aux fréquences des œufs de Cestodes. Les œufs d'*Ascaris* sont rencontrés en plus grand nombre dans 3 des 4 sites, par contre, à El Azzoouzia, *Hymenolepis* est l'espèce la plus observée.

1.1.4 Variations temporelles des concentrations

Les concentrations parasitaires dans les eaux ne sont pas constantes, elles dépendent des conditions climatiques, ainsi Bolbol (1992), Mandi *et al.* (1992), Klutse & Baleux (1995), Stott *et al.* (1997) et Edirisinghe & Weilgama (1997) ont montré l'existence de ces variations :

- En Arabie Saoudite, Bolbol (1992) décrit des variations significatives des concentrations parasitaires dans des eaux municipales traitées en fonction de la saison. Les plus fortes concentrations sont retrouvées en hiver avec des échantillons d'eaux usées contenant jusqu'à 100 œufs d'*Ascaris* /L. Les températures élevées de l'été sembleraient avoir un effet léthal sur la plupart des pathogènes intestinaux.
- Dans la région d'El Azzouzia, zone d'épandage des eaux usées brutes de la ville de Marrakech, les concentrations en œufs d'helminthes varient en fonction de la saison, de 0 à 120 œufs par litre d'eaux usées brutes avec une valeur moyenne annuelle de 32 œufs/L, et des concentrations maximales observées en octobre et en décembre (Mandi *et al.* 1992).
- Dans une zone soudano-sahélienne, Klutse & Baleux (1995) retrouvent des œufs de Nématodes dans des eaux usées brutes, présents dans 50% des échantillons avec des concentrations variant de 0 à 23 œufs/L, les concentrations maximales étant rencontrées d'octobre à décembre.
- A Ismailia en Egypte, Stott *et al.* (1997) trouvent des concentrations maximales de 42 œufs/L d'eaux usées durant les mois les plus secs d'août en octobre (Tableau n°83).

Tableau n°83 : Variations saisonnières des concentrations en œufs de Nématodes dans les eaux usées brutes à Ismailia. (Stott *et al.*, 1997).

Saison	Concentration moyenne
Automne (août à octobre)	42 œufs/L
Hiver (novembre à janvier)	29 œufs/L
Printemps (février à mars)	14 œufs/L
Eté (mai à juillet)	30 œufs/L

Ellis *et al.* (1993) sur 18 prélèvements mensuels d'eaux usées dans les îles du Grand Cayman, trouvent seulement 2 échantillons positifs avec une concentration conséquente de 32 œufs d'*Ascaris*/L en octobre et de 273 œufs de *Trichuris*/L en janvier. Les concentrations sont donc fluctuantes et dépendraient des conditions climatiques.

1.2 Eaux pluviales

1.2.1 Flux d'eaux pluviales et résiduaires

Herrmann & Klaus (1997) déterminent les flux d'eaux résiduaires et pluviales par équivalent habitant et par jour, pour une ville dont la pluviométrie annuelle est estimée à 850 mm.

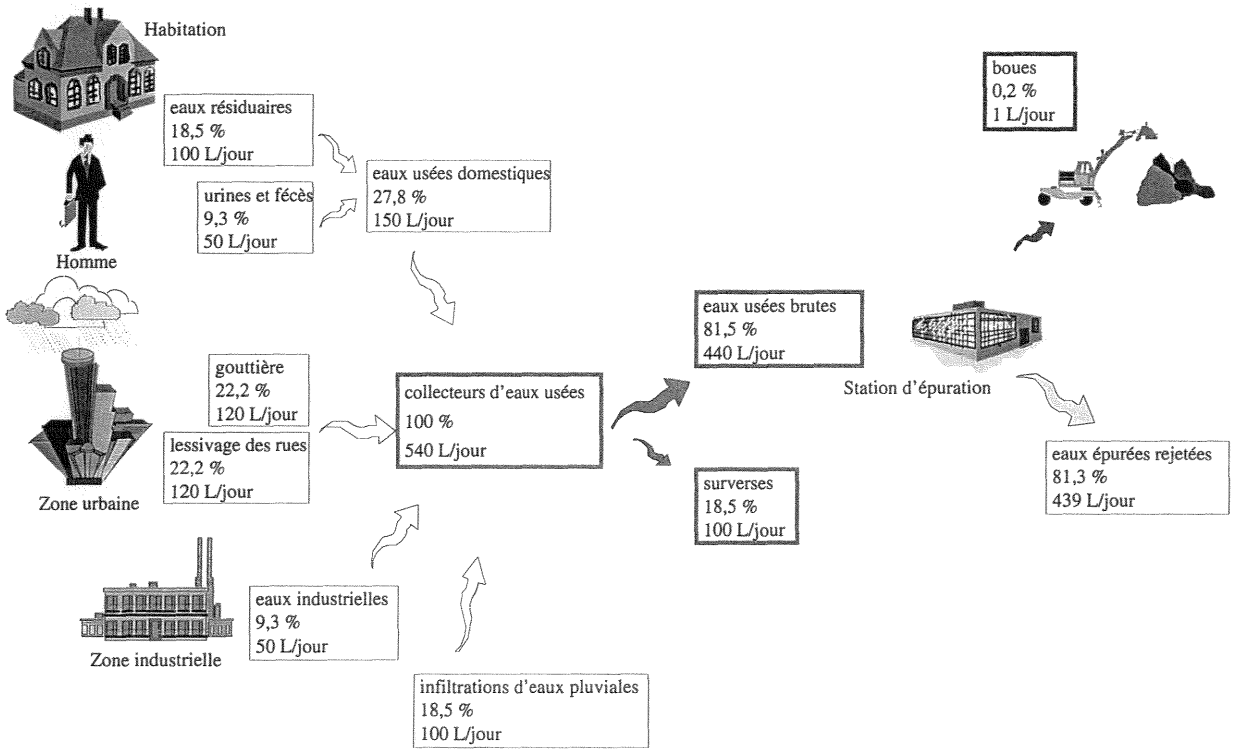


Figure n°49 : Représentation des flux moyens d'eaux usées par individu et par jour dans un réseau d'assainissement unitaire (Herrmann & Klaus, 1997).

L'apport des eaux pluviales est important, en effet, sur les eaux transportées par les collecteurs du réseau d'assainissement urbain, le pourcentage des eaux d'origine pluviale est de 62,9%. Herrmann & Klaus (1997) différencient :

- les eaux de gouttières ou de lessivage représentant une part importante avec 44,4% des eaux arrivant à la station,
- les eaux pluviales s'infiltrant dans le sol ont été estimées, à 18,5% des eaux brutes,
- les eaux usées domestiques représentant 27,8% des eaux brutes,
- les eaux industrielles avec un pourcentage plus faible de 9,3%.

Lors d'orage, toutes les eaux brutes ne sont pas traitées par la station d'épuration. Les surverses rejettent en moyenne 18,5% des eaux usées brutes (pluviales, domestiques et industrielles), contenant les matières en suspension charriées par les pluies.

1.2.2 MES dans les eaux pluviales

1.2.2.1 Concentration des MES dans les eaux pluviales

La pollution en MES des eaux pluviales urbaines (Trabuc, 1989; Bachoc & Chebbo, 1992), mesurée au cours de multiples campagnes est importante :

- en concentration, elle est équivalente ou supérieure à la pollution des eaux usées,
- en flux rejetés, elle est très nettement supérieure à la pollution des eaux usées,
- en quantité annuellement déversée par une agglomération, elle est comparable ou supérieure à celle des rejets des stations d'épuration.

Ainsi, Welker *et al.* (1999) indiquent les concentrations en MES pour 4 types d'eaux :

- eaux pluviales provenant du lessivage des rues : 600 $mg.L^{-1}$
- eaux pluviales provenant du ruissellement des toits : 50 $mg.L^{-1}$
- eaux résiduaires par temps sec (avant traitement) : 280 $mg.L^{-1}$
- eaux résiduaires épurées (après traitement) : 20 $mg.L^{-1}$

Selon Gromaire-Mertz *et al.* (1999), les concentrations en MES variant de 49 à 498 $mg.L^{-1}$ selon l'épisode pluvieux, avec une valeur médiane de 92,5 $mg.L^{-1}$. Pour 15% des échantillons d'eaux pluviales prélevés au centre de Paris, les concentrations en MES sont égales ou supérieures à celles des eaux usées (estimées en moyenne à 150 $mg.L^{-1}$).

1.2.2.2 Apports massiques des MES

1.2.2.2.1 Apport des MES selon l'intensité orageuse

Uchimura *et al.* (1997) évaluent les concentrations maximales et les charges en MES dans les eaux pluviales drainant une surface de 5 hectares, lors de 6 épisodes orageux survenus dans une ville japonaise (Tableau n°84).

Tableau n°84 : Apport des MES par les eaux pluviales de 6 orages survenus au Japon (Uchimura *et al.*, 1997).

Date	Pluviométrie	Valeur maximale	Charge
12 mai 1995	16,0 mm	135 $mg.L^{-1}$	3,75 $kg.ha^{-1}$
15 mai 1995	25,2 mm	156 $mg.L^{-1}$	5,61 $kg.ha^{-1}$
29 mai 1995	2,7 mm	153 $mg.L^{-1}$	0,23 $kg.ha^{-1}$
3 juin 1995	30,0 mm	242 $mg.L^{-1}$	14,07 $kg.ha^{-1}$
8 juin 1995	13,0 mm	222 $mg.L^{-1}$	2,43 $kg.ha^{-1}$
13 juin 1995	6,8 mm	223 $mg.L^{-1}$	0,53 $kg.ha^{-1}$

Les échantillons d'eaux prélevés dans un collecteur pluvial, montrent les charges en matières en suspension apportées par les précipitations. Les quantités de MES sont fonction de l'intensité de l'orage, avec une charge faible de 0,23 $kg.ha^{-1}$ pour une pluviométrie de 2,7 mm et une charge importante de 14,07 $kg.ha^{-1}$ pour une pluviométrie conséquente de 30,0 mm.

1.2.2.2.2 Apports annuels des MES

D'un point de vue massique, la pollution engendrée par les MES, peut atteindre des quantités importantes pour des collecteurs pluviaux. Le tableau n°85 permet d'évaluer ces apports massiques pour les MES selon le type de rejet et par unité de surface imperméabilisée (recouverte de béton, bitume, pavés...).

Tableau n°85 : Apports annuels des MES dans des eaux pluviales et dans des eaux résiduaires.

Type de rejets	Nature de l'eau	Charge annuelle (en $kg.ha^{-1}$ imperméabilisé)	Auteurs
Exutoires de bassins versants strictement pluviaux	pluviale	200 à 2300	Bachoc &Chebbo (1992)
Rejets pluviaux de réseaux séparatifs	pluviale	500 à 2000	Trabuc *et al.* (1989)
Collecteurs pluviaux	pluviale	503 à 2278	Philippe & Ranchet (1987)
Collecteurs pluviaux	pluviale	1000 à 2000	Chocat (1997)
Surverses de réseau unitaire	pluviale et résiduaire	800 à 4000	Trabuc *et al.* (1989)
Collecteurs unitaires	pluviale et résiduaire	744 à 1650	Philippe & Ranchet (1987)
Rejets de station d'épuration	résiduaire	200 à 340	Trabuc *et al.* (1989)

Les masses annuelles de MES déterminées dans les eaux pluviales s'échelonnent de 200 à 2300 $kg.ha^{-1}$ de surface imperméabilisée. Dans les eaux résiduaires, la pollution des MES est comprise entre 200 à 340 $kg.ha^{-1}$, alors que dans les réseaux unitaires collectant des eaux pluviales et résiduaires, elle est supérieure et varie de 744 à 4000 $kg.ha^{-1}$.

Il existe d'autres apports qui ne sont pas pris en compte dans le tableau n°22, d'une part les eaux usées s'écoulant pendant le ruissellement, et d'autre part les dépôts qui peuvent se constituer par temps sec dans le réseau unitaire, qui sont alors remis en mouvement par temps de pluies. Cette dernière contribution, principalement constituée des particules les plus légères et les plus organiques, pourrait atteindre un tiers de la masse annuellement transportée (Bachoc & Chebbo, 1992).

1.2.3 Comparaison entre MES et œufs d'*Ascaris*

1.2.3.1 Granulométrie des MES

Une étude sur la granulométrie des solides en suspension, montre une prédominance de particules inférieures à 100 µm parmi les solides transférés en suspension à l'aval des réseaux d'assainissement. Le pourcentage massique des particules de dimension inférieures à 100 µm est de l'ordre de :

- 66-85%, avec un diamètre médian variant entre 25 et 44 µm (Chebbo, 1981),
- 58 à 91% avec un diamètre médian variant entre 22 et 75 (m (Jacobin et al., 1999).

Il a également été remarqué que :
- a proportion massique des particules de dimension supérieure à 100 (m est plus forte dans les réseaux unitaires que dans les réseaux séparatifs,
- les caractéristiques granulométriques des solides transférés en suspension dépendent des caractéristiques de l'événement pluvial.

*1.2.3.2 Dimension des oeufs d'*Ascaris

Les œufs d'helminthes étudiés sont ellipsoïdes de 50 à 75 µm de long sur 40 à 60 µm de large (Fairbain, 1957). Les fortes pluies lessivant les zones urbaines et les réseaux d'assainissement, transporteraient, dans ces conditions, les œufs vers la station d'épuration.

Les œufs ayant les mêmes caractéristiques que les particules solides inférieures à 100 µm, pourraient représenter une partie de la pollution des eaux pluviales.

2 Objectifs

Pour progresser dans la protection des milieux aquatiques vis à vis les pollutions engendrées par les rejets urbains en temps de pluies, il fallait améliorer la connaissance des phénomènes. Beaucoup des données ont été acquises au cours des dix dernières années. Il est maintenant établi que le problème n'est pas seulement de traiter le premier flot d'orage (Ballay & Blais, 1998).

La conception des stations d'épuration vise de plus en plus souvent à traiter le débit maximum en acceptant éventuellement une dégradation passagère de la qualité de l'eau épurée dès lors que le traitement n'est pas perturbé durablement. Parallèlement, à côté des techniques alternatives, visant à réduire les débits de pointe, des installations spécifiques ont été développées pour les débits supplémentaires par temps de pluie (Ballay & Blais, 1998).

Notre étude, réalisée sur de district de l'agglomération, s'attache à déterminer les quantités d'œufs d'helminthes présents dans les eaux brutes, en absence et en présence d'évènements pluvieux.

Différents types d'analyses d'eaux usées sont réalisés afin d'une part de mesurer le flux d'helminthes entrant dans la station d'épuration avec détermination du nombre d'œufs d'helminthes, et d'autre part d'évaluer leur pouvoir infectieux avec l'étude de leur viabilité.

Nous avons réalisé en entrée de la station de Nancy-Maxéville, après le dégrillage :

- 17 campagnes de 3 jours consécutifs, représentant 51 prévèlevements moyens de 24 heures permettant de déterminer :
  - le pourcentage de viabilité des œufs de Nématodes,
  - les concentrations moyennes en œufs d'helminthes,
  - les quantités d'œufs helminthes entrant dans la station de traitement en une journée.
- 9 campagnes de 24 heures, représentant 189 échantillons moyens de 1, 2 ou 3 heures, dans le but d'étudier les variations des concentrations en œufs d'helminthes sur une journée.
- 4 échantillons en relation avec les matières en suspension :
  - des eaux de dessablage,
  - des eaux de rinçage du dessablage,
  - des eaux de curage d'égouts,
  - des eaux de rinçage de bassin de rétention des eaux pluviales.

Nous avons comparé les concentrations et les quantités d'œufs d'helminthes aux donneés sur les précipitations et sur les MES, dans le but de mettre en évidence des corrélations éventuelles entre les évènements pluvieux et les variations de concentrations parasitaires.

3 Matériels et méthodes

3.1 Matériels

3.1.1 Outils

- Préleveur automatique de type ISCO-ROUCAIRE modèle 1580,
- Cellule de comptage Sedgwick-Rafter de 1 mL : Thomas Scientific réf. 9851020,
- Tamis d'analyse 160 µm en inox de 20 cm de diamètre sur 5 cm de hauteur : Retscho réf. 35061.

3.1.2 Réactifs

$ZnSO_4$ de densité 1,3 à 573 $g.L^{-1}$ (Sulfate de zinc technique : Labosi réf. A4930653)

H_2SO_4 à 0,1N (Acide sulfurique à 95-97% : Fluka Chemika réf. R00493)

2,8 mL H_2SO_4 à 95% qsp 1 L avec de l'eau désionisée

H_2SO_4 à 0,1N à 35% d'éthanol

2,8 mL d'acide et 350 mL d'éthanol à 95°, qsp 1 L avec de l'eau désionisée

Ether rectapur (Diéthyle oxyde : Prolabo réf. 23 809.363)

3.2 Méthodes

3.2.1 Prélèvements

3.2.1.1 Prélèvements mensuels

Des prélèvements moyens d'eaux brutes de 20 litres sur 24 heures sont réalisés en entrée de station, après le dégrillage et avant le dessablage, tous les mois à raison de 3 campagnes successives. Un échantillon de 200 mL est aspiré toutes les 15 min par un préleveur automatique.

3.2.1.2 Prélèvements journaliers

Les variations des concentrations en œufs d'helminthes sont étudiées lors de 9 campagnes. Les dates des différentes campagnes sont :

1 :	16-17	avril	1996
2 :	23-24	avril	1996
3 :	25-2	avril	1996
4 :	6-7	novembre	1996
5 :	20-21	novembre	1996
6 :	8-9	mai	1997
7 :	5-6	juin	1997
8 :	19-20	août	1997
9 :	26-27	août	1997

Les prélèvements moyens s'effectuant après le dégrillage et avant le dessablage sont réalisés de 6 heures à 6 heures le lendemain matin.

de 6 heures à 24 heures	18 prélèvements moyens de 1 heure chacun
de 24 heures à 6 heures	3 prélèvements moyens de 2 heures

Un volume de 625 mL est aspiré toutes les 2,5 minutes sur une période de 1 heure, formant un volume final de 15L. Pour des prélèvements nocturnes, les échantillonnages sont effectués sur des périodes de 2 heures, le temps entre 2 aspirations est de 5 minutes.

3.2.1.3 Prélèvements des eaux de curage

Quatre échantillons de 25 et 23 L ont été analysés :

eaux de dessablage (23 L)
eaux de rinçage du dessablage (23 L)
eaux de curage d'égout (25 L)
eaux de rinçage de bassin de rétention des eaux pluviales (25 L)

3.2.2 Traitement des échantillons

3.2.2.1 Echantillons d'eaux usées

Le protocole peut être séparé en 3 étapes :

(une filtration sur tamis de porosité 160 µm pour élimination les débris les plus grossiers.

- une flottation au $ZnSO_4$ de densité 1,3 permettant une récupération des œufs sur le surnageant
- une étape diphasique couplant du diéthyle éther, avec une solution acide sulfurique à 0,1N contenant 30% d'éthanol, elle permet l'élimination du sédiment.

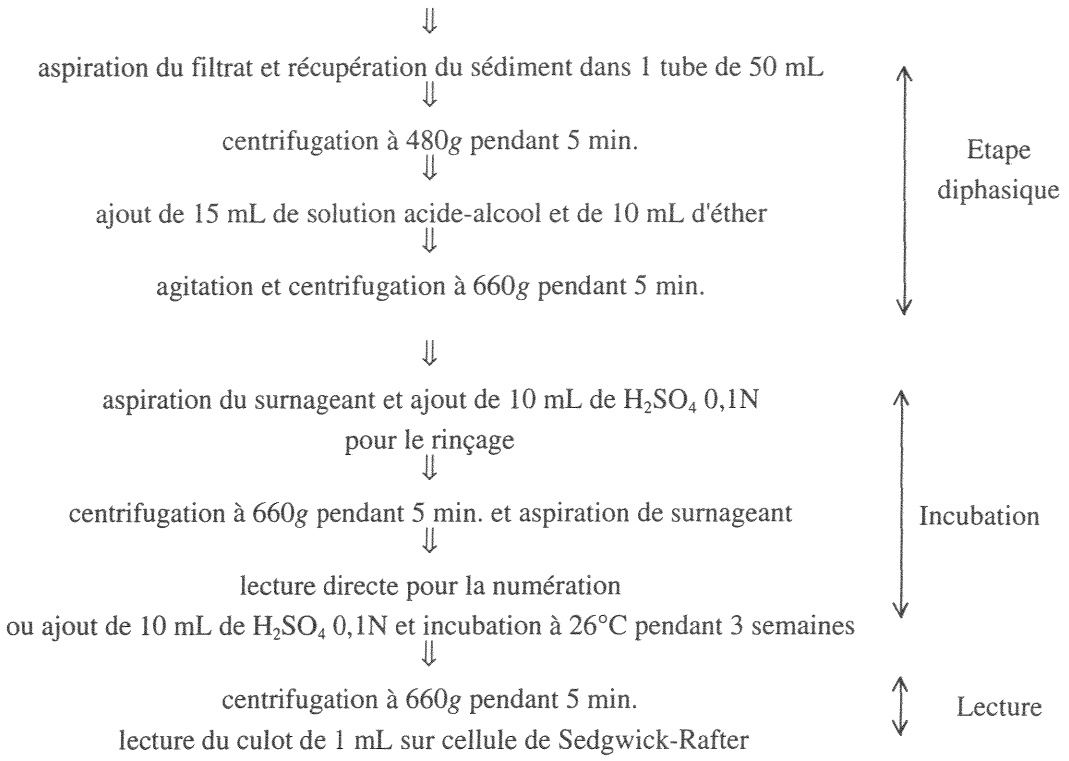
Le protocole de purification-concentration est le suivant :

sédimentation 3 heures des échantillons prélevés
puis aspiration du surnageant par une trompe à vide
⇓
filtration du sédiment sur tamis de 160 µm avec 5 L d'eau
⇓
sédimentation de 3 heures ou une nuit

Tamisage

⇓
aspiration du surnageant
et récupération du sédiment dans 1 flacon de 450 mL à centrifuger
⇓
centrifugation à 400*g* pendant 5 min.
⇓
remise en suspension et homogénéisation du culot avec 150 mL de $ZnSO_4$
et centrifugation à 400*g* pendant 5 min.
⇓
récupération du surnageant dans 500 mL d'H_2O et sédimentation de 3 heures

Flottation



3.2.2.2 Echantillons d'eaux de curage du réseau d'assainissement

Les échantillons étant d'un volume supérieur à 20 litres, nous avons réalisé les analyses sur des aliquotes. Nous avons effectué les étapes suivantes :

- sédimentation de l'échantillon pendant 12 heures,
- aspiration du surnageant par une trompe à vide,
- tamisage à 160 µm, et sédimentation de 12 heures,
- aspiration du surnageant par une trompe à vide,
- homogénéisation du sédiment et 3 aliquotes (Tableau n°86) sont prélevés pour l'analyse,
- centrifugation à 400*g* pendant 5 minutes dans des pots de 450 mL
- ajout de 150 mL de $ZnSO_4$ pour réaliser l'étape de flottation (*cf.* 3.2.2.1),
- réalisation des étapes diphasique, d'incubation et de lecture de la suspension (*cf.* 3.2.2.1).

Le tableau n°86 indique les volumes des différents échantillons initiaux, du sédiment et des aliquotes :

Tableau n°86 : Volumes des différents échantillons initiaux, du sédiment et des aliquotes.

Volume ou masse	eaux de dessablage	eaux de rinçage du dessablage	eaux de curage d'égouts	eaux de rinçage d'un bassin pluvial
Echantillon initial	23 L	23 L	25 L	25 L
Sédiment après tamisage	5,2 L	0,5 L	455 g	737 g
Aliquote	150 mL	100 mL	112 g	60 g

A partir les 3 culots obtenus, 2 tubes sont mis en viabilité à 26°C pendant 3 semaines, le troisième a servi pour une quantification immédiate du nombre d'helminthes.

3.2.3 Critères de détermination de la viabilité

Le nombre d'œufs d'helminthes donne une indication quantitative mais en terme de danger, il ne peut être estimé qu'à travers la viabilité. A côté de la concentration est donc déterminé le pourcentage d'œufs de Nématodes viables.

Elle est déterminée par la morphologie des œufs de Nématodes et par la présence d'une larve à l'intérieur de l'œuf après une incubation de 3 semaines à 26°C :

* *Toxocara* sp. (œuf non-embryonné, embryon en formation et œuf au stade larvaire)
* *Ascaris* sp. (œuf non-embryonné et 2 œufs au stade larvaire)
* *Capillaria* sp. (œuf non-embryonné et œuf au stade larvaire)
* *Trichuris* sp. (œuf non-embryonné et œuf au stade larvaire)
* *Hymenolepis*
* *Taenia*

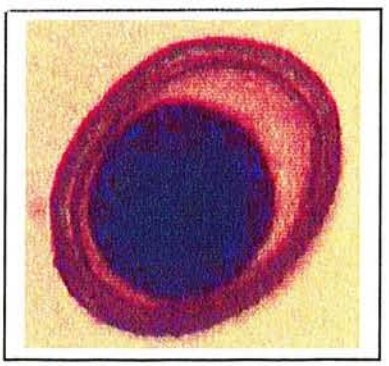
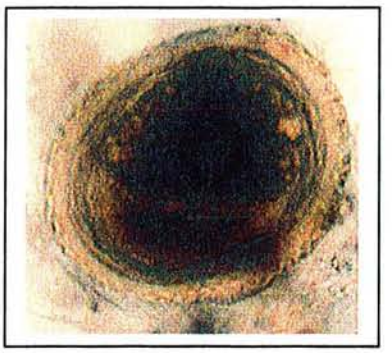
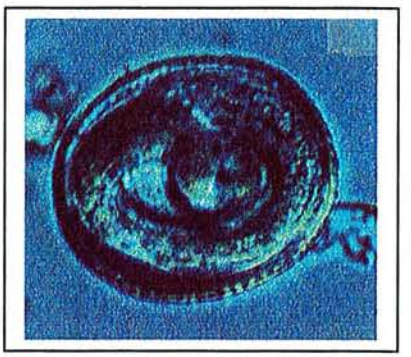
Nous discernons :

- des œufs non viables, où l'embryon ne s'est pas développé lors de l'incubation (ou est en cours de développement) : ainsi les œufs aux stades 2, 4 ou 8 cellules, ou au stade *morula* et *blastula* ne sont pas comptabilisés dans la catégorie des œufs viables.
- des œufs viables, où l'embryon s'est transformé en une larve L_1 : les larves visibles à l'intérieur des œufs sont également comptabilisées comme correspondant à des œufs viables.

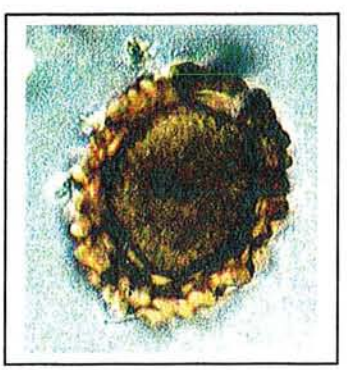
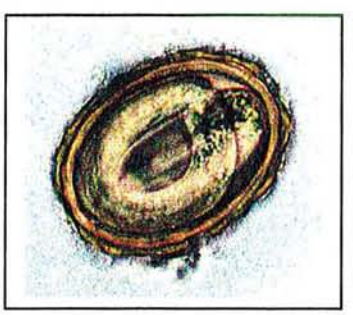
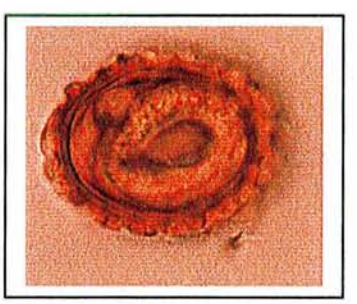
Les œufs de Cestodes, comme les *Hymenolepis* et *Tænia*, ne se développent en larve qu'avec des techniques plus lourdes, associant des enzymes et des conditions retracant le passage de l'embryophore dans l'estomac. Par conséquent, les pourcentages de viabilité donnés dans les résultats ne tiennent pas compte de la présence des œufs de Cestodes, seuls les œufs de Nématodes servent à la détermination de ce pourcentage.

3.2.4 Autres données

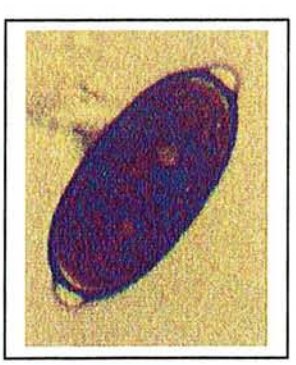
Les données des précipitations moyennes sur le bassin versant, correspondant à 24 stations de mesures en continu des précipitations, ont été fournies par l'Usine Edouard Imbeaux de Vandœuvre. Les données des MES ont été récupérés auprès du service d'analyse du laboratoire de la station d'épuration. Les débits entrants ont été obtenus par le service logistique de la station d'épuration.

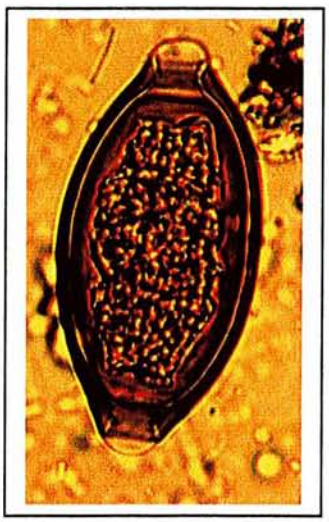
Nom	*Toxocara*		
Hôte	Bovins, chiens et chats		
Taille	65 × 75 ou 75 × 90 µm		
Forme	presque sphérique		
Coque	rugueuse, épaisse et alvéolée		
Intérieur	cellule brune non ségmentée	embryogénèse	grande larve enroulée

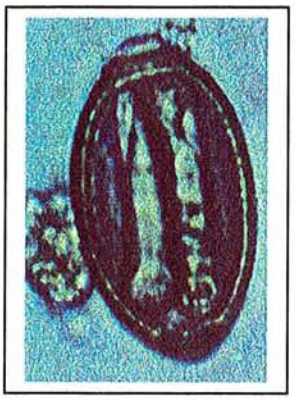




Nom	*Ascaris*	
Hôte	Homme et Porcs	
Taille	60 × 50 µm	
Forme	ellipsoïde à rond	
Coque	épaisse et mamelonnée	
Intérieur	cellule non ségmentée	larve enroulée

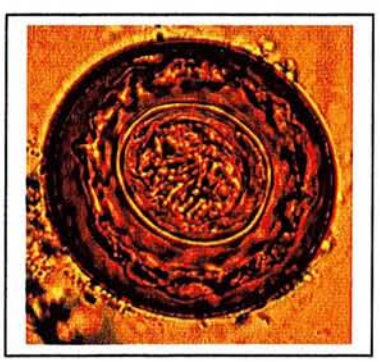


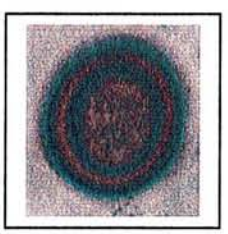
Nom	*Capillaria*	
Hôte	Homme, Porcs, ovins et bovins	
Taille	25 × 50 µm	
Forme	en citron avec bouchons polaires	
Coque	paroi latérale bombée et asymétrique	
Intérieur	granuleux	larve





Nom	*Trichuris*	
Hôte	Homme, chiens, chats, rongeurs, lapins, oiseaux, ovins et bovins	
Taille	33 × 65 µm	
Forme	ellipsoïde à rond	
Coque	épaisse et mamelonnée	
Intérieur	granuleux	larve





Nom	*Hymenolepis*	*Taenia*
Hôte	Homme, rongeurs et cygnes	Homme, chiens, chats et renards
Taille	70 × 80 µm	32 × 37 µm
Forme	presque sphérique	sphérique à ellipsoïde
Coque	transparente	épaisse et lisse
Intérieur	contient une oncosphère hexacante	embryophore à stries radiales

4 Résultats

Dans une première partie, le bassin versant de l'agglomération nancéienne et les caractéristiques de la station d'épuration sont détaillés.

La seconde partie regroupe sur un plan qualitatif, la distribution des espèces rencontrées et l'évolution de pourcentage de viabilité des œufs de Nématodes.

La troisième partie est consacrée aux analyses quantitatives concernant les variations mensuelles et les variations journalières en absence et présence de précipitations.

La dernière partie concerne l'impact des précipitations et des matières en suspension sur les fluctuations du nombre d'œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes.

4.1 Caractéristiques de la station d'épuration de Nancy-Maxéville

L'étude est réalisée sur de district de l'agglomération nancéienne (Figure n°50). Le bassin versant possède une surface de 179,3 km^2 dont les zones imperméabilisées représentent environ 55% soit 100 km^2. Ce bassin versant contient une douzaine de bassins de rétention, avec un réseau unitaire composé d'une soixantaine de déversoirs sur la Meurthe.

Les prélèvements sont réalisés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville récoltant les eaux de l'agglomération nancéienne de 345000 équivalents habitants. Le tableau n°87 regroupe diverses informations sur la station d'épuration :

Tableau n°87 : Données sur la station d'épuration.

Débit moyen de temps sec	1 000 $L.s^{-1}$
Débit maximum admis	2 220 $L.s^{-1}$
Charge MES	17 $tonnes.J^{-1}$
Charge DBO_5	15 $tonnes.J^{-1}$

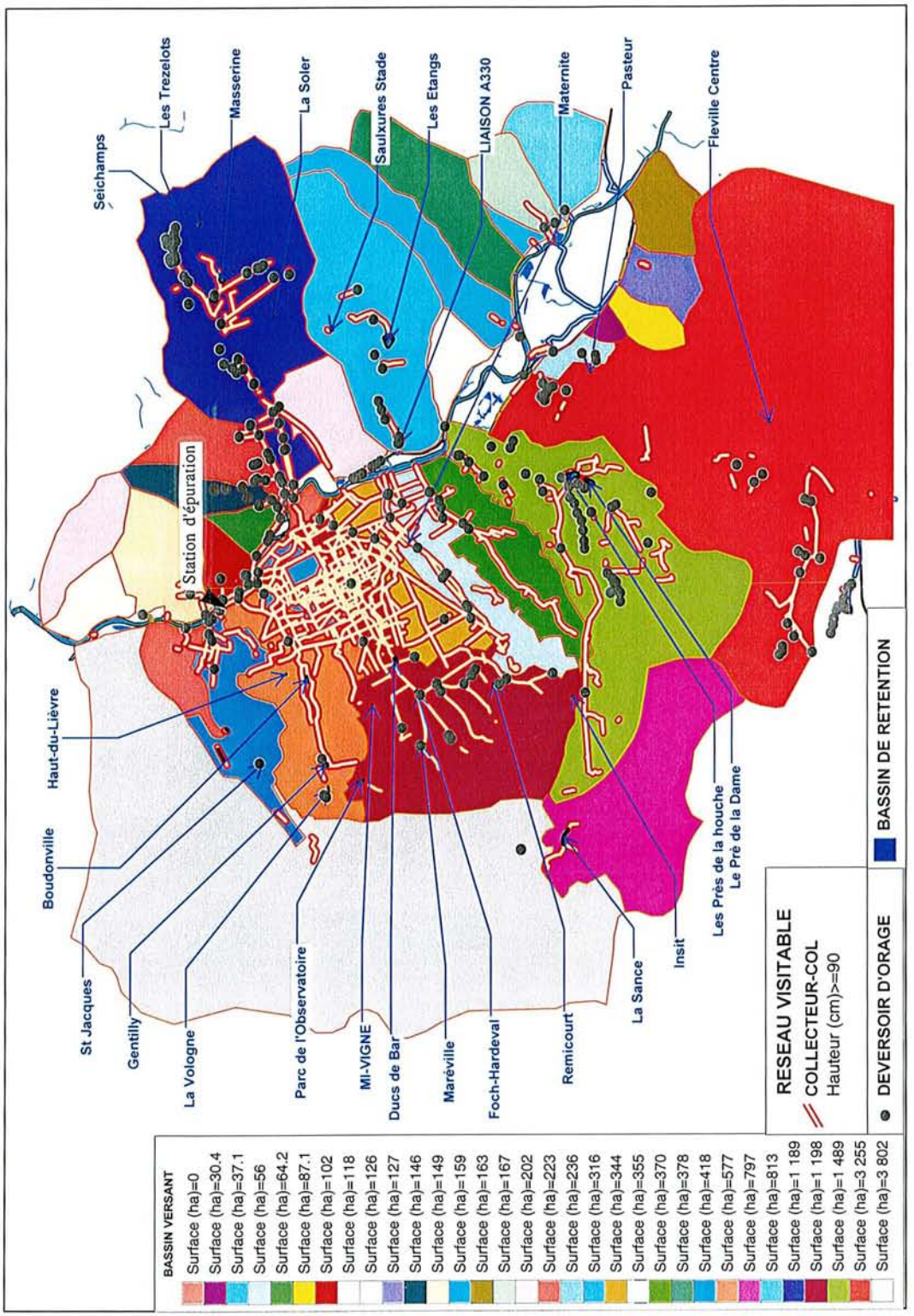


Figure n°50 : Bassin versant de l'agglomération nancéienne

A partir des 4 campagnes du 16-17 avril 1996, du 25-26 avril 1996, du 5-6 juin 1997 et du 19-20 août 1997, caractérisées par une absence de précipitations, nous avons regroupé les données des débits en entrée de station afin de tracer la courbe des débits moyens sur 24 heures (Figure n°51).

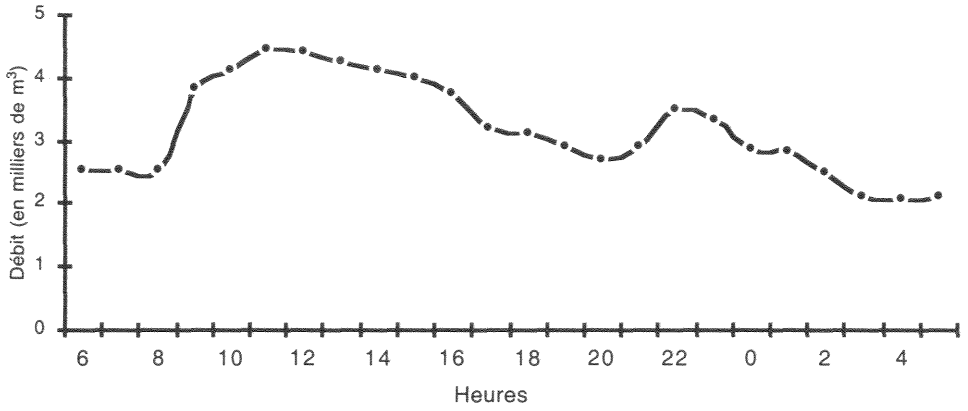


Figure n°51 : Débit moyen des eaux usées en entrée de station.

Les débits sont variables dans le temps, avec des valeurs maximales de 4460 m^3/h entre 11h et 12h et une valeur minimale de 2060 m^3/h le matin entre 4 heures et 5 heures.

4.2 Paramètres statistiques

4.2.1 Loi de Poisson

Les échantillons de 20L d'eaux usées brutes contiennent un nombre variable d'œufs d'helminthes avec des valeurs s'échelonnant de :

- 4 à 62 œufs pour les prélèvements mensuels
  avec une moyenne de 22,3 œufs d'helminthes par 24 heures.
- 1 à 45 œufs pour les prélèvements lors des campagnes en absence de précipitation
  avec une moyenne de 8,5 œufs d'helminthes par heure.
- 2 à 80 œufs pour les prélèvements lors des campagnes en présence de précipitation
  avec une moyenne de 18,6 œufs d'helminthes par heure.

Ces données permettraient de supposer que les variables aléatoires suivent une loi de Poisson dont la variance est égale à la moyenne : $x = \sigma^2$ avec x pour la moyenne d'où $\sqrt{x} = \sigma$

En conséquence, deux échantillons moyens sont différents statistiquement si leurs valeurs X_1 et X_2 sont telles que : $[X_1-\sqrt{X_1}, X_1+\sqrt{X_1}] \notin [X_2-\sqrt{X_2}, X_2+\sqrt{X_2}]$

4.2.2 Performance de la méthode de concentration/purification

Les performances de la méthode sont étudiées par la détermination de l'intervalle de confiance. Sept échantillons ponctuels de 20L d'eaux usées prélevés entre 10 heures et 11 heures. Le nombre d'œufs d'helminthes pour chacun des échantillons est indiqué dans le tableau n°88.

Tableau n°88 : Nombre d'œufs d'helminthes dans les échantillons d'eaux usées.

	Ascaris	*Toxocara*	*Capillaria*	*Trichuris*	*Hymenolepis*	*Taenia*	somme
1	5	4	6	5	11	0	31
2	9	3	2	3	14	0	31
3	3	3	6	4	16	0	32
4	2	11	1	1	14	0	29
5	3	3	4	2	12	0	24
6	2	7	1	1	12	0	23
7	3	4	1	0	11	0	19
somme	27	35	21	16	90	0	189

- Les échantillons contiennent 27,0±4,6 œufs d'helminthes.
- L'intervalle de confiance est de 3,43 au risque α de 0,05%.

L'intervalle de confiance témoigne que les variations d'une analyse à l'autre, sur un même échantillon, sont faibles.

4.3 Distribution des genres et évolution de la viabilité des œufs de Nématodes

4.3.1 Fréquences relatives des différents genres

La distribution moyenne des espèces répertoriées dans les eaux usées brutes de la station d'épuration de Nancy-Maxéville, est réalisée à partir de 51 analyses effectuées au cours des 17 mois de campagne (de décembre 1996 à avril 1998).

Nous avons dénombré les œufs de Nématodes (*Ascaris, Toxocara, Capillaria* et *Trichuris*) et les œufs de Cestodes (*Taenia* et Hymenolepis). L'ensemble des résultats est représenté sur la figure n°52.

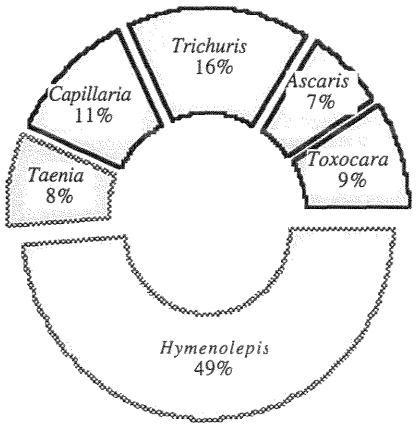


Figure n°52 : Distribution en fonction des espèces étudiées.

Nous avons comptabilisé 57% d'œufs de Cestodes avec une part importante d'œufs de *Hymenolepis* et 43% d'œufs de Nématodes, parmi lesquels 7% d'œufs d'*Ascaris*.

4.3.2 Evolution de la viabilité des œufs de Nématodes

L'étude de la viabilité des œufs de Nématodes a été réalisée à partir de 51 échantillons de 20L d'eaux usées prélevés sur 17 mois (*cf.* 3.2.1 : Prélèvements). La figure n°53 donne les pourcentages de viabilité déterminés par le protocole EPA modifié (*cf.* 3.2.2 : Traitement des échantillons).

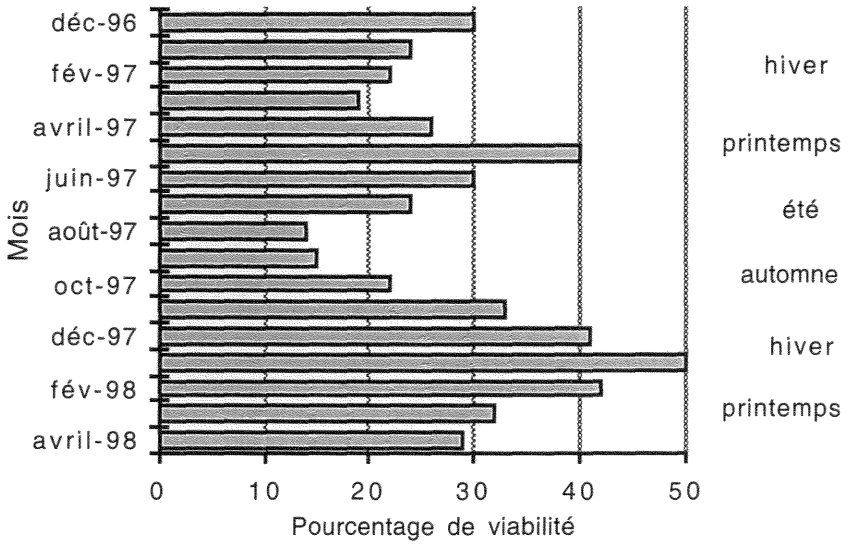


Figure n°53 : Variation du pourcentage de viabilité au cours du temps.

☞ Quelque soit la saison, les œufs de Nématodes viables sont toujours mis en évidence dans les eaux usées brutes, avec des minimums de 14% en août 1997 et de 15% en septembre 1997. Les valeurs maximales observées entre décembre 1997 et février 1998 sont comprises entre 41% et 50%.

Les pourcentages de viabilité semblent évoluer avec les saisons. Afin de vérifier l'existence d'une fluctuation saisonnière du pourcentage de viabilité des œufs de Nématodes, nous avons rassemblé dans la figure n°54 les données pluviométriques. Elles ont été relevées de décembre 1996 à avril 1998 à Essey-lès-Nancy, appartenant au bassin versant de l'agglomération.

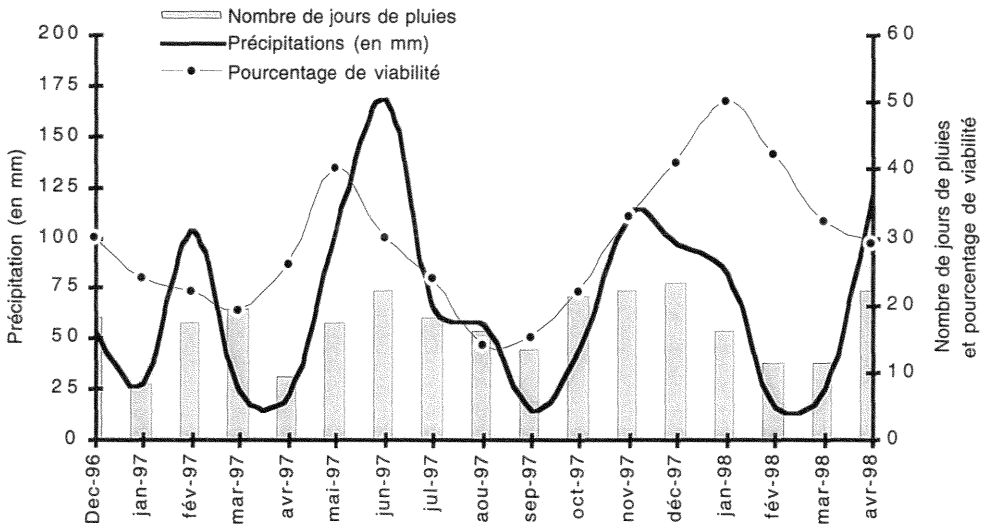


Figure n°54 : Pourcentage de viabilité, précipitations et nombre de jours de pluies à Essey-lès-Nancy de décembre 1996 à avril 1998.

La détermination des coefficients de corrélation a été effectuée sur l'ensemble des 17 mois, nous avons calculé :

- un coefficient de corrélation entre le pourcentage de viabilité et le nombre de jours de pluies, r^2 est égale à 0,008
- un coefficient de corrélation entre le pourcentage de viabilité et la hauteur des précipitations, r^2 est égale à 0,087.

D'après ces résultats, nous n'observons aucune corrélation entre le pourcentage de viabilité des œufs de Nématodes et la pluviométrie.

4.4 Mesure du flux d'helminthes dans les eaux brutes

4.4.1 Variations mensuelles des concentrations et des flux d'œufs d'helminthes

Nous avons réalisé des échantillonnages moyens mensuels (*cf.* 3.2.1 : Prélèvements) de 24 heures sur 3 jours consécutifs pendant une période de 17 mois, 51 prélèvements de 20L d'eaux usées brutes ont permis d'étudier l'existence de variations mensuelles des concentrations en œufs d'helminthes.

4.4.1.1 Variations mensuelles des concentrations en œufs d'helminthes

La figure n°55 regroupe les concentrations en œufs d'helminthes déterminées par le protocole EPA modifié (*cf.* 3.2.2.) pour la période de décembre 1996 à avril 1998.

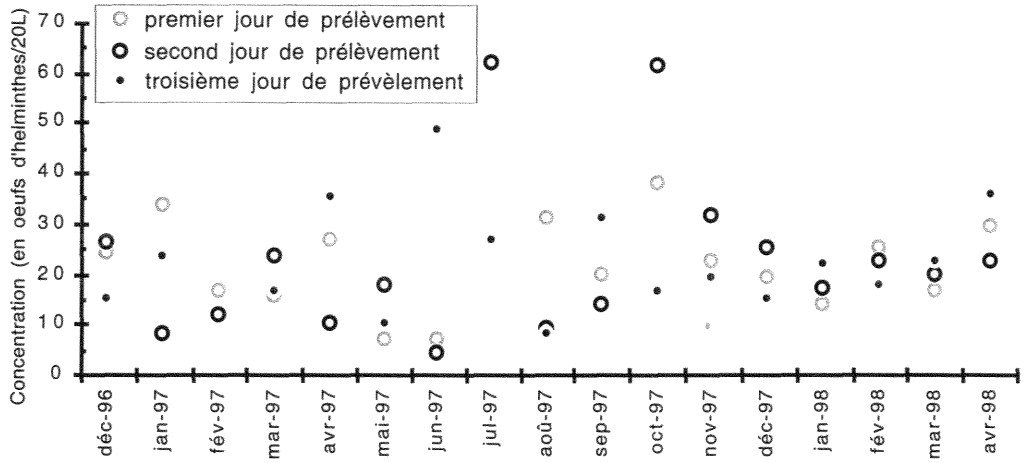


Figure n°55 : Concentration en œufs d'helminthes par échantillon de 20 litres dans les eaux brutes de décembre 1996 à avril 1998.

☞ Les nombres d'œufs d'helminthes s'échelonnent de 4 à 62 œufs /20L sur les 17 mois d'études.

☞ Nous n'observons pas de variations saisonnières, les différences entre les moyennes en œufs par échantillon par saison ne sont pas significatives.

☞ Concernant les écarts entre les 3 analyses réalisées sur un même mois :

- ils peuvent être significatifs selon la Loi de Poisson, avec comme exemple les valeurs de 17, 38 et 61 œufs d'helminthes/20L, lors du mois d'octobre 1997,
- ils peuvent être minimes, avec comme exemple les mois de novembre 1997 à avril 1998, où nous n'observons pas de différence entre les concentrations en œufs d'helminthes, sur les 3 jours.

4.4.1.2 Variations mensuelles des flux d'œufs d'helminthes

Les quantités totales d'œufs entrant dans la station d'épuration en 24 heures ont été calculées à partir des concentrations et des débits entrants d'eaux usées brutes. La figure n°56 indique les quantités d'œufs d'helminthes déterminées sur les 51 analyses et exprimées en unités logarithmiques.

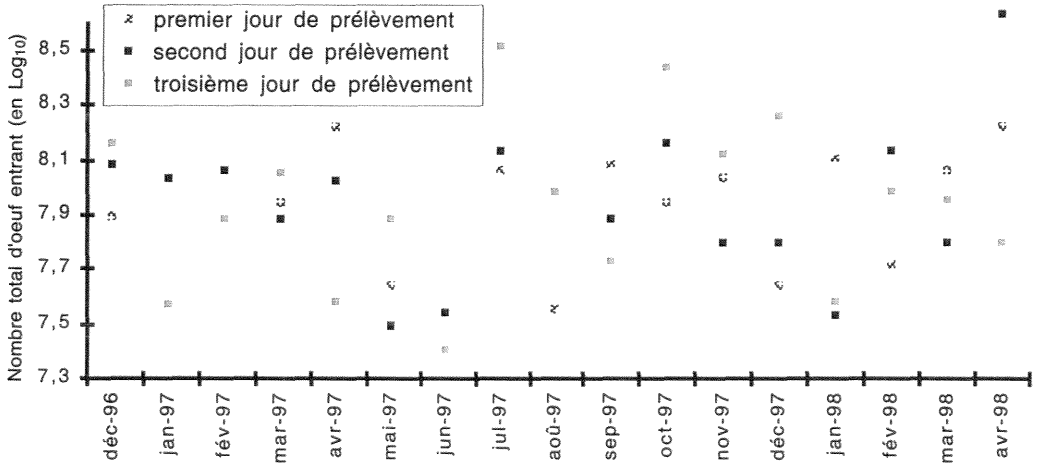


Figure n°56 : Flux d'œufs d'helminthes dans les eaux brutes de décembre 1996 à avril 1998.

☞ Les flux d'œufs d'helminthes entrant dans la station d'épuration varient de 7,40 à 8,51 $\log_{10}$. par jour (soit de 25,1 millions à 32,4 millions d'œufs d'helminthes sur 24 heures).

☞ Nous n'observons pas de variations saisonnières, ou de différences significatives entre les flux d'œufs sur les 17 mois de l'étude.

4.4.2 Variations journalières des concentrations en œufs d'helminthes

Nous allons nous attacher à comprendre l'impact des précipitations sur des éventuelles fluctuations des concentrations en œufs d'helminthes. Pour ce faire, nous avons réalisé des campagnes de prélèvements en présence et en absence de précipitation.

4.4.2.1 Fluctuations des concentrations en absence de précipitations

Parmi les 9 campagnes réalisées à la station d'épuration de Nancy-Maxéville, 4 campagnes de prélèvements ont été effectuées par temps sec :

- 16-17 avril 1996, 1ère campagne
- 25-26 avril 1996, 2de campagne
- 5-6 juin 1997, 3ème campagne
- 19-20 août 1997. 4ème campagne

4.4.2.1.1 Variations horaires des concentrations en œufs d'helminthes

Les résultats de la détermination du nombre d'œufs d'helminthes, obtenus à partir des 19 prélèvements d'eaux usées brutes pour chacune des 4 campagnes, sont regroupés dans les figures n°57 et 58.

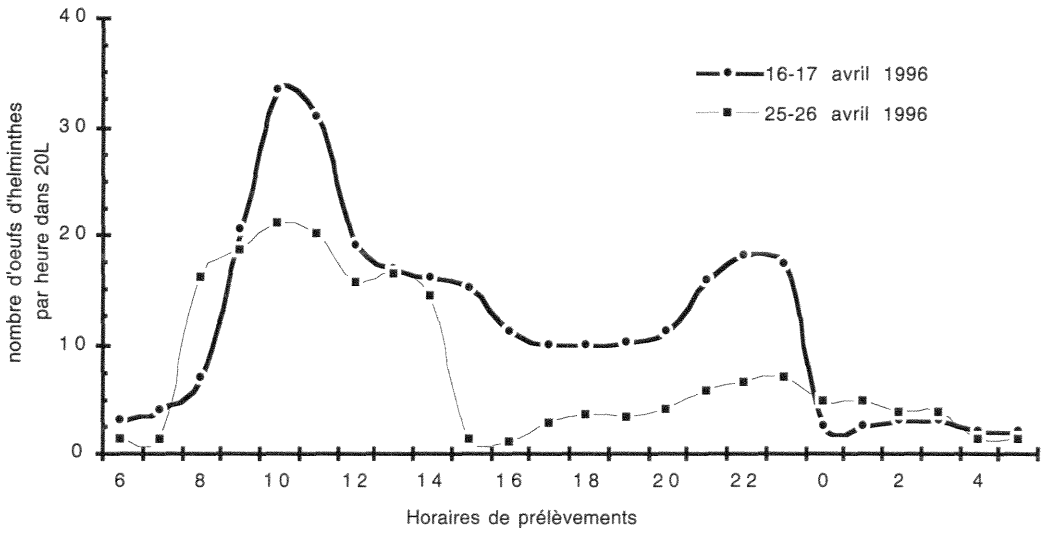


Figure n°57 : Variations du nombre d'œufs d'helminthes (1ère et 2de campagne).

☞ La concentration moyenne en œufs d'helminthes dans les échantillons est de :

- 11,8±8,6 œufs/20L pour la 1ère campagne du 16-17 avril 1996
- 7,4±6,7 œufs/20L pour la 2de campagne du 25-26 avril 1996.

☞ Nous observons 2 pics de concentrations d'inégale importance, l'un en matinée entre 8 heures et 12 heures et l'autre plus modeste, en soirée entre 21 heures et 24 heures pour ces 2 campagnes.

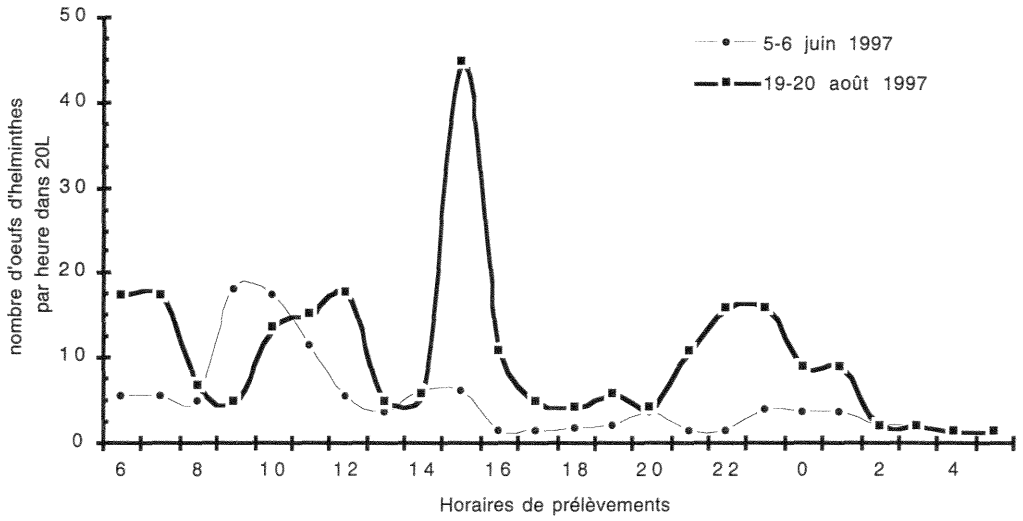


Figure n°58 : Variations horaires du nombre d'œufs d'helminthes (3ème et 4ème campagne).

☞ La concentration moyenne en œufs d'helminthes dans les échantillons est de :

- 4,7±4,5 œufs/20L pour la 3ème campagne du 5-6 juin 1997,
- 10,1±9,1 œufs/20L pour la 4ème campagne du 19-20 août 1997.

☞ Pour la 3ème campagne, les concentrations les plus élevées en œufs d'helminthes sont observées entre 9 heures et 11 heures. Par contre, pour la 4ème campagne, nous observons les concentrations les plus importantes en œufs d'helminthes entre 10 heures et 13 heures et entre 21 heures et 24 heures.

☞ Pour la 4ème campagne, nous visualisons un pic à 15 heures avec 45 œufs dans les 20 litres d'eaux usées, nous pouvons noter une sur-représentation des genres *Capillaria* et *Toxocara* qui pourrait être due à un lavage ou à un relargage d'un bassin de rétention d'eaux pluviales.

4.4.2.1.2 Flux journalier des œufs d'helminthes

Pour 3 des 4 campagnes, nous disposions des données sur les volumes d'eaux usées brutes en entrée de station, ce qui nous a permis de quantifier le flux parasitaire (exprimé en Log_{10}) à partir des 21 valeurs obtenues pour chacune des campagnes (Figure n°59).

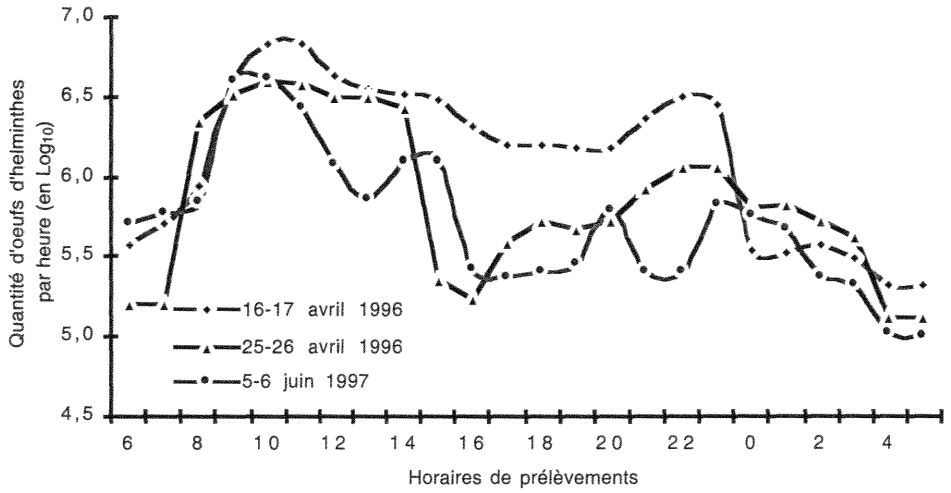


Figure n°59 : Flux d'œufs d'helminthes en entrée de station.

☞ Les valeurs maximales sont observées dans la matinée entre 9 heures et 12 heures. Le flux parasitaire diminuerait dans l'après-midi, pour augmenter à nouveau en soirée entre 20 heures et 23 heures.

☞ Les quantités d'œufs d'helminthes s'échelonnent de 5,0 Log_{10} à 6,8 Log_{10} par heure pour les 3 campagnes.

- La charge parasitaire journalière s'élève à 7,5±0,2 Log_{10} œufs d'helminthes, moyenne réalisée sur les 3 campagnes.

4.4.2.2 Fluctuations des concentrations lors de précipitations

Des précipitations se sont produites lors de 5 campagnes :

⇒ 23-24 avril 1996
⇒ 6-7 novembre 1996
⇒ 20-21 novembre 1996
⇒ 8-9 mai 1997
⇒ 26-27 août 1997

Après avoir déterminé les volumes des apports d'eaux brutes à l'entrée de la station d'épuration de Nancy-Maxéville, nous allons nous attacher à étudier d'une part les variations des concentrations en œufs d'helminthes lors d'épisodes pluvieux et d'autre part les flux parasitaires entrant dans la station d'épuration.

4.4.2.2.1 Variations des débits d'entrée lors d'épisodes pluvieux

Les débits relevés à l'entrée de la station lors des 5 campagnes pluvieuses sont répertoriés dans le tableau n°89.

Tableau n°89 : Volume de l'eau brute mesuré sur une période de 24 heures lors des 5 campagnes avec précipitation.

Date	Débit de l'eau brute
23-24 avril 1996	91 305 m^3
6-7 novembre 1996	92 710 m^3
20-21 novembre 1996	142 080 m^3
8-9 mai 1997	90 090 m^3
26-27 août 1997	absence de donnée occasionnée par un problème de logistique
Débit moyen par temps sec	76 480 m^3

La figure n°60, n°61 et n°62 indiquent les variations des volumes entrants sur une période de 24 heures en présence de précipitation, pour les 5 campagnes pluvieuses.

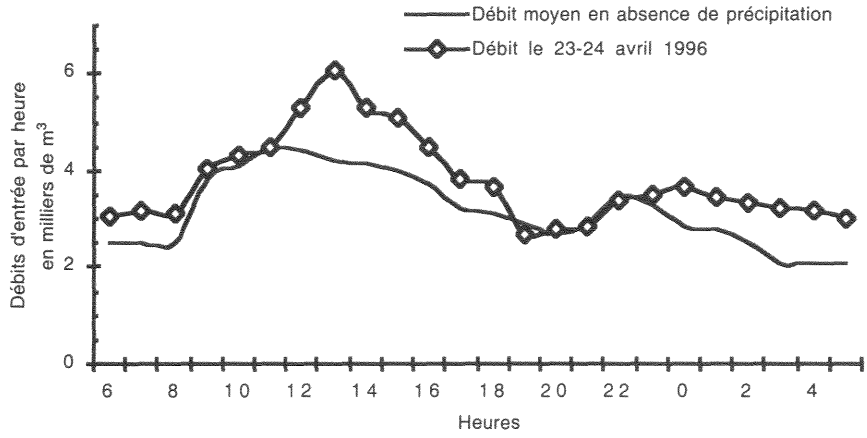


Figure n°60 : Comparaison du débit moyen par heure en entrée de station (temps sec et épisode pluvieux d'avril 1996).

☞ Sur la période d'étude, les volumes mesurés toutes les heures sont supérieurs à la moyenne de 11 heures à 19 heures et de 23 heures jusqu'à 6 heures. Nous avons enregistré une augmentation des volumes à l'entrée de la station de 14 825 m^3, soit de 19,4%.

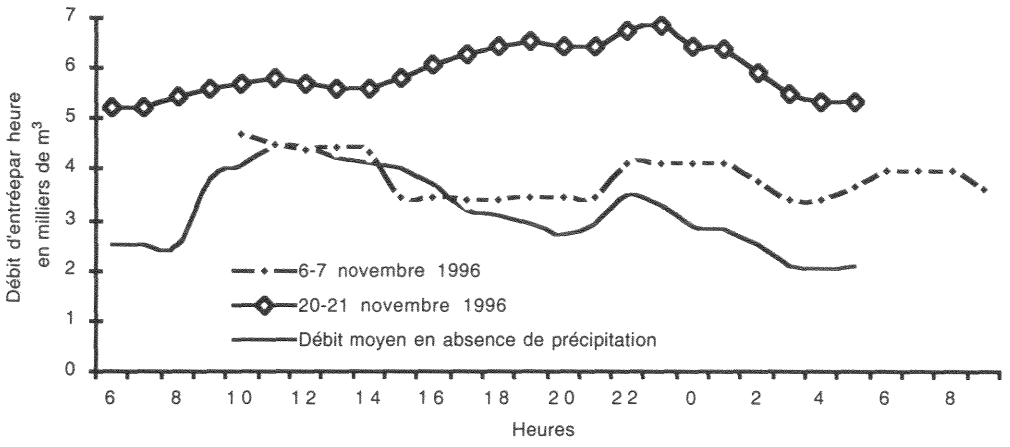


Figure n°61 : Comparaison des débits moyens en entrée de station (temps sec et les 2 épisodes pluvieux de novembre 1996).

☞ Pour la campagne du 6-7 novembre 1996, les volumes mesurés toutes les heures sont supérieurs au volume moyen (hormis la mesure de 15 à 16 heures). L'augmentation des volumes à l'entrée de la station est de 21,2%.

☞ Pour la campagne du 20-21 novembre 1996, les volumes enregistrés sont importants, avec des maximums entre 22 et 24 heures. Sur la période d'étude, l'augmentation des volumes à l'entrée de la station, est de 85,7% par rapport au volume moyen en absence de précipitations.

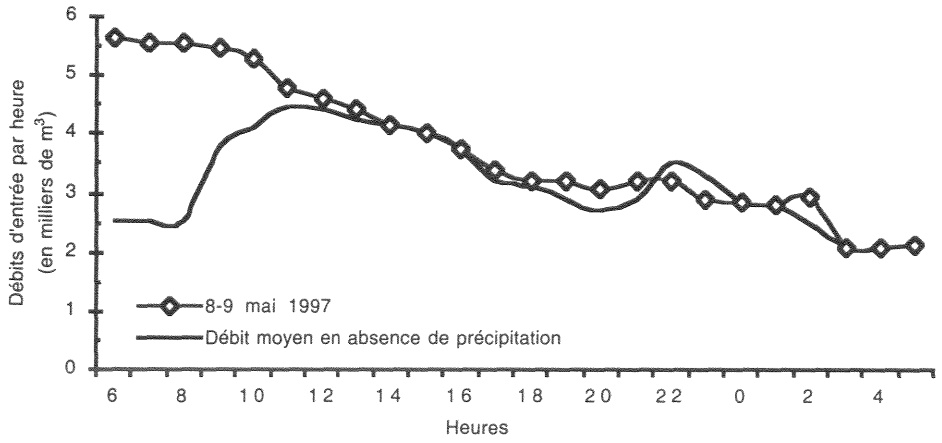


Figure n°62 : Comparaison du débit moyen en entrée de station (temps sec et épisode pluvieux du 8-9 mai 1997).

☞ Pour le 8 mai 1997, les apports d'eaux à la station dès 6 heures du matin, ne proviennent pas d'un orage. Les bassins d'orage étant vidés, ils provoquent l'augmentation des débits en entrée de station.

Les volumes entrant dans la station d'épuration sont fonction :

⇒ des volumes des eaux usées urbaines,

⇒ des apports des eaux pluviales

⇒ du relargage des bassins de rétention.

Ces bassins ont un rôle de tampon, permettant de gérer les apports excessifs des pluies lors des orages, et ils évitent de dépasser la capacité maximale de traitement de la station. Les eaux qu'ils déversent ont subi une sédimentation de 24 heures, elles contiendraient par conséquent une quantité moindre d'œufs d'helminthes.

4.4.2.2.2 Flux journaliers des œufs d'helminthes

Nous avons quantifié le flux parasitaire en œufs d'helminthes pour les 4 campagnes (Tableau n°90).

Tableau n°90 : Quantité moyenne par heure et par jour des œufs d'helminthes en entrée de station d'épuration

Date	Volume	Quantité moyenne d'œufs par heure	Quantité d'œufs sur 24 heures
23-24 avril 1996	91 305 m^3	$6,0\pm3,0 .10^6$	$14,3 .10^7$
6-7 novembre 1996	92 710 m^3	$6,3\pm3,8 .10^6$	$15,1 .10^7$
20-21 novembre 1996	142 080 m^3	$2,5\pm2,1 .10^6$	$5,9 .10^7$
8-9 mai 1997	90 090 m^3	$2,4\pm2,2 .10^6$	$4,8 .10^7$

☞ Concernant le flux horaire moyen, nous n'observons pas de différence significative entre les 4 campagnes.

☞ Par contre, au niveau du flux d'œufs pour des périodes d'une journée, nous remarquons que 2 campagnes sur 4 ont un flux supérieur $1,4.10^8$ œufs, tandis que les 2 autres campagnes ont un flux inférieur à 6.10^7 œufs

Les flux d'œufs d'helminthes (exprimés en Log_{10}) sont représentés sur les figures n°63, n°64, n°65 et n°66.

✗ Campagne d'avril 1996

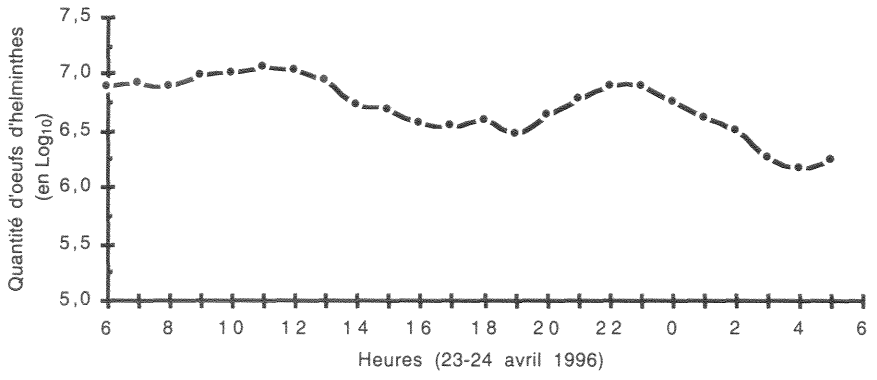


Figure n°63 : Flux d'œufs d'helminthes en entrée de station (campagne du 23 et 24 avril 1996).

☞ Le 23-24 avril 1996, le volume d'eaux usées en entrée est augmenté de 15000 m^3 environ par rapport aux 2 autres campagnes d'avril 1996.

☞ Nous enregistrons 142,9.10^6 œufs/jour pour le 23-24 avril 1996, alors que les quantités d'œufs d'helminthes étaient respectivement de 51,7.10^6 et 30,3.10^6 œufs/jour pour les 20-21 et 25-26 avril 1996.

Cet apport d'eau pluviale provoque une augmentation de 0,56 Log_{10} de la quantité d'œufs d'helminthes en entrée de station d'épuration.

✗ Campagne de novembre 1996

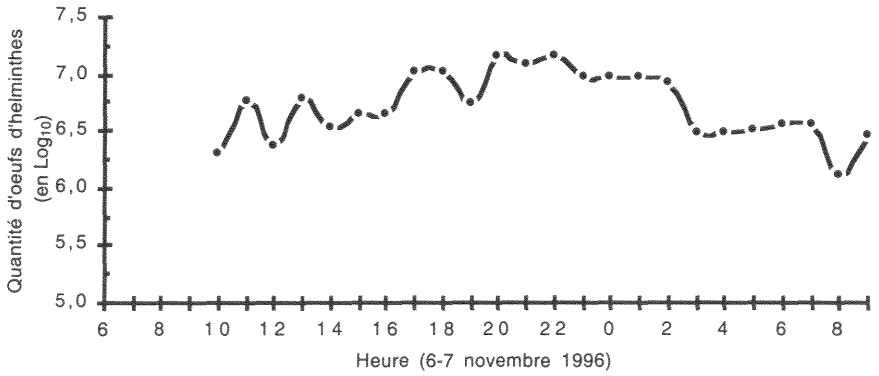


Figure n°64 : Quantité d'œufs d'helminthes en entrée de station (campagne du 6 et 7 novembre 1996).

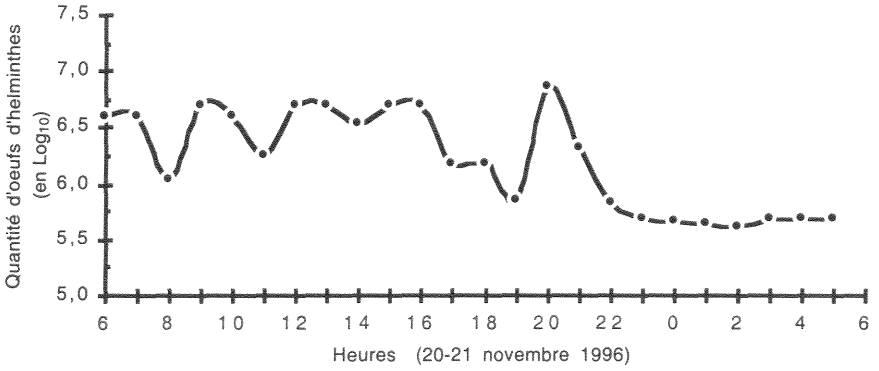


Figure n°65 : Flux d'œufs d'helminthes en entrée de station (campagne du 20 et 21 novembre 1996).

☞ Concernant le flux parasitaire véhiculé par les eaux brutes le 20 et 21 novembre 1996, nous observons une baisse de 60,9% de la quantité d'œufs par rapport aux prélèvements du 6-7 novembre 1996, alors que l'apport d'eaux résiduaires est supérieur (*cf.* Tableau n°61).

Lors des précipitations du 6-7 novembre 1996, les pluies auraient lessivé le réseau urbain augmentant les quantités d'œufs de parasites dans les eaux brutes, tandis que pour le 20-21 novembre 1996, le réseau aurait été lessivé par les pluies continuelles des jours précédents.

✗ Campagne de mai 1997

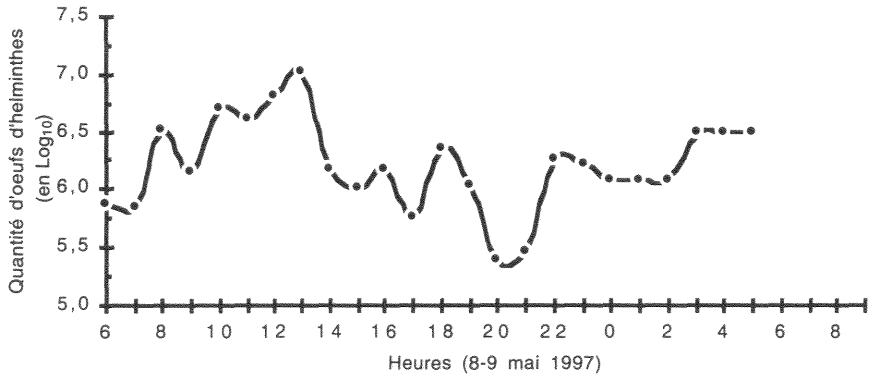


Figure n°66 : Flux d'œufs d'helminthes en entrée de station d'épuration (campagne du 8 et 9 mai 1997).

☞ Les nombres d'œufs entrant dans la station sont de $4{,}82.10^7$ pour le 8-9 mai 1997 (journée pluvieuse) et de $2{,}17.10^7$ pour 5 et 6 juin 1997 (journée sèche). Nous avons un facteur de 2,22 entre les deux bilans parasitaires, montrant l'impact des précipitations.

L'augmentation du flux parasitaire serait due d'une part au relargage des eaux pluviales du bassin de rétention le 8 mai au matin (*cf.* Figure n°62) et d'autres part aux précipitations de 5,2 mm dans la nuit du 8 au 9 mai (*cf.* Figure n°70).

4.4.2.2.3 Variations horaires des concentrations en œufs d'helminthes

Sur les échantillons moyens d'eaux usées prélevés sur des périodes de 1 heure, 21 analyses avec détermination de la concentration en œufs d'helminthes, sont réalisées par campagne de 24 heures (*cf.* 3.2.2.1 : Echantillons d'eaux usées).

Les figures n°67 à 71 regroupent les données sur la pluviométrie ainsi que les concentrations en œufs d'helminthes par litre d'eaux usées lors des 5 campagnes.

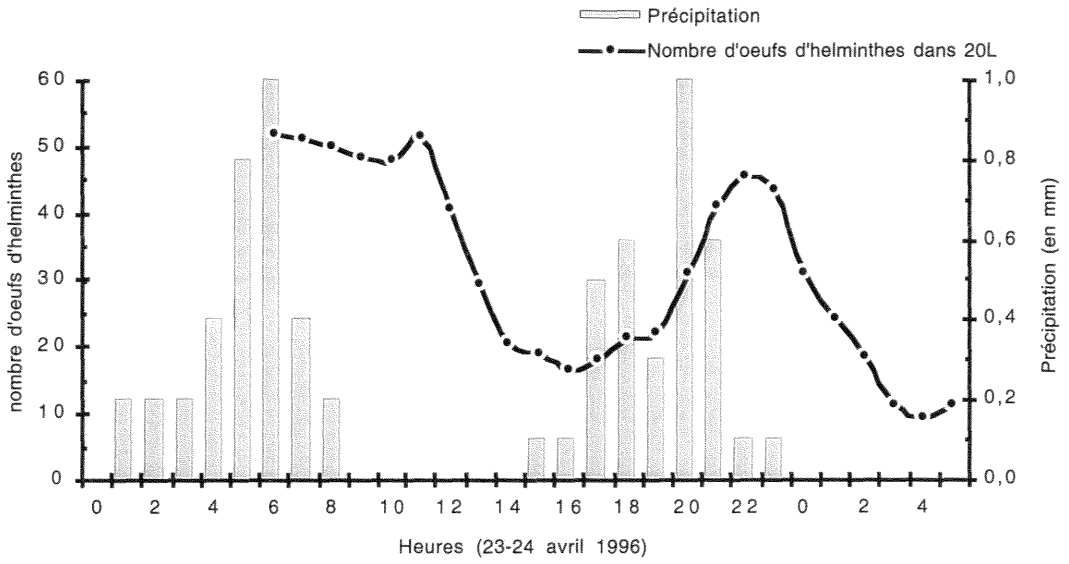


Figure n°67 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 23-24 avril 1996).

☞ Pour le nombre d'œufs d'helminthes dans les échantillons, nous observons 2 pics l'un en fin de matinée avec une valeur maximale de 52 œufs dans les 20L d'eaux usées, et l'autre de 20 heures à minuit avec un maximum de 46 œufs dans l'échantillon.

☞ Deux épisodes pluvieux sont survenus : l'un entre 1 et 7 heures, l'autre de 14 heures à 22 heures, avec à chaque fois 3,4 mm de précipitations mesurées.

☞ Les précipitations sont suivies quelques heures plus tard par une augmentation des concentrations lors de l'arrivée des eaux en station. Le décalage est difficilement mesurable pour les pluies du matin, car nous avons démarré les échantillonnages à 6 heures. Pour les pluies en soirée, le décalage entre les précipitations et l'augmentation de la charge parasitaire est d'environ 2 heures.

☞ Les précipitations du 23 avril 1996 étaient importantes et survenaient après une période sèche, ce lessivage a favorisé le décollement des particules ayant sédimenté dans le réseau urbain.

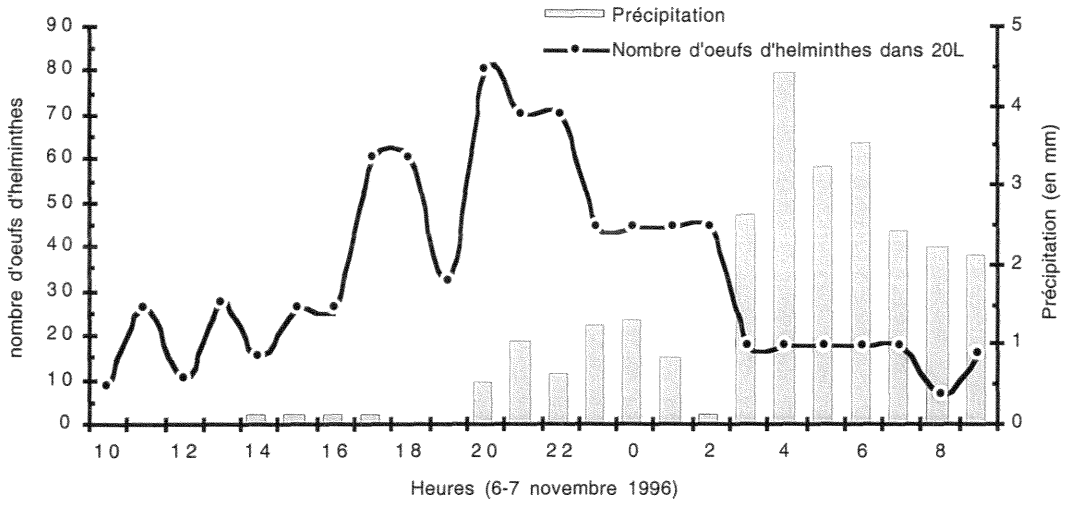


Figure n°68 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 6 et 7 novembre 1996).

☞ Nous enregistrons pour le nombre d'œufs d'helminthes, 2 pics avec des valeurs maximales de :
60 œufs/échantillon de 20 litres entre 17 à 19 heures
81 œufs/échantillon de 20 litres entre 20 à 23 heures

☞ Pour les précipitations, nous discernons des pluies de :
- faible intensité, avec des précipitations de 0,1 mm par heure de 14 heures à 18 heures,
- moyenne intensité, avec des précipitations de 0,9 mm par heure de 20 heures à 2 heures du matin,
- forte intensité, avec des précipitations de 3,1 mm par heure de 3 heures à 9 heures du matin le 7 novembre 1996.

Pour le 1er évènement pluvieux, nous observons un décalage de 3 heures entre les précipitations et l'augmentation du nombre d'œufs d'helminthes. Tandis que pour 2ème évènement pluvieux, nous n'apercevons pas de décalage, l'augmentation du nombre d'œufs intervient simultanément avec l'arrivée des pluies. Pour la 3ème période pluvieuse, nous n'enregistrons pas d'augmentation du nombre d'œufs dans les eaux usées.

Nous pouvons supposer pour les 3 évènements pluvieux que :

✗ les premières pluies du début de l'après-midi pourraient correspondre à des orages locaux de courte durée mais d'intensité importante, provoquant un lessivage de la voirie, et expliquant les faibles hauteurs enregistrées ainsi que les fortes concentrations en œufs d'helminthes observées.

✗ les pluies du début de la soirée poursuivant le lessivage, auraient provoqué un apport d'œufs d'helminthes dans la station d'épuration.

✗ les pluies de forte intensité survenant dès les premières heures du 7 novembre, n'ont pas provoqué une augmentation des concentrations parasitaires. Le lessivage du réseau d'assainissement aurait été réalisé les heures précédentes.

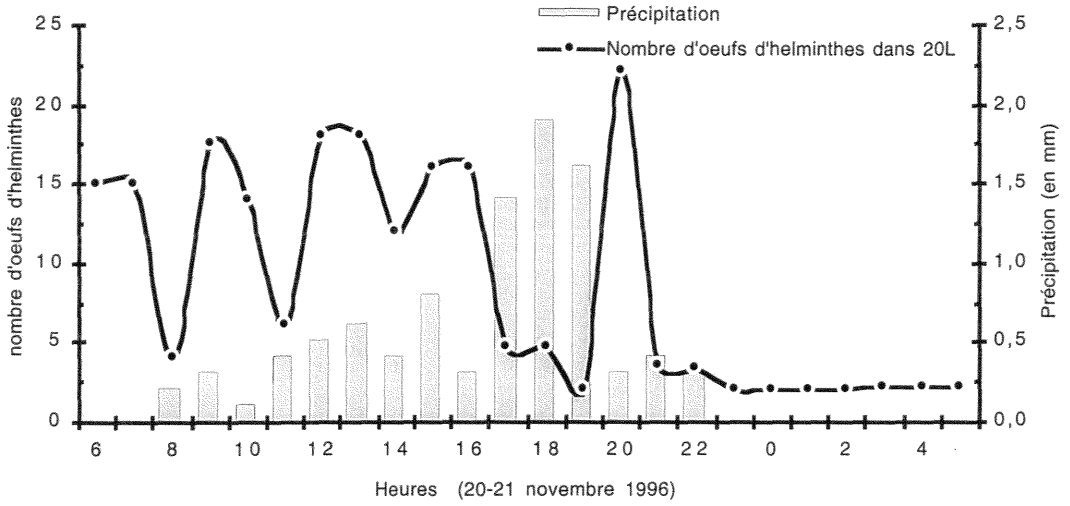


Figure n°69 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 20-21 novembre 1996).

☞ Au niveau des variations du nombre d'œufs d'helminthes, nous apercevons :

- de 6 heures à 16 heures, des fluctuations de la charge parasitaire,
- de 20 heures à 21 heures, un pic avec une valeur de 22 œufs d'helminthes dans l'échantillon.

☞ Pour les précipitations, elles sont présentes :

- le matin, avec 3,6 mm de 8 heures à 17 heures
- en fin de journée, avec 4,9 mm entre 17 heures et 20 heures, avec une valeur maximale de 1,9 mm de 18 à 19 heures,
- en soirée, avec 1 mm entre 20 heures et 22 heures.

☞ Les précipitations du matin se produisent simultanément avec des variations de la charge parasitaire dans les eaux usées. Nous remarquons également que les pluies tombant entre 8 heures et 17 heures, sont suivies 2 heures plus tard par une augmentation des concentrations parasitaires dans l'échantillon.

La distribution du nombre d'œufs dans les échantillons suit une loi de Poisson (*cf.* 3.2.5 Analyse statistique), par conséquent nous pouvons supposer que les quantités d'œufs d'helminthes retrouvées dans les échantillons sont significativement différentes pour les échantillons prélevés de 8 à 9 heures et de 9 à 10 heures, mais également pour les échantillons prélevés de 11 à 12 heures et de 12 à 13 heures

Nous pouvons différencier 3 évènements pluvieux distincts :

- Pour la tranche horaire de 8 heures à 16 heures, il semblerait que les variations du nombre d'œufs d'helminthes dans les échantillons soient en relation avec les précipitations.
- Pour l'évènement pluvieux enregistré entre 17 heures et 20 heures, les pluies auraient lessivé le réseau d'assainissement, conduisant à une augmentation des concentrations entre 20 et 21 heures.
- Par contre, les précipitations de plus faible intensité de 20 à 23 heures n'auraient pas modifié les concentrations parasitaires.

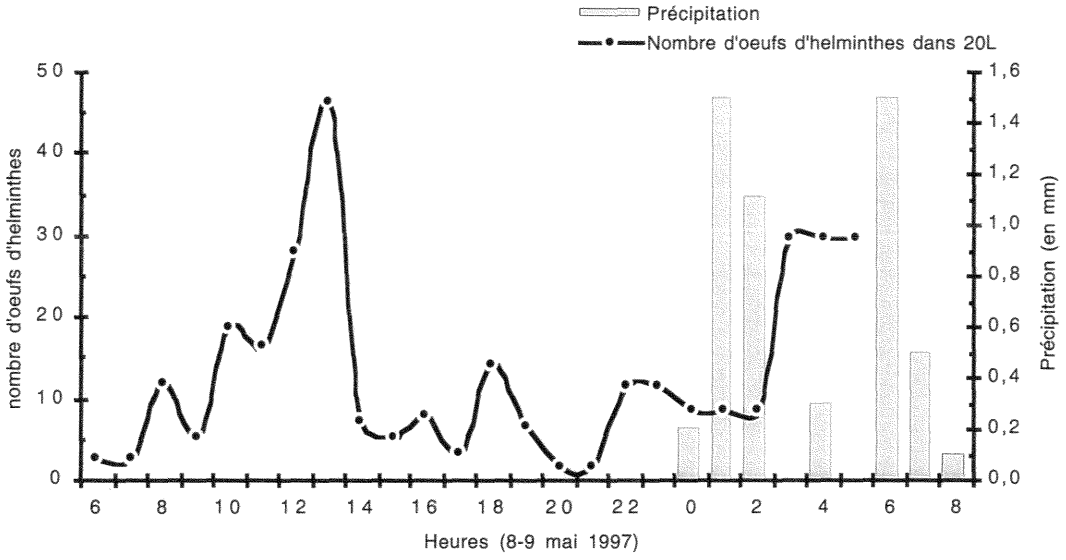


Figure n°70 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 8 et 9 mai 1997).

☞ Au niveau du nombre d'œufs d'helminthes, nous enregistrons :

- entre 12 et 13 heures, une forte concentration avec 28 œufs d'helminthes dans l'échantillon,
- à partir de 3 heures du matin, une augmentation du nombre d'œufs d'helminthes passant de 8 à 30 œufs pour 20 litres d'eaux usées brutes.

☞ Concernant la pluviométrie le matin du 9 mai 1997, il est tombé 5,2 mm d'eaux entre minuit et 3 heures.

☞ Cet orage est suivi 2 heures plus tard par une augmentation du nombre d'œufs d'helminthes en passant de 8 à 30 œufs pour 20 litres d'eaux usées.

Le 8 mai de 6 heures à 10 heures, le flux d'eau en entrée de station était de 5600 m^3/h, alors qu'il est habituellement de 2000 m^3/h en absence de précipitation (Figure n°71). Cette augmentation serait due au relargage des eaux pluviales retenues dans les bassins de rétention. Ces eaux d'orages proviennent des précipitations importantes du 5 mai avec 23 mm et du 6 mai avec 12 mm. Les eaux entrant dans la station retrouvent leur volume original à 12 heures.

☞ Le pic de concentration correspond à la période de retour à la normale des débits d'entrée. A la fin du relargage, les eaux pluviales pourraient transporter une partie du sédiment déposé au fond du bassin de rétention, susceptible de contenir des œufs d'helminthes qui auraient sédimenté.

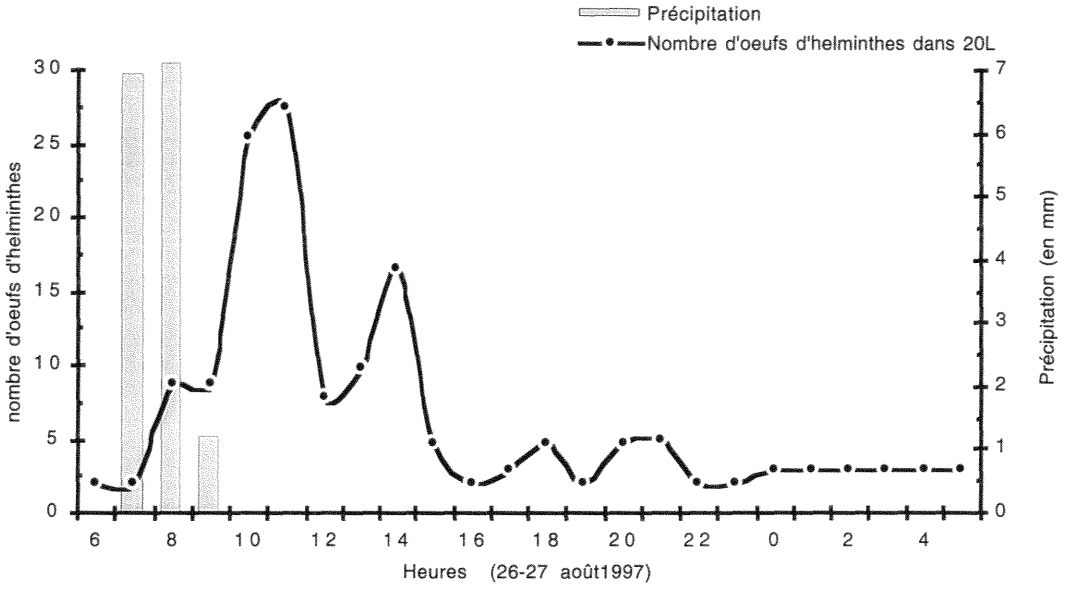


Figure n°71 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 26 et 27 août 1997).

- Au niveau du nombre d'œufs d'helminthes, nous observons un pic entre 10 heures et 12 heures, avec une valeur maximale de 27 œufs. Pour les concentrations de l'échantillon prélevé entre 14 et 15 heures, les différences ne sont par contre pas significatives.

- Pour les précipitations enregistrées entre 7 heures et 9 heures, il est tombé 15,2 mm d'eaux.

☞ Les précipitations sont survenues 3 heures avant l'augmentation du nombre d'œufs d'helminthes (de 11-12 heures), qui est le temps nécessaire à l'arrivée de l'eau à la station.

Les orages d'été survenus le 26 août 1997, ont provoqué un lessivage du réseau d'assainissement, transportant les œufs qui auraient sédimenté dans les canalisations vers la station d'épuration.

4.5 Rôle du paramètre MES et des précipitations sur le nombre d'œufs d'helminthes

4.5.1 Corrélation entre les MES et le nombre d'œufs d'helminthes

Afin de vérifier si de forts apports de MES dans les eaux usées et pluviales entraînent une augmentation du nombre d'œufs d'helminthes par échantillon en entrée de station d'épuration, l'ensemble des 51 données est mis en corrélation dans la figure n°72.

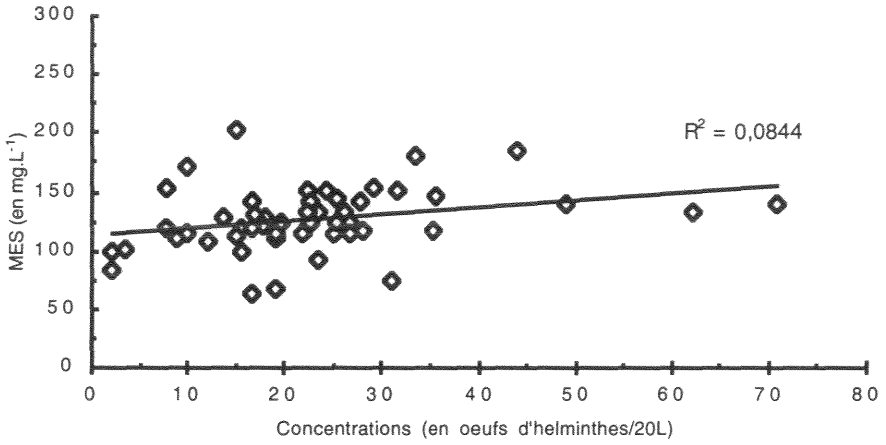


Figure n°72 : Relation entre le nombre d'œufs d'helminthes dans les échantillons d'eaux usées brutes et les MES.

☞ Le coefficient de régression est de r=0,295.

Les calculs statistiques permettent de déterminer les probabilités avec les tests de corrélation des rangs de Sperman et de Kendall entre les MES et le nombre d'œufs d'helminthes dans les échantillons de 20 litres d'eaux usées brutes (Tableau n°91).

Tableau n°91 : Probabilité statistiques de corrélation entre les MES et les concentrations en œufs d'helminthes.

Test	Probabilité
Corrélation des rangs de Sperman	0,0622
Corrélation des rangs de Kendall	0,0485

Les probabilités sont faibles, proches du risque $\alpha = 0,05$. Il semblerait y avoir une corrélation entre les concentrations en œufs d'helminthes et les concentrations en matière en suspension.

4.5.2 Relation entre les précipitations et le nombre d'œufs d'helminthes

Nous avons réalisé 9 campagnes d'avril 1996 à août 1997. Le tableau n°92 regroupe le nombre moyen d'œufs d'helminthes sur une période de 24 heures et la hauteur des précipitations durant la période de prélèvement.

Tableau n°92 : Données sur les précipitations et le nombre moyen d'œufs d'helminthes pour les 9 campagnes.

	Campagnes			Précipitations en mm	Nombre d'œufs d'helminthes (dans 20L)
1	16-17	avril	1996	0,0	11,8 ± 9,6
2	23-24	avril	1996	3,9	31,5 ± 14,5
3	25-26	avril	1996	0,0	7,4 ± 6,7
4	6-7	novembre	1996	16,1	33,4 ± 21,1
5	20-21	novembre	1996	9,0	9,7 ± 6,9
6	8-9	mai	1997	3,1	13,2 ± 11,3
7	5-6	juin	1997	0,0	4,7 ± 4,5
8	19-20	août	1997	0,0	10,1 ± 9,1
9	26-27	août	1997	15,2	6,5 ± 6,9

* : moyenne ± écart type

☞ Au niveau des précipitations, elles sont nulles pour 4 campagnes et s'échelonnent de 3,1 mm à 16,1 mm pour les 5 autres.

☞ Les moyennes des concentrations parasitaire dans les échantillons de 20L sont de :

18,9±12,1 œufs/20L en présence de précipitations

et 8,5±7,5 œufs/20L en absence de précipitations

Nous n'avons pas de différence significative entre les 2 évènements.

4.5.3 Analyses des eaux de dessablage, de curage d'égouts, de rinçage de bassin d'eaux pluviales

En supposant que les œufs d'helminthes sédimentent dans le réseau urbain jusqu'à ce que de fortes pluies lessivent les égouts, il pouvait être intéressant d'analyser différents types d'échantillons susceptibles de modifiations en cas d'arrivée d'eaux pluviales.

Quatre échantillons ont été analysés :

eaux de dessablage,

eaux de rinçage du dessablage ,

eaux de curage d'égout,

eaux de rinçage d'un bassin de rétention des eaux pluviales.

Les analyses réalisées ont permis d'une part un dénombrement des œufs d'helminthes (Nématodes et Cestodes) et d'autre part une détermination du pourcentage d'œufs de Nématodes viables.

Les tableaux n°93, n°94 et n°95 indiquent les concentrations en œufs d'helminthes, la distribution en fonction des types d'œufs et le pourcentage de viabilité des œufs de Nématodes dans les différentes types d'eaux.

Tableau n°93 : Concentrations en œufs d'helminthes dans les différentes types d'eaux.

	eaux de dessablage	eaux de rinçage du dessablage	eaux de curage d'égout	eaux de rinçage d'un bassin de rétention
Concentration en œufs/L*	72,3±17,1	0,3±0,2	4,4±0,7	0,4 ± 0,2

☞ Les eaux de dessablage contiennent une concentration élévée en œufs d'helminthes avec 72,3±17,1 œufs/L.

☞ Les eaux de curage d'égout ont une contamination parasitaire de 4,4±0,7 œufs d'helminthes/L.

☞ Les eaux de rinçage du dessablage et les eaux de rinçage d'un bassin pluvial sont moins contaminées que les eaux usées brutes possédant une concentration moyenne de 22,3±7,8 œufs/20L soit une concentration de 1,12 œufs/L (données reprises des prélèvements mensuels cumulés).

Tableau n°94 : Distribution en fonction du type d'œufs d'helminthes dans les différentes types d'eaux.

Œufs d'helminthes		eaux de dessablage	eaux de rinçage du dessablage	eaux de curage d'égout	eaux de rinçage d'un bassin de rétention
Cestodes	*Hymenolepis*	3,5%	0%	4,9%	0%
	Taenia	0%	0%	2,5%	0%
Nématodes	*Capillaria*	79,2%	25%	64,2%	75%
	Trichuris	8,3%	50%	12,2%	0%
	Ascaris	0%	0%	2,7%	25%
	Toxocara	9,0%	25%	13,5%	0%

☞ Les 4 échantillons renferment des œufs de Cestodes, ainsi que des œufs de Nématodes très majoritaires. Chez les Nématodes, par fréquence décroissante, sont retrouvés des œufs de *Capillaria*, des œufs *Trichuris* et de *Toxocara*, et des œufs d'*Ascaris*. Pour les Cestodes, les œufs de *Hymenolepis* sont retrouvés plus fréquemment que les œufs de *Taenia.*

Tableau n°95 : Œufs de Nématodes viables dans les différentes types d'eaux.

	eaux de dessablage	eaux de rinçage du dessablage	eaux de curage d'égout	eaux de rinçage d'un bassin de rétention
Pourcentage de viabilité*	36,1%	0%	22,3%	0%

* la détermination du pourcentage de viabilité n'est réalisée que sur les œufs de Nématodes (*Capillaria, Trichuris, Ascaris* et *Toxocara*).

☞ Les pourcentages de viabilité sont importants dans les eaux de dessablage (36,1%) et de curage d'égout (22,3%).

☞ Les eaux de rinçage du dessablage et de rinçage d'un bassin de rétention des euax pluviales avaient un taux de contamination faibles, de plus aucun œuf viable n'est retrouvé dans ces échantillons.

5 Conclusion

5.1 Distribution et viabilité des œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes

Sur l'ensemble de toutes les analyses, nous retrouvons plus d'œufs de Cestodes que d'œufs de Nématodes, avec une représentation de 57% de Cestodes avec une part importante d'œufs d'*Hymenolepis* et de 43% d'œufs de Nématodes. Nous avons retrouvé 7% d'œufs d'*Ascaris*.

Les pourcentages de viabilité semblent évoluer selon les saisons. nous observons quelque soit la saison, des œufs de Nématodes viables dans les eaux usées brutes, avec des minimums de 14% en été et des valeurs maximales 50% en hiver.

Feachem *et al.* (1983) mentionnent que les œufs d'helminthes sont sensibles à la dessication. Nous avons essayé de mettre en relation les données pluviométriques avec les pourcentages de viabilité déterminés sur les échantillons, mais nous n'observons aucune corrélation entre le pourcentage de viabilité des œufs de Nématodes et la pluviométrie.

5.2 Mesure du flux d'helminthes dans les eaux brutes

5.2.1 Variations mensuelles des concentrations et des quantités en œufs d'helminthes

Nous n'observons pas de variations saisonnières concernant les concentrations et les quantités d'œufs présents dans les eaux usées brutes, les différences ne sont pas significatives. Les quantités d'œufs d'helminthes entrant dans la station d'épuration varient de 7,40 à 8,51 $\log_{10}$ par jour (soit de 25,1 millions à 32,4 millions d'œufs d'helminthes).

5.2.2 Variations journalières des concentrations en œufs d'helminthes

5.2.2.1 Absence de précipitation

Les concentrations et la charge parasitaire ne sont pas constantes sur une période de 24 heures. En effet, elles subiraient des variations cycliques quotidiennes, avec les plus fortes valeurs lors des tranches horaires de 9h à 12h et de 21h à 23h. L'évolution des concentrations suivrait les fluctuations des débits d'entrée des eaux brutes, avec les 2 mêmes augmentations du matin et du soir marquant une activité humaine supérieure.

Les concentrations moyennes en œufs d'helminthes dans les eaux usées sur une période de 24 heures sont de :

- 11,83 ± 8,63 œufs/20L pour la campagne du 16-17 avril 1996,
- 7,41 ± 6,72 œufs/20L pour la campagne du 25-26 avril 1996,
- 4,68 ± 4,53 œufs/20L pour la campagne du 5-6 juin 1997,
- 10,11 ± 9,06 œufs/20L pour la campagne du 19-20 août 1997.

Les quantités d'œufs d'helminthes par heure, s'échelonnent de 5,01 Log_{10} à 6,84 Log_{10} pour les 3 campagnes du 16-17 avril 1996, 25-26 avril 1996 et 5-6 juin 1997. La charge parasitaire journalière s'élève à 7,51 ± 0,16 Log_{10} œufs d'helminthes, moyenne réalisée sur ces 3 campagnes.

5.2.2.2 Présence de précipitation

5.2.2.2.1 Fluctuations des concentrations en œufs d'helminthes

Les concentrations moyennes d'œufs d'helminthes dans les eaux usées sur une période de 24 heures, sont de :

- 31,79 ± 14,12 œufs/20L pour la campagne du 23-24 avril 1996,
- 33,36 ± 21,41 œufs/20L pour la campagne du 6-7 novembre 1996,
- 13,51 ± 4,93 œufs/20L pour la campagne du 20-21 novembre 1996,
- 13,20 ± 11,29 œufs/20L pour la campagne du 8-9 mai 1997,
- 6,54 ± 6,88 œufs/20L pour la campagne du 26-27 août 1997.

Les moyennes des concentrations ont des écarts-types importants témoignant des fluctuations des concentrations au cours de la journée.

5.2.2.2.2 Dilution ou concentration de la charge parasitaire

✗ Effet de dilution de la charge parasitaire

L'apport supplémentaire d'eaux pluviales dans les eaux résiduaires peut provoquer une dilution de la charge parasitaire. Nous avons observé ce phénomène :

⇒ le 7 novembre 1996 : Des précipitations d'une forte intensité de 3,1 mm par heure de 3 heures à 9 heures n'ont pas provoqué une augmentation des concentrations parasitaires. Le lessivage du réseau d'assainissement avait été réalisé les heures précédentes.

⇒ le 20-21 novembre 1996 : Entre 8 heures et 17 heures, nous avons un apport supplémentaire d'eaux brutes, l'augmentation des volumes à l'entrée de la station est de 44,8% par rapport au volume moyen par temps sec. Nous n'observons pas de différence significative entre les échantillons du 20-21 novembre 1996 et les échantillons prélevés par temps sec.

✗ Effet de concentration de la charge parasitaire

L'apport supplémentaire d'eaux pluviales dans les eaux résiduaires peut provoquer une augmentation des concentrations parasitaires. Nous avons observé ce phénomène :

⇒ le 23-24 avril 1996 : Les 2 évènements pluvieux avec des précipitations importantes de 3,4 mm ont été suivis quelques heures après par une augmentation des concentrations en entrée de station, avec des valeurs maximales de 52 et 46 œufs/20L. Le lessivage engendré par ces pluies aurait favorisé le décollement des particules ayant sédimenté dans le réseau urbain..

⇒ le 6-7 novembre 1996 : Nous enregistrons une augmentation des concentrations en œufs d'helminthes. Les précipitations sont de 0,1 mm par heure de 14 heures à 18 heures (conduisant à des concentrations de 60 œufs/20L), et de 0,9 mm par heure entre 20 heures et 2 heures (conduisant à des concentrations de 81 œufs/20L). Les pluies pourraient correspondre à des orages locaux provoquant un lessivage de la voirie dans les quartiers de Nancy, où se sont produites les averses.

⇒ le 20-21 novembre 1996 : Les précipitations débutant à 16 heures auraient provoqué un lessivage du réseau d'assainisement, elles ont été suivies 2 heures plus tard par une augmentation des concentrations parasitaires avec 22 œufs d'helminthes dans un échantillon de 20 litres d'eaux usées.

⇒ le 8 mai 1997 : Les concentrations en œufs d'helminthes sont importantes malgré l'absence de précipitations. Le flux d'eau en entrée de station était supérieur à la normale, d'un facteur 2,8.

Cette augmentation serait due au relargage des eaux pluviales stockées dans les bassins de rétention. Ces eaux pluviales proviennent des précipitations du 5 mai avec 23 mm et du 6 mai avec 12 mm, qui étaient retenues dans les bassins de rétention.

A la fin du relargage, les eaux pluviales pourraient charrier une partie du sédiment déposé au fond du bassin de rétention, susceptible de contenir des œufs d'helminthes après sédimentation, provoquant une augmentation des concentrations en œufs d'helminthes.

⇒ le 9 mai 1997 au matin : Des précipitations de 5,2 mm entre minuit et 3 heures sont suivies par une augmentation du nombre d'œufs d'helminthes, passant de 8 à 30 œufs pour 20 litres d'eaux usées brutes.

⇒ le 26 août 1997 : Les précipitations de 15,2 mm auraient provoqué une augmentation du nombre d'œufs d'helminthes, avec 27 œufs dans le prélèvement.

5.2.3 Flux journalier des œufs d'helminthes

✗ Absence de précipitations

Les quantités d'œufs d'helminthes par heure s'échelonnent de 5,01 Log_{10} à 6,84 Log_{10} pour les 3 campagnes du 16-17 avril 1996, 25-26 avril 1996 et 5-6 juin 1997 (Figure n°35). La charge parasitaire journalière s'élève à 7,51 ± 0,16 Log_{10} œufs d'helminthes, moyenne réalisée sur ces 3 campagnes.

✗ Présence de précipitations

Les quantités d'œufs d'helminthes par heure, s'échelonnent de 6,38 Log_{10} à 6,80 Log_{10} pour les 4 campagnes du 23-24 avril 1996, 6-7 novembre 1996, 20-21 novembre 1996 et 8-9 mai 1997 (Figure n°73). La charge parasitaire journalière s'élève à 7,95 ± 0,25 Log_{10} œufs d'helminthes, moyenne réalisée sur ces 4 campagnes.

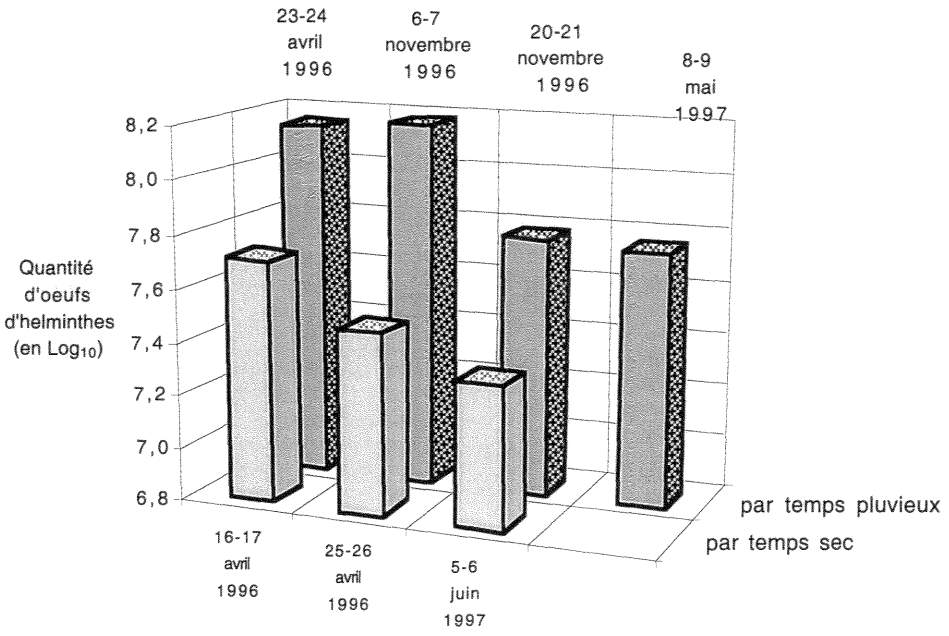


Figure n°73 : Quantité d'œufs d'helminthes pour les 7 campagnes.

Nous observons une augmentation des quantités journalières d'œufs d'helminthes en présence de précipitations, montrant l'impact des précipitations sur la charge parasitaires dans les eaux résiduaires.

Lors d'une étude d'abattement de la contamination parasitaire par la station d'épuration de Nancy-Maxéville, Bouché (1995) avait également remarqué un augmentation des concentrations lors d'une pluviométrie importante. Les données recueillies en septembre 1995 pour les 3 campagnes réalisées sont regroupées dans le tableau n°96.

Tableau n°96 : Concentrations et quantités totales en œufs d'helminthes en entrée de station en fonction des précipitations lors de 3 campagnes de prélèvements (Bouché, 1995).

Date	Concentration	Quantité (en 24h)	Précipitation (mm/24h)
8 septembre 1995	0,24 ± 0,12[a]	$2,56.10^7$	7,6
16 septembre 1995	0,18 ± 0,07	$1,84.10^7$	< 0,5
22 septembre 1995	0,17 ± 0,07	$1,34.10^7$	0

[a] : moyenne ± écart type

Le 8 septembre 1995, les précipitations importantes ont eu pour incidence une augmentation de 30% des concentrations moyennes journalières en œufs d'helminthes.

5.3 Relation entre les précipitations, les MES et le nombre d'œufs d'helminthes

✗ Corrélation entre les MES et le nombre d'œufs d'helminthes

La corrélation entre les concentrations en MES et le nombre d'œufs d'helminthes dans les échantillons d'eaux usées, donne une droite de coefficient de régression r=0,295.

Les tests de corrélation des rangs de Sperman et de Kendall donnent des probabilités de 6,22% et de 4,85%. Les probabilités sont faibles, proches du risque α de 5%. Il semblerait y avoir une corrélation entre les concentrations en œufs d'helminthes et les concentrations en matière en suspension.

✗ Analyses des eaux de dessablage, de curage d'égouts, de rinçage de bassin de rétention des eaux pluviales

Les analyses réalisées ont permis un dénombrement des œufs d'helminthes pour 4 types d'échantillons :

- eaux de dessablage : 72,3 ± 17,1 œufs d'helminthes/L,
- eaux de curage d'égout : 4,4 ± 0,7 œufs d'helminthes/L,
- eaux de rinçage du dessablage d'un bassin de rétention : 0,3 ± 0,2 œufs d'helminthes/L,
- eaux de rinçage d'un bassin de rétention : 0,4 ± 0,2 œufs d'helminthes/L.

Les 2 types d'eaux de rinçage sont moins contaminés que les eaux usées brutes possédant une concentration moyenne de 1,12 œufs/L. Par contre les eaux de dessablage ont une charge parasitaire importante, qui nécessiterait un traitement particulier d'hygiénisation.

Concernant la détermination du pourcentage d'œufs de Nématodes viables, nous avons remarqué des pourcentages de viabilité :

- importants dans les eaux de dessablage (36,1%),
  et de curage d'égout (22,3%).
- nuls dans les eaux de rinçage du dessablage d'un bassin de rétention (0%),
  et de rinçage d'un bassin de rétention (0%).

D'après les expérimentations réalisées, le risque sanitaire est important dans les eaux de dessablage et dans les eaux de curage d'égout, qui contiennent tous deux des œufs d'helminthes viables.

Les échantillons en rapport avec les eaux pluviales retenues dans des bassins de rétention, contiennent peu d'œufs d'helminthes. Cependant, les quantités journalières d'œufs d'helminthes sont supérieures en périodes pluvieuses. Nous observons dans 6 cas (*cf.* 5.2.2.2.2 : Dilution ou concentration de la charge parasitaire), une augmentation des concentrations en œufs d'helminthes suite à évènement pluvieux.

5.4 Discussion

Les données concernant les concentrations parasitaires sont à relier aux variations de débits des eaux circulant dans le réseau urbain. Une pluie intense nettoie les surfaces des zones urbaines, mais également le réseau d'assainissement. Elle décolle les particules de taille inférieure à 0,1 mm qui ont sédimenté dans les canalisations, ces particules représentent d'un point de vue massique 65 à 85 % des MES des eaux pluviales (Chebbo, 1991). De plus, la présence de ces particules dans les eaux pluviales est d'autant plus importante que

les pluies sont de forte intensité et qu'elles ont été rares les jours précédents. Il est également à remarquer que des pluies continuelles ne semblent pas permettre une sédimentation par un débit important et continu à l'intérieur des canalisations. Les variations de concentrations parasitaires sont donc également à relier aux précipitations des jours précédents.

Il reste donc difficile de prévoir les variations des concentrations parasitaires en entrée de station d'épuration dans les eaux usées brutes. De nombreux facteurs entrent en considération comme la présence de sédiments dans le réseau d'assainissement, l'intensité des pluies et la pluviométrie des jours précédents :

- de fortes variations de concentrations en parasites se rencontrent lors d'épisodes pluvieux intenses avec une pluviométrie nulle lors des jours précédents
- de faibles variations de concentrations en parasites se rencontrent lors d'épisodes pluvieux peu intenses avec une pluviométrie présente lors des jours précédents.

La pollution parasitaire ne représente pas une forte proportion massique des particules solides, elle constitue néanmoins un risque parasitaire important lors de surverse dans le milieu naturel des eaux pluviales plus ou moins associées à des eaux usées.

BIBLIOTHEQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Conclusion

Conclusion

Le travail consacré à l'œuf d'*Ascaris* comporte deux parties.

⊠ La première partie qui s'est attachée à l'étude de la structure de l'œuf d'*Ascaris* a permis de définir la composition biochimique de la couche externe de l'œuf, ainsi que ses caractéristiques biophysiques avec notamment l'étude des propriétés hydrophiles et hydrophobes de la surface de l'œuf.

⊠ La seconde partie vise à déterminer le comportement de l'œuf d'*Ascaris* dans différents contextes environnementaux. Ainsi, nous avons étudié l'impact des irradiations β sur des œufs d'*Ascaris* d'abord en milieu aqueux puis dans des boues résiduaires. Enfin, à travers plusieurs campagnes réalisées avec des conditions météorologiques variées, nous avons étudié l'influence des eaux pluviales sur la concentration en œufs d'helminthes dans les eaux usées, avec notamment d'éventuels phénomènes de relargage des œufs dans le réseau d'assainissement.

Approche structurale :

⌖ L'étude biochimique a été réalisée sur la couche externe utérine de l'œuf d'*Ascaris* qui est responsable de l'apparence mamelonnée de l'œuf. En effet, malgré de nombreux travaux, la composition de cette couche externe n'est pas connue avec précision, elle serait constituée de mucopolysaccharides (Foor, 1967; Ubelaker & Allison, 1975) ou d'un complexe mucopolysaccharides-protéines (Lee, 1961; Meng *et al.*, 1981) ou de glycoprotéines (Zulauf & Gut, 1978; Clarke & Perry 1988) ou de mucoïdes (Chitwood & Chitwood, 1950).

Dans notre travail, il a été procédé à l'analyse à la fois qualitative et quantitative d'un certain nombre de constituants (mucopolysaccharides, glycosaminoglycannes, polysaccharides, protéines...).

❑ Sur le plan qualitatif, la recherche des mucopolysaccharides a été effectuée à l'aide de colorants histologiques. Quatre types de colorations ont été testés : le bleu d'Alcian, l'Acide Périodique de Schiff couplée à la Fuchsine Basique, l'Acide Périodique de Schiff associée au bleu d'Alcian et le bleu de Toluidine

Le test de coloration à l'Acide Périodique de Schiff couplé à la Fuchsine basique montre une couche externe de l'œuf d'*Ascaris* colorée en rose, indiquant la présence de mucopolysaccharides. La coloration bleu vif obtenue au bleu d'Alcian témoigne de la présence de mucopolysaccharides à caractère acide. La double coloration au bleu d'Alcian et à l'Acide Périodique de Schiff confirme également la présence de mucopolysaccharides acides avec apparition d'un bleu vif au niveau de la couche externe. Seule, la coloration réalisée au bleu de Toluidine donne des résultats divergents avec les 3 autres colorations.

Pour rechercher les bandes caractéristiques des glycosaminoglycannes, l'étude par spectrophotométrie infrarouge a d'abord été menée sur des chondroïtines sulfates avec des groupes carboxyliques à 1615

cm^{-1}, des groupes acétylaminés à des longueurs d'onde de 1375 cm^{-1} et des esters de sulfate à des longueurs d'onde de 1240-1250 cm^{-1}.

Ensuite, les tests réalisés sur des lyophilisats d'œufs avec et sans couche externe ont fait apparaître 3 points importants :

- le spectre obtenu par différence, montre des bandes d'absorption engendrées par les vibrations de déformation et d'élongation des structures des amines et amides. La présence de ces bandes d'adsorption indique la présence de protéines dans la couche externe (Daudon & Estepa-Maurice, 1996). Cependant, aucune bande d'absorption des protéines n'est retrouvée entre 1575 et 1525 cm^{-1}, pour les vibrations des déformations N—H et des valences C—N des amides II.
- la bande d'absorption à 1147 cm^{-1} correspondant aux valences O—H des alcools, signe la présence de polysaccharides dans la couche externe.
- en revanche, l'absence d'une bande à 1240-1250 cm^{-1}, caractéristique des groupements sulfates des glycosaminoglycannes ne permet pas de conclure sur la présence de mucopolysaccharides dans la couche externe.

L'analyse des bandes d'absorption indiquerait donc que parmi les constituants de la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*, il y aurait présence de polysaccharides et de protéines.

❑ Sur le plan quantitatif, le dosage des protéines à partir des lyophilisats des œufs d'*Ascaris* avec couche externe, donne des valeurs élevées avec des masses moyennes de protéines proches de 1 $g.g^{-1}$. La teneur en protéines de la couche externe représenterait 36±25% de la teneur totale en protéine de l'œuf. Les pourcentages déterminés peuvent sembler élevés, cependant Fairbain (1957) indique que la couche externe représenterait 39% du volume de l'œuf.

Pour le dosage des acides aminés, nous n'obtenons pas de différence significative entre les 2 masses moyennes d'acides aminés dans les lyophilisats. Ces résultats semblent indiquer que la couche externe ne renferme pas d'acides aminés libres,

Au niveau des protéoglycannes ont été dosés divers constituants : acide hyaluronique formant la structure rigide de la molécule et glycosaminoglycannes en surface.

Pour l'acide hyaluronique, nous avons utilisé une méthode enzymatique suivie d'un dosage colorimétrique (au méta-hydroxydiphényle) dont le rendement s'est avéré faible (11,3±2,9%). Cette technique appliquée aux échantillons n'a pas révélé la présence d'acide hyaluronique. Pour confirmer ou infirmer ce résultat, nous avons introduit des étapes en amont du protocole en vue de libérer l'acide hyaluronique qui pourrait être piégé dans des filaments de protéines. Pour ce faire, nous avons testé 4 réactifs sur les suspensions de coques d'œufs broyés avant l'hydrolyse : la guanidine-HCl (Yanagishita & Hanscall, 1984), la trypsine (Volpi *et al.*, 1998), l'acide chlorhydrique (hydrolyse acide partielle), l'acide sulfurique (hydrolyse acide partielle)

Aucun des traitements réalisés n'ayant donné de réponse positive en colorimétrie, il peut être conclu que l'acide hyaluronique est soit présent en faible quantité, soit absent de la matrice extracellulaire formant la couche externe.

Pour les glycosaminoglycannes, par une méthode colorimétrique (1,9-DMB), nous avons testé trois hydrolysats papaïne sur différents types d'échantillons : des sections distales et proximales d'utérus, des lyophilisats d'œufs avec et sans couche externe, des suspensions d'œufs avec couche externe.

Les quantités de glycosaminoglycannes dans les échantillons seraient inférieures au seuil de détection de la méthode soit 2 µg.

En conclusion de l'analyse biochimique, la présence des glycosaminoglycannes ou de l'acide hyaluronique dans la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*, n'a pu être démontrée par les dosages enzymatiques (hyaluronidase et papaïne), colorimétriques avec le m-hydroxydiphényl pour le dosage de l'acide glucuronique et le 1,9-DMB pour le dosage des glycosaminoglycannes.

Ces résultats indiqueraient que les protéoglycannes seraient :

- soit absents de la couche externe,
- soit présents à de faibles concentrations, inférieures aux seuils de détection des méthodes retenues.

En revanche, les colorations histologiques au bleu d'Alcian et à l'acide Périodique de Schiff couplée à de la Fuchsine Basique ou à du bleu d'Alcian témoigneraient de la présence de mucopolysaccharides acides.

- Pour la détermination des caractéristiques de surface (hydrophobicité, hydrophilie, amphiphilie) de l'œuf d'*Ascaris*, nous avons étudié l'adhésion des œufs d'*Ascaris* sur divers supports, poudre de verre borosilicatée, hydrocarbures (TAMH), microsphères de sépharose et d'octyl-sépharose (CIH en batch), microsphères de latex sur lesquelles sont greffés des groupements carboxyles ou aldéhydes, deux phases associant le dextran et le polyéthylène glycol (TPP).

  L'étude des propriétés hydrophiles sur poudre de verre borosilicatée, a démontré que les pourcentages d'adhésion sont supérieurs à pH acide avec plus de 90 % des œufs adhérant sur le support. Les propriétés de l'adhésion dépendent également de l'état de maturation des œufs :
  - Les œufs recouverts de la membrane vitelline, récupérés au niveau de l'oviducte ont un pourcentage d'adhésion proche de 50%.
  - Pour les œufs fécondés de la partie proximale de l'utérus, le pourcentage d'adhésion est inférieur à 5%, indiquant certainement un caractère hydrophobe non négligeable.
  - Les œufs fécondés de la partie distale de l'utérus adhèrent à environ 70%, démontrant l'apparition des propriétés de surface hydrophiles concomitantes à la formation de la couche externe. Cette structure

constituée de mucopolysaccharides pourrait être responsable des propriétés hydrophiles du fait de la présence de groupements sulfates et carboxyles.

Pour la détermination du potentiel d'hydrophobicité des œufs d'*Ascaris*, nous avons testé comme support hydrophobe les émulsions de deux hydrocarbures : l'octane et l'hexadécane. Nos résultats montrent que l'octane aurait une meilleure affinité vis à vis de la surface des œufs d'*Ascaris*.

Pour les œufs d'*Ascaris* fraîchement émis, le potentiel d'hydrophobicité obtenu avec des émulsions d'octane est de 95,4±3,1%. Pour les œufs provenant d'une extraction de boues déshydratées, le potentiel est de 73,5±4,3%. Les propriétés hydrophobes des œufs d'*Ascaris* sembleraient diminuer après une période de transition dans l'environnement, la matrice (boue, eaux usées) ou le temps de latence modifiant les propriétés de surface des œufs d'*Ascaris*. Il faut cependant noter que les œufs sont extraits de boues par un protocole utilisant une étape diphasique associant une solution hydrophobe (diéthyle oxyde) et une solution hydrophile (mélange d'acide et d'alcool) susceptibles de modifier les caractéristiques de surface.

Par ailleurs, les mesures du caractère hydrophobe de la surface des œufs d'*Ascaris* peuvent être biaisées du fait de la présence de charges électrostatiques et de propriétés acido-basiques. Pour différencier interactions électrostatiques des interactions hydrophobes, nous avons testé l'ajout d'une solution saline de KNO_3 pour neutraliser les charges électrostatiques. Pour les propriétés acido-basiques, nous avons utilisé respectivement des émulsions d'acétate d'éthyle et de chloroforme. N'ayant observé aucune différence significative entre les potentiels d'hydrophobicité quelque soit le réactif utilisé, nous pouvons conclure que le potentiel d'hydrophobicité déterminé par le test TAMH correspond à une mesure des interactions hydrophiles/hydrophobes. Les interactions électrostatiques et acido-basiques seraient inexistantes.

Le caractère amphiphile a été étudié par différentes techniques :

- La chromatographie d'interactions hydrophobes (CIH) en batch, indique que 77,1% des œufs adhèrent aux microsphères hydrophobes d'octyl-sépharose contre 22,9% aux microsphères de sépharose.
- Avec les microsphères en latex, il a également été observé une importante adhésion des œufs aux microsphères hydrophobes (80,3%).
- Le test de partage des phases (TPP) s'est révélé inadapté pour étudier les propriétés de surface des œufs d'*Ascaris*.

Approche environnementale :

- D'un point de vue morphologique, l'irradiation β n'entraîne pas de rupture ou d'éclatement de la coque de l'œuf. A l'intérieur de la coque, l'embryon est atteint et le contenu de l'œuf est modifié avec présence de granules noirs très denses.

En terme de viabilité, les études ont été réalisées sur des œufs avec et sans couche externe, à différentes doses et dans divers milieux (eaux et boues)

A faible dose, la couche externe de l'œuf joue un rôle protecteur et assurerait donc une protection pour l'embryon dans le milieu extérieur. Pour des irradiations importantes, aucune différence en fonction de la présence ou de l'absence de la couche externe n'est observée.

Quant à l'influence du milieu (eaux ou boues), nous observons une différence. A dose identique, les œufs d'*Ascaris* présents dans la boue subissent une inactivation plus faible que les œufs en suspension dans l'eau. Cette différence pourrait être reliée aux divers modes d'inactivation décrits dans les mécanismes d'inactivation, de types indirects en environnement aqueux, de types directs en présence de fortes concentrations en substances organiques.

- Enfin, l'étude métrologique du flux d'œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes a été réalisée pendant 17 mois à la station d'épuration de Nancy-Maxéville.

En terme de distribution, les œufs de Nématodes représentent 43% des œufs d'helminthes avec 7% d'œufs d'*Ascaris*, les œufs de Cestodes 57% avec une part importante d'œufs d'*Hymenolepis*.

Au niveau de la viabilité, si des œufs de Nématodes viables sont toujours présents, les pourcentages les plus bas sont retrouvés en été avec 14% et les valeurs maximales de 50% en hiver.

Sur le plan quantitatif, nous n'observons pas de variations saisonnières statistiquement significatives concernant les quantités d'œufs entrant dans la station d'épuration avec de $25{,}1.10^6$ à $32{,}4.10^6$ œufs. Au niveau journalier, les concentrations parasitaires ne sont pas constantes sur une période de 24 heures, puisque deux pics apparaissent, l'un entre 9 heures et 12 heures, l'autre entre 21 heures et 23 heures.

L'influence des précipitations est délicate à analyser.

La comparaison des concentrations moyennes journalières ne montre pas de différence significative avec des valeurs de 19,7 ± 11,7 œufs/20L en période pluvieuse et de 8,5 ± 7,2 œufs/20L en période sèche.

En revanche, avec l'étude des quantités d'œufs arrivant à la station quelques conclusions peuvent être tirées. Il semblerait que des pluies intenses succédant à une période sèche provoquent un lessivage important des surfaces avec augmentation du nombre d'œufs dans les eaux usées. Par contre, des épisodes pluvieux rapprochés peuvent se traduire par une diminution du nombre d'œufs de parasites, correspondant à une dilution des eaux usées.

Par ailleurs, entre MES et le nombre d'œufs d'helminthes une corrélation certes faibles a été démontrée.

Au terme de ce travail et en fonction des informations aquises sur l'œuf d'*Ascaris*, il pourrait être envisagé dans une optique prospective, des études similaires sur d'autres œufs d'helminthes comme les Cestodes, afin de déterminer si il existe des caractéristiques communes à tous les œufs d'helminthes ou propres à chaque type d'œuf.

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Al-Hakim A. & Linhardt R. J. (1991) Capillary electrophoresis for the analysis of chondroïtin sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides, *Analytical Biochemistry*, **31**, 51-58.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J. D. (1986) Adhérence cellulaire, jonctions cellulaires et matrice extracellulaire, *In* : Biologie moléculaire de la cellule, Médecine-Sciences, Ed. Flammarion, Chevilly-Larue, 792-838.

Amahmid O., Asmama S. & Bouhoum K. (1999) The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cyst and *Ascaris* eggs, *International Journal of Food Microbiology*, **49**, 19-26.

Ambolet Y. & Schwartzbrod J. (1996) Survie des œufs d'helminthes sur des sols et des végétaux irrigués avec des eaux usées traitées. *In* "Biologie Prospective" 9e Colloque International. *Médecine Sciences*, **12**, 108-109.

Anonyme (1982) Destruction of microorganisms by energized electrons, *In* : High energy electron treatment of wasterwater liquid residuals, Final report to the National Science Foundation, Ed. MIT, 34-124.

Anuar A. K. & Ramachandran C. P. (1977) A study on the prevalence of soil transmitted helminths among lettuce leaves sold in local markets in Penang, Malaysia, *Medical Journal of Malaysia*, **31**, 262-264.

Arene F. O. I. (1986) *Ascaris suum*: influence of embryonation temperature on the viability of the infective larva, *Journal of Thermal Biology*, **11**, 9-15.

Arther R. G., Fitzgerald P. R. & Fox J. C. (1981) Parasite ova in anaerobically digested sludge, *Journal Water Pollution Control Federation* , **53**, 1334-1338.

Ayres R. M., Mara D. D., Lee D. L. & Thitai W. N. (1993) Monitoring full scale waste ponds in Kenya for nematodes eggs removal, *Environmental Technology*, **14**, 295-300.

Ayres R. M., Stott R., Mara D. D. & Lee D. L. (1992) Wastewater reuse in agriculture and the risk of intestinal Nematode infections. *Parasitology Today*, **8**, 32-35.

Bachoc A. & Chebbo G. (1992) La pollution des rejets pluviaux urbains : son importance, ses caractéristiques, quelques éléments sur ses origines et son interception, *In* : Rejets urbains par temps de pluie : pollutions et nuissances, B. Tassin & D. Thevenot, Presse de l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, Paris, 9-23.

Ballay D. & Blais J. F. (1998) Le traitement des eaux usées, *Revue des Sciences de l'eau*, n° spécial, 77-86.

Barbier D., Perrine D., Duhamel C., Doublet R. & Georges P. (1990) Parasitic hazard with sewage sludge applied to land, *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1420-1422.

Barnard R. J., Bier J. W., Jackson G. J. & McClure F. D. (1987) *Ascaris lumbricoïdes suum* : thermal death time of unembryonated eggs, *Experimental Parasitology*, **64**, 120-122.

Barrett J. (1976) Studies on the induction of permeability in *Ascaris lumbricoïdes* eggs, *Parasitology,* **73**, 109-121.

Bartley J. P., Bennett E. A. & Darben P. A. (1996) Structure of the ascarosides from *Ascaris suum*, *Journal of Natural Products,* **59**, 10, 921-926.

Bebin J. (1995) Les boues de stations d'épuration urbaines: la normalisation européenne, Séminaire "Les législations concernant le traitement et l'élimination des boues", CIRSEE, Paris.

Behm C. (1997) The role of trehalose in the physiology of Nematodes, *International Journal for Parasitology*, **27**, 25-229.

Bellon-Fontaine M. N., Mozes N., van der Mei H. C., Sjollema J., Cerf O., Rouxhet P. G. & Busscher H. J. (1990) A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata, *Cell Biophysics*, **17**, 93-106.

Bergstrom K. & Langeland G. (1981). Survival of *Ascaris* eggs, *Salmonella* and fecal coli in soil and on vegetables grown in infected soil, *Nordic Veterinary-Medecine*, **33**, 23-32.

Bird A. F. & McClure M. A. (1976) The *Tylenchid* (Nematoda) egg shell: structure, composition and permeability, *Parasitology*, **72**, 19-28.

Bird A. F. & Rogers G. E. (1965) Ultrastructure and histochemical studies of the cells producing the gelatinous matrix in *Meloidogyne*, *Nematologica*, **11**, 232-238.

Bitter T. & Muir H. M. (1962) A modified uronic acid carbazole reaction, *Analytical biochemistry*, **4**, 330-334.

Bittner K. (1994) L'assainissement en question, *Environnement et Technologie*, **140**, 51-56.

Black M. I., Scarpino P. V., O'Donnell C. J., Meyer K. B., Jones J V. & Kaneshiro E. S. (1982) Survival rates of parasites eggs in sludge during aerobic and anaerobic digestion, *Applied and Environmental Microbiology*, **4**, 1138-1143.

Blumenkrantz N. & Asboe-Hansen G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids, *Analytical Biochemistry*, **54**, 484-489.

Blumenthal U. J., Mara D. D., Ayres R. M., Cifuentes E., Peasey, Stott R., Lee D. L. & Ruiz-Palacios G. (1996) Evaluation of the WHO nematode egg guidelines for restricted and unrestricted irrigation, *Water Science and Technology*, **33**, 277-283.

Boisvenue R. J. (1990). Effects of aeration and temperature in vitro and in vivo studies on developing and infective eggs of *Ascaris suum, Journal of Helminthology Society Washington,* **57**, 51-56.

Bolbol A. S. (1992) Risk of contamination of human and agricultural environment with parasites through reuse of treated municipal wastewater in Riyadh, Saudi Arabia, *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology*, **36**, 330-337.

Bouché V. (1995) Bilan parasitaire œufs d'helminthes à la station d'épuration de Nancy-Maxéville, Thése Université Henri Poincaré, Doctorat d'état de Pharmacie, 105p.

Bouchet F. & Leger N. (1984) Prévention de la Toxocarose en milieu urbain. Présentation d'une nouvelle technique d'assainissement des bacs à sable, *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, **2**, 43-47.

Bouchet F. (1985) Action des microondes sur l'œuf de *Toxocara canis*. Application au traitement des boues de station d'épuration, Thèse, Université de Tours, 177p.

Bourée P. & Nozais J.-P. (1996) Ascaridiose, *In* : Traité de parasitologie, P. Pradel, J.-P. Nozais, A. Datry & M. Danis, Ed. Pradel, 409-422.

Bowness J. M. (1965) Hyaluronidase assay using a chondroitine sulphate substrate, *Biochimica et Biophysica Acta*, **101**, 26-36.

Brandon J. R. (1978) Parasites in soil/sludge systems, *Sand Laboratory Albuquerque*, **77**, 5-13.

Brimacombe J. S. & Webber J. M. (1964) Mucopolysaccharides, Chemical structure, distribution and isolation, Biochimica et Biophysica Acta Library, *Elsevier Publishing Compagny*, London, 171p.

Brown H. W. (1928) A quantitative study of the influence of oxygen and temperature on the embryonic development of the eggs of the pig ascarid (*Ascaris suum*), *The Journal of Parasitology*, **14**, 141-160.

Brush C. F., Walter M. F., Anguish L. J. & Ghiorse W. C. (1998) Influence of pretreatment and experimental conditions on electrophoretic mobility and hydrophobicity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 4439-4445.

Bryan E. H. (1984) Disinfection of wastewater and residual sludges, *In* : Proceeding of the Conference on Disinfection of Wastewater, Effluents and Sludges, Environmental Engineering, National Science Foundation, University of Miami.

Burger H. J., Rieso A., Stoye M., Heuer D., Tauber M. (1978) Resistance of parasitic eggs, oocysts and larvae in sewage sludge against electron rays, *In* : Fourth International Congress of Parasitology, Warsaw, 57-58.

Caceres.A., Xet A.M., Flore S.G. (1987) Simplified methodology for helminth egg counts and viability in organic fertilizer. *Meeting "Use of human waste in agriculture"* Adelboden, 30p.

Carrington E.G. (1985) Pasteurisation : effects upon *Ascaris* eggs, *In* : Inactivation of microorganisms in sewage sludge by stabilisation processes, D. Strauch, A. H. Havelaar, P. L'Hermite, 121-126.

Chebbo G. (1991). Caractérisation des solides des rejets pluviaux urbains, Thèse, Ecole Nationale des Ponts et Chaussée, France, 205p.

Chevreau J., Bellot J. & Cabanier M-J. (1977) Formulaire de techniques histologiques, Ed. S.A. Maloine, Paris.

Chitwood B. G. & Chitwood M. B. (1974) An introduction to nematology, *University Park Press, International Publishers in Science and Medecine*, Baltimore, 333p.

Chocat B. (1997) Encyclopédie de l'hydrologie urbaine et de l'assainissement, Ed. Technique et Documentation, Paris, 110p.

Christenson R. C., Jacobs L., Wallace F. G. & Chitwood M. B. (1950) Nemic ova, *In* : An introduction to nematology, B.G. Chitwood & M.B. Chitwood, *University Park Press, International Publishers in Science and Medecine*, Baltimore, 174-189.

Clarke A. J. & Perry R. N. (1988) The induction of permeability in egg-shells of *Ascaris suum* prior to hatching, *International Journal for Parasitology*, **18**, 987-990.

Costa-Macedo L. M., Costa M. & Almeida L. M. (1999) *Ascaris lumbricoïdes* in infants: a population-based study in Rio de Janeiro, Brazil, *Cad Saude Publica*, **15**, 173-178.

Cox M. M., Lehninger A. L. & Nelson D. L. (1991) Les glucides, *In* : Principes de biochimie, Médecine-Sciences, Ed. Flammarion, Chevilly-Larue, 297-321.

Crewe W. & Owen R. R. (1983) The parasitology of sewage sludge in cold climates, with special reference to the United Kingdom, *In :* Biological hazards associated with the terrestrial disposal of sewage sludge in cold climates, P. M. Wallis & D. L. Lehman, Calgary, 121-138.

Crompton D. W. T (1989) Prevalence of Ascariasis, *In* : Ascariasis and its prevention and control, D. W. T. Crompton, M. C. Neishem & Z. S. Pawlowski, Ed. Taylor et Francis, London, 45-69.

Curtale F., Shamy M. Y., Zaki A., Abdel-Fattah M. & Rocchi G. (1998) Different patterns of intestinal helminth infection among young workers in urban and rural areas of Alexandria governorate, Egypt, *Parassitologia*, **40**, 251-254.

Daudon M. & Estepa-Maurice L. (1996) Domaines d'analyse de la spectrophotométrie infrarouge et techniques d'échantillonnage, *L'Eurobiologiste*, **30**, 249-257.

Davis D. (1992) Europe's montainous problem, *Water quality International*, **3**, 22p.

David E. D. & Lindquist W. D. (1982) Determination of the specific gravity of certain helminth eggs using sucrose density gradient centrifugation, *The Journal of Parasitology*, **5**, 916-919.

Denuzière A., Taverna M., Ferrier D. & Domard A. (1997) Capillary electrophoresis of glycosaminoglycan derived disaccharides: application to stability studies of glycosaminoglycan chitosan complexes, *Electrophoresis*, **18**, 745-750.

Dickson I. R. & Roughley P. J. (1993) The effects of vitamin D deficiency on proteoglycan and hyaluronatre constituents of chick bone, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1181**, 15-22.

Dixo N. G. H., Gambrill M. P., Catunda P. F. C. & van Haandel A. C. (1995) Removal of pathogenic organisms from the effluent of an upflow anaerobic digester using waste stabilization ponds, *Water Science and Technology*, **31**, 175-284.

Drozd C. & Schwartzbrod J. (1996) Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum, Applied and Environmental Microbiology,* **62**, 1227-1232.

Dubinsky P., Rybos M. & Turcekova L. (1986) Properties and localization of chitin synthetase in *Ascaris suum* eggs, *Parasitology*, **92**, 219-225.

Edge A. S. B., Faltynek C. R., Hof L., Reichert L. E. & Weber P. (1981) Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid, *Analytical Biochemistry*, **118**, 131-137.

Edirisinghe J. S. & Weilgama D. J. (1997) Soil contamination with geohelminth ova in a tea plantation, *Ceylon Journal of Medical Science,* **42**, 167-172.

Eggen K. H., Malmstrom A. & Kolset S. O. (1994) Decorin and a large dermatan sulfate proteoglycan in bovine striated muscle, *Biochimica et Biophysica Acta,* **1204,** 287-297.

Eiteman M. A. & Gainer J. L. (1991a) A model for the prediction of partition coefficients in aqueous two-phase systems, *Bioseparation*, **2**, 31-41.

Eiteman M. A. & Gainer J. L. (1991b) Predicting partition coefficients in polyethylene glycol-potassium phosphate aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography*, **586**, 341-346.

El Hamouri B., Rami A., Benkerroum A., Benchokroum T. & Nebri B. (1998) Does the replacement of a series of three facultative ponds by a high rate algal pond improve waste stabilization ponds performances?, AWT98 - Advanced Wastewater Treatment, Recycling and Reuse, Milan, 749-755.

Elissalde N. (1993) Monographies des différentes techniques de traitement d'épuration, Contrat ADEME, 37p.

Ellis J. B. & Revitt D. M. (1982). Incidence of heavy metal in street surface sediment : solubility and grain size studies, *Water Air and Soil Pollution*, **17**, 87-100.

Ellis K. V., Rodrigues P. C. C. & Gomez C. L. (1993) Parasite ova and cysts in waste stabilization ponds, *Water Research*, **27**, 1455-1460.

Enigk K., Holl P., Dey-Hazra A. (1975) Eradication of parasitic cysts and eggs in sewage sludge by irradiation with low energy electrons. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene,* **161**, 61-71.

EPA (1992a) Environmental regulation and technology, Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge, *Rapport U.S. EPA 625/R-92/013*, 149p.

EPA (1992b) Guidelines for water reuse, *EPA/625/R-92/004*, 247p.

Eriksen L., Andreasen P. & Ilsoe B. (1995) Inactivation of *Ascaris suum* eggs during storage in time treated sewage sludge, *Water Research*, **30**, 1026-1029.

Fairbain D. & Passey B. I. (1955) The lipid components in the vitelline membrane of *Ascaris lumbricoïdes* eggs, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology,* **33**, 130-134.

Fairbain D. (1957) The biochemistry of *Ascaris*, *Experimental Parasitology,* **6**, 491-554.

Fairbain D. & Passey R. F. (1957) Occurrence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tisuues of *Ascaris lumbricoïdes*, *Experimental Parasitology,* **6**, 566-574.

Farndale R. W., Sayers C. A. & Barrett A. J. (1982) A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures, *Connective Tissue Research*, **9**, 247-248.

Farooq S., Kurucz C. N., Waite T. D. & Cooper W. J. (1993) Disinfection of wastewaters : high energy electron vs gamma irradiation, *Water Research*, **27**, 1177-1184.

Feachem F. G., Bradley D. J., Garelick J. & Mara D. D. (1983) Sanitation and disease, Health Aspects of excreta and wastewater management, Ed. J. Wiley & Son, World Bank Publication, New York, 501p.

Fitzgerald P. R. & Ashley R. F. (1977) Differential survival of Ascaris ova in wastewater sludge, *Water Pollution Control*, **49**, 1722-1725.

Florman H. M. & Wassarman P. M. (1985) O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity, *Cellule*, **41**, 313-324.

Focarelli R. & Rosati F. (1993) Vitelline coat of *Unio elongatulus* egg: I. Isolation and biochemical characterization, *Molecular Reproduction and Development*, **35**, 44-51.

Foor E. W. (1967) Ultrastructural aspects of oocyte development and shell formation in *Ascaris lumbricoïdes*, *The Journal of Parasitology*, **53**, 1245-1261.

Forshell P. L. (1995) Survival of *Salmonella* and *Ascaris suum* eggs in a thermophilic biogas plant, *Acta Veterinaria Scandinavica,* **36**, 79-85.

Fouquet C., Polonsky J. & Lederer E. (1961) Structure chimique des ascarosides A, B, et C, *Bulletin de la Société de Chimie et Biologie*, **44**, 1, 69-80.

Franceys R., Pickford J. & Reed R. (1995) Guide de l'assainissement individuel, O.M.S., Genève, 258p.

Gaasenbeek C. P. & Borgsteede F. H. (1998) Studies on the survival of *Ascaris suum* eggs under laboratory and simulated field conditions, *Veterinary Parasitology*, **75**, 227-234.

Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y. & Schwartzbrod L. (1997) Enterovirus genomes in wastewater : concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR, *Journal of virological Methods,* **65**, 265-271.

Gaspard P. (1995). Contamination parasitaire dans l'environnement : Prospective pour une gestion des risques sanitaires. Thèse, Université de Nancy I, 228p.

Gaspard P. & Schwartzbrod J. (1997) Parasitological risks associated with the use of biosolids in agriculture : Nematode ova survival on grass, vegetables and within soils, *In* : Beneficial reuse of water and biosolids, Marbella.

Gaspard P., Wiart J. & Schwartzbrod J. (1994) Experimental study of the helminth eggs adhesion (*Ascaris suum*) : analysis of the environmental implications, *Revue des Sciences de l'eau*, **7**, 367-376.

Gaspard P, Wiart J. & Schwartzbrod J. (1995) Urban sludge reuse in agriculture : waste treatment and parasitological risk, *Bioresource Technology*, **52**, 37-40.

Geertsema-Doornbusch G. I., van Der Mei H. C. & Busscher H. J. (1993) microbial cell surface hydrophobicity-the involvement of electrotsatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH), *Journal of Microbiological Methods*, **18**, 61-68.

Ghiglietti R., Rossi P., Ramsan M. & Colombi A. (1995) Viability of *Ascaris suum* , *Ascaris lumbricoïdes*, *Trichuris muris* eggs to alkaline pH and different temperatures, *Parasitology*, **37**, 229-232.

Ghiglietti R., Genchi C., Di Matteo L, Calcaterra E. & Colombi A. (1997) Survival of *Ascaris suum* eggs in ammonia-treated wastewater sludges, *Bioressource Technology*, **59**, 195-198.

Ghuysen J. M., Tipper D. J., Birge C. & Strominger J. L. (1965) Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain copenhagen, VI. The soluble glycopeptide and its sequential degradation by peptidase, *Biochemistry*, **4**, 2245-2254.

Golvan Y. J. (1979) Eléments de parasitologie médicale, Ed. Flammarion Médecine-Sciences, 615p.

Golvan Y. J. (1983) Eléments de parasitologie médicale, Ed. Flammarion, Chevilly-Larue, 560p.

Greve J. M. & Wassarman P. M. (1985) Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a srtuctural repeat, *Journal of Molecular Biology*, **181**, 253-264.

Grigonis G.J. & Solomon G. B. (1976) *Capillaria hepatica*: fine structure of egg shell, *Experimental Parasitology,* **40**, 286-297.

Grimason A. M., Smith H. V., Young G. & Thitai W. N. (1996) Occurrence and removal of *Ascaris* sp. ova by waste stabilisation ponds in Kenya, *Water Science and Technology*, **33**, 75-82.

Grimshaw J. (1997) Analysis of glycosaminoglycans and their oligosaccharide fragments by capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, **15**, 68-74.

Gromaire-Merzt M. C., Garnaud S., Gonzalez A. & Chebbo G. (1999) Characterisation of urban runoff pollution in Paris, *Water Science and Technology*, **39**, 1-8.

Hannan J. & Collins J. D. (1983) Parasites and the land application of sewage sludge with particular reference to *Taenia saginata*, *Journal Français d'Hydrologie*, **14**, 299-307.

Hartman P., Goldstein P., Algarra M., Hubbard D. & Mabery J. (1996) The nematode *Caenorhabditis elegans* is up to 39 times more sensitive to gamma radiation generated from ^{137}Cs than from ^{60}Co, *Mutation Research*, **363**, 201-208.

Hashimoto S., Nishimura K., Kawakami W. & Watanabe H. (1986) Disinfection of sewage sludge cake by an electron accelerator, *Journal of Fermentation Technology*, **64**, 299-304.

Hayat M. A. (1993a) Staining of semithin resin sections, *In* : Stains and cytochemical methods, Plenum Press, New York, 55-62.

Hayat M. A. (1993b) Staining and related reagents, *In* : Stains and cytochemical methods, Plenum Press, New York, 76-82.

Hazen B. W. & Hazen K. C. (1988) Modification and application of a simple, surface hydrophobicity detection method to immune cells, *Journal of Immunological Methods*, **107**, 157-163.

Hazen K. C. & Hazen B. W. (1987) A polystyrene microsphere assay for detecting surface hydrophobicity variations within *Candida albicans* populations, *Jounal of Microbiological Methods*, **6**, 289-299.

Herrmann T. & Klaus U. (1997) Fluxes of nutriments in urban drainage systems: assessment of sources, pathways and treatment techniques, *Water Science and Technology,* **36**, 167-172.

Hess E. & Breer C. (1976) The importance of sludge disinfection, *Gas Wasser Abwasser*, **56**, 385-388.

Heuer D. & Hofmann E. G. (1979) Electron irradiation equipment for sewage sludge disinfection, *Gas- und Wasserfach wasser Abwasser*, **120**, 476-480.

Hilborn J. C. & Anastassiadis P. A. (1969) Acrylamide gel electrophoresis of acidic mucopolysaccharides, *Analytical Biochemistry*, **31**, 51-58.

Hill M. J., James A. M. & Maxted W. R. (1963) Some physical investigations of the behaviour of bacterial surface, the occurrence of lipids in the streptococcal cell wall, *Biochimica et Biophysica Acta*, **75**, 414-424.

Hjertén S., Rosenbergen J. & Pahlman S. (1974) Hydrophobic interaction chromatography. The synthetis and the use of some alkyl and aryl derivatives of agarose, *Journal of Chromatography*, **101**, 281-288.

Horàk P. (1994) Helminth eggs in the sludge from three sewage treatment plants in Czechoslovakia, *Water Research*, **39**, 153-157.

Hubert J. & Kerboeuf D. (1984) A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis comparison with fecal cultures, *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **48**, 63-71.

Iske U., Nelle T. Oberg C., Rudolph K. U. & Zander-Hauck S. (1996) Hygienic, chemical and ecotoxicological aspects of the disinfection of biological treated wastewater by ozone and UV light, *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, **198**, 226-240.

Jacobin Ch., Bertrand-Krajewski J. L. & Desbordes M. (1999) Characterisation and settling of solids in an open, grassed, stormwater sewer network detention basin, *Water Science and Technology,* **39**, 135-144.

Jagals P. & Lues J. F. R. (1996) The efficiency of a combined waste stabilization pond/maturation pond system to sanitise waste water intended for recreational re-use, *Water Science and Technology,* **33**, 117-124.

Janssens P. G. (1985) Chemotherapy of gastrointestinal nematodiasis in man, *In* : Chemotherapy of gastrointestinal helminths, *Handbook of experimental pharmacology*, H. Van Den Boscche, D. Thienpont & P. G. Janssens, Ed. Springer Verlag, Berlin, **77**, 183-406.

Jaskoski B. (1952) The protein coat in development of *Ascaris lumbricoïdes* eggs, *Experimental Parasitology,* **1**, 291-302.

Jaskoski B. (1962) Paper chromatography of some fractions of *Ascaris suum* eggs, *Experimental Parasitology,* **12**, 19-24.

Jiménez B., Chávez A. & Hernández C. (1998) Alternative treatment for waste destined for agricultural use, AWT98 - Advanced Wastewater Treatment, Recycling and Reuse, Milan, 691-698.

Johnson P. W., Dixon R. & Ross A.D. (1998) An *in-vitro* test for assessing the viability of *Ascaris suum* eggs exposed to various sewage treatment processes, *International Journal for Parasitology*, **28**, 627-633.

Kabrick R. M. & Jewell W. J. (1982) Fate of pathogens in thermophilic aerobic sludge digestion, *Water Research*, **16**, 1051-1060.

Katakura K., Hamada A. & Kobayaschi A. (1986). Fate of *Ascaris* applied to soil under various conditions, *Japanese Journal of Parasitology*, **35**, 1-9.

Keller U. (1983) Sludge disinfection technology, *Schweizer Archiv Tierheilkunde,* **125**, 753-770.

Kennedy J. F. & White C. A. (1988) The glycosaminoglycans and proteoglycans, *In* : Carbohydrate Chemistry, J. F. Kennedy, Oxford Science Publication, Oxford, 303-340.

Kitagawa H., Kinoshita A. & Sugahara K. (1995) Microanalysis of glycosaminoglycan derived disaccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*, **232**, 114-121.

Kjelleberg S., Lagercrantz C. & Larsson T. (1980) Quantitative analysis of bacterial hydrophobicity studied by the binding of dodecanoic acid, *FEMS Microbiology Letters*, **7**, 41-44.

Kjellén L. & Lindahl U. (1991) Proteoglycans: structures and interactions, *Annual Review Biochemistry*, **60**, 443-475.

Klutse A. & Baleux B. (1995) Elimination des œufs de nématodes et des kystes de protozoaires des eaux usées domesiques par lagunage à microphytes en zone soudano-sahélienne, *Revue des Sciences de l'Eau*, **8**, 563-577.

Knudson W., Gundlach M. W., Schmid T. M. & Conrad H. E. (1984) Selective hydrolysis of chondroïtin sulfates by hyaluronidase, *Biochemistry*, **23**, 368-375.

Koshiishi I., Takenouchi M., Hasegawa T. & Imanari T. (1998) Enzymatic method for the simultaneous determination of hyaluronan and chondroïtin sulfates using high-performance liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*, **265**, 49-54.

Krishina M. M., Powell N. B. & Borriello S. P. (1996) Cell surface properties of *Clostridium difficile*: hemagglutination, relative hydrophobicity and charge, *Journal of Medical Microbiology*, **44**, 115-123.

Kurucz C. N., Waite T. D., Cooper W. J. & Nickelsen M. J. (1991) High energy beam irradiation of water, wastewater and sludge, *In* : Advances in Nuclear Science and Technology, J. Lewins & M. Becker, Plenum Press, New York.

Kuzin A. M., Babadzhanov S. N. & Polyakova O. I. (1949) The chemical nature of the antigens of some helminths, *Biokhimiya*, **14**, 65-66.

Leclerc H., Gaillard J.-I. & Simonet M. (1995) Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien, Ed. Doin, Paris, 535p.

Lee D. L (1961) Studies on the origin of the sticky coat on the eggs of the nematode *Thelaststoma bulhõesi* (Magalhães, 1900), *Parasitology*, **51**, 379-384.

Lee D. L. & Lestan P. (1971) Oogenesis and egg shell formation in *Heterakis gallinarum* (Nematoda), *Journal of Zoology,* **164**, 189-196.

Leppi T. J. & Stoward P. J. (1965) On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue sections, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry,* **12**, 406-407.

van de Lest C. H. A., Versteeg E. M. M., Veerkamp J. H. & van Kuppevelt T. H. (1994) A spectrophotometric method for the determination of heparan sulfate, *Biochimica et Biophysica Acta,* **1201,** 305-311.

Lindhal M. Faris A., Wadström & Hjertén S. (1981) A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, **677**, 471-476.

Ludowieg J., Vennesland B. & Dorfman A. (1961) The mechanism of action of hyaluronidases, *The Journal of Biological Chemistry,* **236,** 333-339.

Lysek H. & Ondrus J. (1992) Morphology of the uterus of *Ascaris lumbricoïdes* in the region where fertilization and formation of egg-shell occur, *Folia Parasitologica,* **39**, 41-50.

Lysek H., Malinsky J. & Janisch R. (1985) Ultrastructure of eggs of *Ascaris lumbricoïdes linnaeus*, 1758 I. Egg-shells, *Folia Parasitologica,* **32**, 381-384.

Magat W. J., Hubbard W. J. & Jeska E. L. (1972) *Ascaris suum* : Quantitative chemical analysis of eggs and larvae, *Experimental Parasitology*, **32**, 102-108.

Mandi L., Darley J., Barbe J. & Baleux B. (1992) Essais d'épuration des eaux usées de Marrakech par la jacinthe d'eau, *Revue des Sciences de l'Eau*, **5**, 313-333.

Marcinkowski T. (1985) Decontamination of sewage sludges with quicklime, *Waste Management and Research*, **3**, 55-64.

Marecos do Monte M. H. F., Angelakis A. N. & Asano T. (1996) Necessity and basis for establishment of european guidelines for reclaimed wastewater in the mediterranean region, *Water Science and Technology,* **33**, 303-316.

Marzochi C. A. (1977) Estudo dos fatores envolvidos na disseminação dos enteraparasitas. II- Estudo da contaminação de verduras e solo de hortas na cidade de ribeirão preto, São Paulo, Brazil, *Review do Instituto Medical Tropical de São Paulo*, **19**, 148-155.

Massara C .L., de Araujo Costa H. M., de Souza D. W. C., de Lemos Souza M. Z. & Dos Santos Carvalho O. (1991) Viability of *Ascaris lumbricoïdes* eggs eliminated after antihelminthic therapy, *Memoris do Instituto Oswaldo Cruz,* **86**, 233-237.

Mattos-Guaraldi A. L., Formiga L. C. & Andrade A. F. (1999) Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphteriae* strains evaluated by different methods, *Current of Microbiology*, **38**, 37-42.

Medrzycka K. B. (1991) The effect of particle concentration on zeta potential in extremely dilute solutions, *Colloid and Polymer Science,* **269**, 85-90.

Mei B., Kennedy M. W., Beauchamp J., Komuniecki P. R. & Komuniecki R. (1997) Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic Nematode, *Ascaris suum*, *The Journal of biological Chemistry*, **272**, 9933-9941.

van der Mei H. C., van de Belt-Gritter B., Reid G., Bialkowska-Hobrzanska H. & Busscher H. J. (1997) Adhesion of coagulase-negative staphylococci grouped according to physico-chemical surface properties, *Microbiology*, **143**, 3861-3870.

van der Mei H. C. & Busscher H. J (1996) Detection by physico-chemical techniques of an amphiphilic surface component on *Streptococcus mitis* strains involved in non-electrostatic binding to surfaces, *European Journal of Oral Science*, **104**, 48-55.

van der Mei H. C., Meijer S. & Busscher H. J. (1998) Electrophoretic mobilities of protein-coated hexadecane droplets at different pH, *Journal of Colloid and Interface Science*, **205**, 185-190.

Melmed L. N. & Comninos D. K. (1977) Disinfection of sewage sludge with gamma radiation, *In* : National Symposium on Treatment and Disposal of Sludge Deriving from Municipal Sewage, Pretoria.

Meng X. Q., Wang S. S., Wang B. X., Ying,G. H., Li X. Y. & Zhao Y. Z. (1981) The membranous structure of eggs of *Ascaris lumbricoides* as revealed by scanning electron microscopy, *Scanning Electron Microscopy,* **3**, 187-190.

Mielke D. & Hiepe T. (1998) The effectiveness of different disinfectants based on p-chloro-m-cresol against *Ascaris suum* eggs under laboratory conditions, *Berlinner Munchener Tierarztliche Wochenschrift,* **111**, 291-294.

Monné L. & Hönig G. (1954) On the properties of the egg envelopes of various parasitic nematodes, *Arkiv for Zoologi*, **7**, 261-272.

Montiel A. & Welté B. (1992) La désinfection, SAGEP Eau de paris, 441p.

Muller M., Sanchez R. M. & Suswillo R. R. (1989) Evaluation of a sanitation programme using eggs of *Ascaris lumbricoïdes* in household yard soils as indicators, *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **92**, 10-16.

Needham C., Kim H. T., Hoa N. V., Cong L. D., Michael E., Drake L., Hall A. & Bundy D. A. (1998) Epidemiology of soil-transmitted nematodes infection in Ha Nam province, Vietnam, *Tropical Medicine and International Health*, **3**, 904-912.

Nell J.H., Steer A.G. & Van Reusburg P.A.J. (1983) Hygienic quality of sewage sludge compost, *Water Science Technology*, **15**, 181-194.

Nickelsen M. G., Cooper W. J., Kurucz C. N. & Waite T. D. (1994) High energy electron beam generation of oxidants for the treatment of benzene and toluene in the presence of radical scavengers, *Water Research*, **28**, 1227-1237.

Nozais J.-P., Datry A. & Danis M. (1996) Traité de parasitologie, Ed. Pradel.

O'Donnell C. J., Meyer B., Jones V. J., Benton T., Kaneshiro E. S., Nichols J. S. & Schaefer F. W. (1984) Survival of parasite eggs upon storage in sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, **48**, 618-625.

O'Fel A. (1998) Parasitologie mycologie, Maladie parasitaires et fongiques, *Association Française des Professeurs de Parasitologie*, Ed. C. & R., 481p.

Ogunda E. O. & Adedeji S. O. (1986) Infectivity with human ascariasis in Ibadan Oyo State, Nigeria, *African Journal of Medicine and Medical Science*, **15**, 79-83.

Oksanen A., Eriksen L., Roepstorff A., Ilsoe B., Nansen P. & Lind P. (1990) Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs, A comparison of eggs collected from worm uteri with eggs isolated from pig faeces, *Acta Veterinaria Scandinavica*, **31**, 393-398.

van Oss C. J. & Gillman C. F. (1972) Phagocytosis as a surface phenomenon. I. Contact angles and phagocytosis of non-opsonized bacteria, *Journal of Reticuloendothelogy Society*, **12**, 283-292

Osuoji C. I. (1971) Acid glycosaminoglycan of eggshell membranes, *Biochimica et Biophysica Acta,* **244**, 481-483.

Ouazzani N., Bouhoum K., Mandi L., Bouarab L., Habbari K., Rafiq F., Picot B., Bontoux J. & Schwartzbrod J. (1995) Wastewater treatment by stabilization pond: Marrakesh experiment, *Water Science and Technology,* **31**, 75-80.

Passey R. F. & Fairbain D. (1955) The respiration of *Ascaris lumbricoïdes* eggs, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology,* **33**, 1033-1046.

Payan E., Presle N., Lapicque F., Jouzeau J. Y., Bordji K., Miralles G., Mainard D. & Netter P. (1998) Separation and quantification by ion-association capillary zone electrophoresis (IA-CZE) of unsaturated disaccharide units of chondroitin sulfates and oligosaccharides derived from hyaluronan, *Analytical Chemistry*, **70**, 4780-4786.

Pelletier C., Bouley C., Cayuela C., Bouttier S., Bourlioux P. & Bellon-Fontaine M. N. (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains, *Applied and Environmental Microbiology,* **63**, 1725-1731.

Philippe J. P. & Ranchet J. (1987). Pollution des eaux de ruissellement pluvial en zone urbaine, synthèse des mesures sur dix bassins versants en région parisienne, Report of research L.P.C. n°142.

Pike E. B., Morris D. L. & Carrington E. G. (1983) Inactivation of ova of the parasites *Taenia. saginata* and *Ascaris suum* during heated anaerobic digestion, *Water Pollution Control*, **82**, 501-509.

Pike E. B., Carrington E. G. & S.A. Harman (1988) Destruction of *Salmonella,* Enteroviruses and ova of parasites in wastewater sludge by pasteurisation and anaerobic digestion, *Water Science and Technology*, **20**, 337-343.

Plachy P., Plachà I. & Vargova M. (1995) Effect of physico-chemical parameters of sludge aerobic exothermic stabilization on the viability of *Ascaris suum* eggs, *Helminthologia,* **32**, 233-237.

Plachy P., Juris P., Placha I. & Venglovsky J. (1996) Use of hydrated lime for disinfection of model pathogens *Salmonella typhimurium* and *Ascaris suum* in sewage sludges, *Veterinary Medecine,* **41**, 255-259.

Polyakova-Krusteva O., Brunanska M. & Dubinsky C. (1985) The influence of fertilization on the ultrastructure of *Ascaris suum* eggs, *Helminthologia*, **22**, 233-244.

Poretti G. G. (1988) Abrégé de biophysique des radiations, Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, 69p.

Rahemtulla F. & Løvtrup S. (1974a) The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides -I Methods; Plathelminthes, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **49**, 631-637.

Rahemtulla F. & Løvtrup S. (1974b) The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysacchrides - II Nematoda; Annelida, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **49**, 639-646.

Reimers R. S., Little M. D., England F. A. J., Leftwich D. B., Bowman D. D. & Wilkinson R. F. (1981) Parasites in Southern sludges and desinfection by standart sludge treatment. *Research and Development EPA*-600/S2-81-166.

Reimers R. S., De Socio E. R., Bankston WS. & Lesziewicz J. A. (1998) Current, future advances in biosolids disinfection processing, *Proceedings WEF TEC'98,* Orlando, 3-7 Octobre, 445-459.

Revel J.-P. & Hay E. D. (1963) An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage, *Zeitschrift für Zellforschung*, **61**, 110-144.

Reyes W. L., Kruse C. W., Batson M. (1963) The effet of aerobic and anaerobic digestion on eggs of *Ascaris lumbricoïdes* var. *suum* in night soil, *Annals of Journal of Tropical Medecine and Parasitology*, **13**, 46-55.

Richards R. (1993) Introduction à la parasitologie humaine, *Décarie*, Montréal, Ed. Vigot, 315p.

Rosaz R. (1993) Revégétalisation des pistes de ski : risques sanitaires liés à l'épandage des boues de station d'épuration, *Environnement et Technique*, **129**, 62-63.

Rose J. B. (1986) Microbial aspects of wastewater reuse for irrigation, *Critical Reviews in Environmental*

Control, **16**, 231-256.

Rosenberg M. (1991) Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon : water interface, *Critical Reviews in Microbiology*, **18**, 159-173.

Rosenberg M. & Doyle R. J. (1990) Microbial cell surface hydrophobicity : history, measurement and significance, *In* : Microbial cell surface hydrophobicity, R.J. Doyle & M. Rosenberg, American Society for Microbiology, Washington, 1-37.

Rosenberg M., Gutnick D. & Rosenberg E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity, *FEMS Microbiology Letters*, **9**, 29-33.

Rosenberg M. & Kjelleberg S. (1986) Hydrophobic interactions : role in bacterial adhesion, *In :* Advanced in Microbial Ecology, K.C.Marshall, Plenum Publishing Corporation, New York, **9**, 353-393.

Rouessac F. & Rouessac A. (1997) Spectrométrie infrarouge, *In* : Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes, Ed. Masson, Paris, 147-173.

Rude R. A., Jackson G. J., Bier J. W., Sawyer T. K. & Risty N. G. (1984) Survey of fresh vegetables for nematodes, amoebae and *Salmonella*, *Journal of Microbiological Methods*, **67**, 613-615.

Sanin F.D., Vesilind P.A. & Martiel C.J. (1994) Pathogen reduction capabilities of freeze/thaw sludge conditioning, *Water Research*, **28**, 2393-2398.

Schmidt G. D. & Roberts L. S. (1989) Phylum nematoda : form, funcion and classification, *In* : Foundations of parasitology, Ed. Times Mirror/mosby, 379-415.

Schuh R., Philipp W. & Strauch D. (1985) Influence of sewage sludge with and without lime treatment on the development of *Ascaris suum* eggs, *In* : Proceedings "Inactivation of microorganisms in sewage sludge by stabilisation processes", D. Strauch, A.H. Havelaar & P. L'Hermite, 100-113.

Shuval H. I., Yekutiel P. & Fattal B. (1986) An epidemiological model of the potential health risk associated with various pathogens in wastewater irrigation, *Water Sciences and Technology*, **18** , 191-198.

Schwartzbrod J. & Schwartzbrod L. (1999) Les agents biologiques d'intérêt sanitaire des boues d'épuration urbaine, Ed. ADEME, 183p.

Seo B. S., Cho S. Y. & Chai J. Y. (1979) Frequency distribution of *Ascaris lumbricoïdes* in rural Koreans with special reference to the effect of changing endemicity, *Korean Journal of Parasitology*, **17**, 105-113.

Sharpe P. T. (1988) Methods of cell Separation, *In :* Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, R.H. Burdon & H. van Knippenberg, Elsevier, Amsterdam, 107-142.

Shuval H. I., Adin A., Fattal B., Rawitz E. & Yekutiel P. (1986) Wastewater irrigation in devoloping countries, *World Bank Publication*, Technical Paper series n°51.

Simonov A. P. & Shigina N. G. (1972) Electron microscopy of the egg membranes of *Ascaridia galli*, *Trudy Vsesoyuznogo Instituta Gel'mintologi*, **19**, 176-186.

Sinniah B. (1982) Daily egg production of *Ascaris lumbricoïdes* : the distribution of eggs in the faeces and the variability of egg counts, *Parasitology*, **84,** 167-175.

Sivinski H. D. (1975) Treament of sewage sludge with combinations of heat and ionizing radiation (thermoradiation), *In* : Proceedings "Radiation for a clean environment", International Atomic Energy Agency, Vienna, 151-167.

Sromova D. & Lysek H. (1990) Visualization of chitine-protein layer formation *in Ascaris lumbricoïdes* egg-shells, *Folia Parasitologica*, **37**, 77-80.

Stendahl O., Tagesson C. & Edebo M. (1973) Partition of *Salmonella typhimurium* in a two-polymer aqueous phase system in relation to liability to phagocytosis, *Infection and Immunity*, **8**, 36-41.

Stien J. L. (1989) Œuf d'helminthes et environnement : le modèle œufs d'*Ascaris*, Thèse, Université de Metz, France, 160p.

Storey G. W. & Phillips R. A. (1985) The survival of parasite eggs throughout the soil profile, *Parasitology*, **91**, 585-590.

Stott R., Jenkins T., Shabana M. & May E. (1997) A survey of the microbial quality of wastewaters in Ismailia, Egypt and implications for wastewater reuse, *Water Science and Technology,* **35**, 211-217.

Thompson J. E. & Blatchley E. R. (1999) Toxicity effect of γ-irradiated wastewater effluents, *Water Research*, **33**, 2053-2058.

Trabuc P. (1989). Pollution aportée par les rejets urbains de temps de pluie, Abstract presented to the AFBSN commission on March 22.

Tsuji V. O., Barbabosa M. I., Zavala T. J., Hernandez R. A. & Torres P. A. (1997) Vegetables for human consumption as probable source of *Toxocara* sp. infection to man, *Boletin Chileno de Parasitologia*, **52**, 47-50.

Ubelaker J. E. & Allison V. F. (1975) Scanning electron microscopy of the eggs of *Ascaris lumbricoides, A. suum, Toxocara canis* and *T. mystax*, *The Journal of Parasitology,* **61**, 802-807.

Uchimura K., Nakamura E. & Fujita S. (1997) Characteristics of stormwater runoff and its control in Japan, *Water Science and Technology,* **36**, 141-147.

Uga S., Nagnaen W. & Chongsuvivatwong V. (1997) Contamination of soil with parasite eggs and oocysts in southern Thailand, *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **28**, 14-17.

Urban J. F., Douvres F. W. & Tromba F. G. (1981) A rapid method for hatching *Ascaris suum* eggs in vitro. *Journal of the helminthological Society of Washington*, **48**, 241-243.

Uyen H. M., van der Mei H. C., Weerkamp A. H. & Busscher H. J. (1988) Comparison between the adhesion to solid substrata of *Streptococcus mitis* and than of polystyrene particules, *Applied and Environmental Microbiology,* **54**, 837-838.

Villessot D. & Fery G. (1994) Le compost de boues de station d'épuration : Aspects techniques réglementaires et commerciaux, *Techniques Sciences Méthodes*, **12**, 722-728.

Volpi N., Cusmano M; & Venturelli T. (1995) Qualitative and quantitative studies of heparine and chondroitin sulfates in normal human plasma, *Biochimica et Biophysica Acta,* **1243**, 49-58.

Volpi N., Dondi M. & Bolognani A. M. F. (1998) Characterization of a small chondroitin sulfate proteoglycan isolated from the mucus surrounding the embryos of *Viviparus ater* (mollusca gastropoda), *Biochimica et Biophysica Acta,* **1380**, 239-348.

Wagner B. & Polley L. (1999) *Ascaris suum* : seasonal egg development rates in a Saskatchewan pig barn, *Veterinary Parasitology*, **85**, 71-78.

Wallis P. M. & Lehman D. L. (1984) Biological health risks of the disposal of sewage sludge land in cold climates, *In* : Proceedings "Processing and use of sewage sludge", P. L'Hermite, 237-239.

Ward K. A. & Fairbain D. (1972) Chitinase in developing eggs of *Ascaris suum* (Nematoda), *The Journal of Parasitology*, **58**, 546-549.

Welker A., Leinweber U., Klepiszewski K. & Schmitt T. G. (1999) Effects of integrated stormwater management strategies on the combined sewer system and the wastewater treatment plant-river system, *Water Science and Technology,* **39**, 151-157.

Wharton D. A. (1979a) *Ascaris sp.* : water loss during dessiccation of embryonating eggs, *Experimental Parasitology*, **48**, 398-406.

Wharton D. A. (1979b) The structure of the egg-shell of *Porrocaecum ensicaudatum* (Nematoda: Ascaridida), *International Journal for Parasitology*, **9**, 127-131.

Wharton D. A. (1980) Nematode egg-shells, *Parasitology*, **81**, 447-463.

Wharton D. A. & Jenkins T. (1978) Structure and chemistry of the egg-shell of a Nematode (*Trichuris suis*), *Tissue and Cell*, **10**, 427-440.

WHO (World Health Organisation) (1989) Health guidelines for the use of wastewater in agriculture and aquaculture, Technical Report n°778, Genève.

Wimmer M., Schmid B., Tag C. & Hofer H. W. (1998) *Ascaris suum* : Protein phosphotyrosine phosphatase in oocytes and developing stages, *Experimental Parasitology*, **88**, 139-145.

Yanagisawa T. (1955) On the structure and formation process of the egg-shell of *Ascaris* ova, *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, **8**, 379-387.

Yanagishita M. & Hascall V. C. (1984) Proteoglycans synthesis by rat ovarian granulosa cells in culture, *The Journal of Biological Chemistry*, **259**, 10260-10269.

Yanko W. A. (1988) Occurence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges, Report US EPA/600/S1 87/014.

Yanko W. A. & Jakubowski W. (1988) Occurrence of pathogens in distribution and marketing municipal sludges. EPA/600/1 87/014, 232p.

Yeager J. G. & Ward R. L. (1980) Effectiveness of irradiation in killing pathogens. *In* : National. Symposium For Further Reduction of Pathogens, Sand. Lab., Albuquerque, 80-83.

Yeager J. G. & O'Brien R. T. (1983) Irradiation as a means to minimize public health risks from sludge-borne pathogens, *Water Pollution Control,* **55**, 977-983.

Zulauf E. & Gut C. (1978) Isolation of messenger RNA coding for egg-shell protein of the DNA-eliminating Nematode *Ascaris lumbricoïdes*, *European Journal of Biochemistry*, **82**, 577-583.

Table des illustrations

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau n°1 : Exemples de prévalence humaine de l'ascaridiose au niveau mondial (Schwartzbrod & Schwartzbrod, 1999). 28
Tableau n°2 : Présence d'œufs d'*Ascaris* sur des végétaux comestibles. 29
Tableau n°3 : Temps nécessaire pour une perte totale de la viabilité des œufs d'*Ascaris* sous l'action d'agents chimiques (Reimers *et al.*, 1998). 33
Tableau n°4 : Survie des œufs d'*Ascaris* sur les sols. 34
Tableau n°5 : Pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris* sous différentes conditions (en anaérobiose humidité, dans des fèces de porc, sur des sols) (Gaasenbeek & Borgsteede, 1998). 35
Tableau n°6 : Concentration en œufs d'helminthes dans les boues (Horàk, 1992; Schwartzbrod & Schwartzbrod, 1999). 35
Tableau n°7 : Viabilité des œufs d'*Ascaris suum* exposés à différents procédés de traitement (Johnson *et al.*, 1998). 36
Tableau n°8 : Prévision des temps de rétention de digestion en fonction des températures pour une perte totale de la viabilité des œufs d'*Ascaris* (Reimers *et al.*, 1998) 37
Tableau n°9 : Cycle d'un *Ascaris lumbricoïdes* (Caceres *et al.*, 1982) 38
Tableau n°10 : Conditions de temps et température utilisées pour déterminer la viabilité 39
Tableau n°11 : Température et temps d'incubation pour l'obtention de 50% de larve L1 (Boisvenue, 1990). 39
Tableau n°12 : Répartition volumétrique de l'œuf d'*Ascaris lumbricoïdes* (Fairbain & Passey, 1957). 40
Tableau n°13 : Analyse quantitative des œufs et des larves d'*Ascaris suum* (Magat *et al.*, 1972). 40
Tableau n°14 : Structure de la coque de différents Nématodes avec présence ou absence d'une couche externe. 49
Tableau n°15 : Pourcentages de constituants des œufs d'*Ascaris lumbricoïdes* (Fairbain, 1957). 50
Tableau n°16 : Composition biochimique massique de l'œuf d'*Ascaris suum* et de la larve (Magat *et al.*, 1972). 52
Tableau n°17 : Termes employés pour désigner les protéoglycannes et les glycosaminoglycannes. 56
Tableau n°18 : Caractères distinctifs des glycoprotéines et des protéoglycannes 57
Tableau n°19 : Glycosaminoglycannes et leurs composés monosaccharidiques (Alberts *et al.*, 1986). 62
Tableau n°20 : Principaux domaines de vibrations infrarouges pour les grandes familles de molécules biologiques (Daudon & Estepa-Maurice, 1996). 69
Tableau n°21 : Composition en mucopolysaccharides acides chez l'*Ascaris* (Rahemtulla & Løvtrup, 1974b). 72
Tableau n°22 : Constitution de la gamme d'étalonnage en microtitration avec la sérum albumine bovine pour le dosage des protéines. 80
Tableau n°23 : Constitution de la gamme d'étalonnage avec la D-L-alanine pour le dosage des acides aminés. 81
Tableau n°24 : Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide glucuronique. 88
Tableau n°25 : Protocole de dégradation enzymatique d'une suspension de chitine par la chitinase. 89
Tableau n° 26: Caractéristiques des échantillons pour le dosage des glycosaminoglycannes 90
Tableau n° 27 : Gamme d'étalonnage de la chondroïtine 4-Sulfate. 91
Tableau n°28 : Gamme d'étalonnage des chondroïtines 0S, 4S et 6S pour l'électrophorèse capillaire zonale. 92
Tableau n°29 : Résultats des différentes colorations 95
Tableau n°30 : Résultats des dosages de protéines dans les échantillons lyophilisés d'œufs avec et sans couche externe 101

Tableau n°31 : Résultats des dosages d'acides aminés dans les échantillons lyophilisés d'œufs avec et sans couche externe. 102
Tableau n°32 : Résultats des dosages d'acides aminés dans les lyophilisats de sections proximales et distales d'utérus. 104
Tableau n°33 : Résultats des concentrations en acide glucuronique théoriques et calculées à partir de la droite de calibration. 105
Tableau n°34 : Rendement du protocole de dosage associant une étape enzymatique et la méthode de Blumenkrantz & Ashoe-Hansen (1973). 107
Tableau n°35 : Concentrations en glycosaminoglycannes totaux dans les échantillons hydrolysés. 111
Tableau n°36 : Comparaison des fréquences des principaux domaines de vibrations infrarouges (Daudon & Estepa-Maurice, 1996; Rouessac & Rouessac, 1997) avec les fréquences du spectre formé par différence des 2 lyophilisats d'œufs. 114
Tableau n°37: Forces de liaisons non covalentes dans les molécules biologiques (Leclerc *et al.*, 1995). 121
Tableau n°38 : Méthodes d'évaluation de l'hydrophobie de surface des microorganismes. 122
Tableau n°39 : Variations de l'affinité de différentes souches bactériennes en fonction de l'hydrocarbure (Rosenberg *et al.*, 1980). 124
Tableau n°40 : Agents inhibiteurs d'adhésion par interférence avec les effets hydrophobes (Rosenberg & Doyle, 1990). 126
Tableau n°41 : Caractéristiques physico-chimiques des particules testées. 131
Tableau n°42 : Volume des solutions acides et salines pour la préparation des solutions tamponnées à différents pH 131
Tableau n°43 : Caractéristiques des détergents testés. 132
Tableau n°44 : Préparation des solutions de sulfate d'ammonium tamponnées. 133
Tableau n°45 : Protocole de lavage des microsphères de sépharose et d'octyl-sépharose. 140
Tableau n°46 : Témoins d'adhésion pour 2 suspensions d'œufs avec une couche externe, avec et sans traitement à l'hypochlorite de sodium. 142
Tableau n°47 : Tests d'adhésion sur les surfaces des tubes Nunc® et Greiner® avec une solution saline ou de l'eau désionisée 143
Tableau n°48 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane et d'hexadécane obtenus sur une suspension d'œufs stockée à -20°C. 148
Tableau n°49 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane obtenu sur une suspension d'œufs fraîchement émis. 148
Tableau n°50 : Pourcentage moyen d'œufs avec couche externe retrouvés dans la phase aqueuse pour les essais à l'octane et à l'hexadécane. 149
Tableau n°51 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane obtenu pour des suspensions d'œufs extraits de boues résiduaires. 150
Tableau n°52 : Pourcentage moyen d'œufs avec couche externe retrouvés dans la phase aqueuse pour les essais à l'octane. 151
Tableau n°53 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane obtenu pour des suspensions d'œufs provenant de la partie distale de l'utérus. 151
Tableau n°54 : Pourcentage d'adhésion aux émulsions d'octane obtenu pour des suspensions d'œufs provenant de la partie centrale de l'utérus 152

Tableau n°55 : Interactions électrostatiques à la surface d'émulsions d'octane en présence de KNO_3 (0,1M et 0,01M) sur des d'œufs récupérés après la ponte. 153
Tableau n°56 : Interactions électrostatiques à la surface d'émulsions d'octane en présence de KNO_3 (0,1M et 0,01M) sur des d'œufs récupérés à partir de boues. 153
Tableau n°57: Interactions acido-basiques à la surface d'émulsions d'octane en présence de KNO_3 (0,1M et 0,01M) sur des d'œufs récupérés après la ponte. 154
Tableau n°58 : Interactions acido-basiques à la surface d'émulsions d'octane en présence de KNO_3 (0,1M et 0,01M) sur des d'œufs récupérés à partir de boues. 155
Tableau n°59 : Partage des œufs d'*Ascaris* entre l'interface et les 2 phases. 156
Tableau n°60 : Adhésion des œufs d'*Ascaris* sur des microsphères de sépharose et d'octyl-sépharose. 157
Tableau n°61 : Pourcentages d'adhésion des œufs d'*Ascaris* sur la poudre de verre : influence du pH et du stade de maturation de l'œuf. 164
Tableau n°62 : Pourcentages d'hydrophobie pour les différents types d'œufs. 165
Tableau n°63 : Pourcentages d'adhésion des œufs d'*Ascaris* avec couche externe avec le CIH en batch, le test d'adhésion aux microsphères de latex et le test TPP. 169
Tableau n°64 : Résultats sur les tests de mesure d'hydrophilie et d'hydrophobie. 171
Tableau n°65 : Evolution des modes d'utilisation et d'élimination des boues entre 1983 et 1995 (Bouché, 1995). 174
Tableau n°66 : Données quantitatives sur des concentrations en œufs d'helminthes dans les boues résiduaires en Europe et aux USA. 175
Tableau n°67 : Traitements physiques efficaces sur les œufs d'helminthes. 177
Tableau n°68 : Traitements physiques peu ou pas efficaces sur les œufs d'helminthes (Gaspard, 1995). 178
Tableau n°69 : Performances des traitements biologiques sur les œufs d'helminthes. 178
Tableau n°70 : Comparaison entre les deux types de rayonnement (γ et β) 182
Tableau n°71 : D_{90} après irradiations γ et β pour des bactéries, des entérovirus et des champignons dans des boues liquides. 185
Tableau n°72 : Doses de d'irradiation par rayonnement γ permettant une réduction de 99% de la population (Montiel & Welté, 1992) 186
Tableau n°73: Dose d'inactivation de 90% de la population de bactéries par rayonnement γ suivant la teneur en eau de la boue (Yeager & O'Brien, 1983). 186
Tableau n°74 : Comparaison de la sensibilité relative de *C. elegans* aux irradiations γ (Hartman *et al.*, 1996). 187
Tableau n°75 : Doses de radiations β pour l'inactivation des œufs *d'Ascaris* (Horàk, 1994) 188
Tableau n°76 : Inactivation des œufs d'*Ascaris* dans les boues par radiations γ (Yeager & O'Brien, 1983). 188
Tableau n°77 : Energie et intensité du faisceau d'électron de l'accélérateur électrostatique en fonction de la dose. 195
Tableau n°78 : Pourcentages de viabilité pour les échantillons et les témoins en fonction des doses d'irradiation. 198
Tableau n°79 : Effets de l'irradiation sur des œufs provenant de dissection ou extraits de boues résiduaires en fonction du milieu irradié. 205
Tableau n°80 : Concentrations en œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes (Gaspard, 1995). 213
Tableau n°81 : Concentrations en œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes. 213

Tableau n°82 : Fréquence relative des œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes à Baccarat et à Nancy (Stien, 1989), à El Azzouzia (Mandi *et al.*, 1992) et à Ismailia (Stott *et al.*, 1997)....214
Tableau n°83 : Variations saisonnières des concentrations en œufs de Nématodes dans les eaux usées brutes à Ismailia. (Stott *et al.*, 1997)....215
Tableau n°84 : Apport des MES par les eaux pluviales de 6 orages survenus au Japon (Uchimura *et al.*, 1997). 217
Tableau n°85 : Apports annuels des MES dans des eaux pluviales et dans des eaux résiduaires. 217
Tableau n°86 : Volumes des différents échantillons initiaux, du sédiment et des aliquotes. 222
Tableau n°87 : Données sur la station d'épuration. 226
Tableau n°88 : Nombre d'œufs d'helminthes dans les échantillons d'eaux usées....229
Tableau n°89 : Volume de l'eau brute mesuré sur une période de 24 heures lors des 5 campagnes avec précipitation. 236
Tableau n°90 : Quantité moyenne par heure et par jour des œufs d'helminthes en entrée de station d'épuration 238
Tableau n°91 : Probabilité statistiques de corrélation entre les MES et les concentrations en œufs d'helminthes. 246
Tableau n°92 : Données sur les précipitations et le nombre moyen d'œufs d'helminthes pour les 9 campagnes. 247
Tableau n°93 : Concentrations en œufs d'helminthes dans les différentes types d'eaux....248
Tableau n°94 : Distribution en fonction du type d'œufs d'helminthes dans les différentes types d'eaux. 248
Tableau n°95 : Œufs de Nématodes viables dans les différentes types d'eaux. 248
Tableau n°96 : Concentrations et quantités totales en œufs d'helminthes en entrée de station en fonction des précipitations lors de 3 campagnes de prélèvements (Bouché, 1995). 252

Figure n°1: Cycle d'*Ascaris lumbricoïdes* (Golvan, 1983). 27
Figure n°2 : Effet de la température sur le pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris suum* (Ghiglietti *et al.*, 1993). 31
Figure n°3 : Influence du temps et de la température sur la survie des microorganismes dans les gadoues et les boues (les lignes représentent les limites requises pour inactiver différents agents pathogène). 32
Figure n°4 : Effet de la température sur le pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris suum* dans une solution à 30% d'hydroxyde d'ammonium (Ghiglietti *et al.*, 1993). 33
Figure n°5 : Représentation de la coque de l'œuf d'*Ascaris* avec une couche chitineuse mamelonnée et irrégulière 42
Figure n°6 : Photographie en microscopie électronique à transmission : le corps polaire (PB), la couche lipidique (AL), les granules denses (DG), la couche externe (EL), la membrane vitelline (VL), et la couche chitineuse (CL), × 3500 (Foor, 1967) 43
Figure n°7 : Représentation de la coque de l'œuf d'*Ascaris* avec une couche externe mamelonnée et irrégulière (d'après Wharton, 1980). 44
Figure n°8 : Ultrastructure de l'œuf d'*Ascaris* en microscopie à balayage : couche externe (a), membrane vitelline (b), structure fibreuse et irrégulière de la couche chitineuse (c), structure lamellaire de la couche lipidique (d), espace périvitellin (e), membrane cytoplasmique de l'embryon (f), Lysek *et al.*, 1985). 44
Figure n°9 : Variations en poids sec des pourcentages des lipides totaux, glucides totaux, tréhalose et glycogène de l'œuf d'*Ascaris* (Fairbain, 1957). 53
Figure n°10 : Taux de consommation en oxygène lors de l'embryogenèse (140 jours) de l'œuf d'*Ascaris lumbricoïdes* (Passey & Fairbain, 1955). 54
Figure n°11: Exemple d'agrégat de protéoglycanne (Cox *et al.*, 1991). 59
Figure n°12 : Agencement des glycosaminoglycannes sur un "cœur" protéique pour le protéoglycanne du cartilage (Kennedy & White, 1988) 59
Figure n°13 : Formule moléculaire de l'unité monomérique de l'acide hyaluronique. 63
Figure n°14 : Formule moléculaire de l'unité monomérique de la chondroïtine 4-sulfate 64
Figure n°15 : Formule moléculaire de l'unité monomérique du dermatan 4-sulfate. 64
Figure n°16 : Formule moléculaire de l'unité monomérique de l'héparine 65
Figure n°17 : Formule moléculaire de l'unité monomérique du kératan 6-sulfate. 65
Figure n°18: Dissection d'une femelle *Ascaris* 75
Figure n°19 : Dissection du ver femelle et observation de l'utérus 76
Figure n°20 : Section de l'utérus d'*Ascaris* en 3 parties. 76
Figure n°21 : Spectres infrarouges des chondroïtines sulfates A et C entre 4000 et 500 cm^{-1}. 96
Figure n°22 : Spectres infrarouges des chondroïtines sulfates A et C entre 2000 et 500 cm^{-1}. 97
Figure n°23 : Spectres infrarouges des 2 suspensions d'œufs lyophilisées avec et sans couche externe. 98
Figure n°24 : Spectre infrarouge de la différence des 2 suspensions d'œufs lyophilisées pour des longueurs d'ondes de 2000 à 500 cm^{-1}. 99
Figure n°25 : Gamme d'étalonnage de BSA et de D-L-alanine. 100
Figure n°26 : Droite de calibration de l'acide glucuronique. 105
Figure n°27 : Dosage de l'acide glucuronique en fonction des quantités d'acide hyaluronique introduites 106
Figure n°28 : Gamme d'étalonnage de la chondroïtine 4-sulfate. 109

Figure n°29 : Spectre infrarouge de la différence des 2 suspensions d'œufs lyophilisée pour des longueurs d'ondes de 2000 à 500 cm^{-1}. 113
Figure n°30 : Réprésentation de la série de Hofmeister. 132
Figure n°31 : Protocole expérimental de séparation des œufs par le test de partage de phase. 139
Figure n°32 : Protocole de l'adhésion des œufs d'*Ascaris* sur des microsphères de sépharose ou d'octyl-sépharose en batch. 140
Figure n°33 : Représentation des œufs d'*Ascaris* après contact avec les microsphères de latex. 141
Figure n°34: Adhésion des œufs d'*Ascaris* sur poudre de verre à pH et temps de contact différents. 145
Figure n°35 : Adhésion sur la poudre de verre des œufs d'*Ascaris* selon leur degré de maturation 146
Figure n°36 : Adhésion des microsphères hydrophiles et hydrophobes à la surface des œufs en fonction du tampon. 159
Figure n°37 : Action des détergents sur l'adhésion des microsphères hydrophiles et hydrophobes sur la surface des œufs. 160
Figure n°38 : Comparaison de l'adhésion des microsphères hydrophiles et hydrophobes à la surface des œufs d'*Ascaris* en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium 161
Figure n°39 : Comparaison de l'adhésion des microsphères hydrophiles et hydrophobes à la surface des œufs en fonction de la concentration en nitrate de potassium. 162
Figure n°40 : Adhésion des microsphères sur la surface des œufs d'*Ascaris* provenant du rinçage des vers, en fonction de la concentration en nitrate de potassium. 162
Figure n°41 : Adhésion des microsphères sur la surface des œufs extraits de boues, en fonction de la concentration en nitrate de potassium. 163
Figure n°42: Pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris suum* dans des boues à 22°C en fonction de l'hydroxyde d'ammonium additionné (Ghiglietti *et al.*, 1997) 179
Figure n°43 : Courbes schématiques survie/dose pour des cellules irradiées. 184
Figure n°44 : Relation entre pourcentage de viabilité et les doses d'irradiation sur des suspensions d'œufs sans couche externe. 199
Figure n°45 : Pourcentage d'œufs d'*Ascaris* viables avec et sans couche externe en fonction des doses d'irradiation appliquées. 200
Figure n°46 : Pourcentage de viabilité des œufs après irradiation de boues contaminées en œufs d'*Ascaris* provenant de dissection. 202
Figure n°47 : Pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris* après irradiation des boues contaminées en œufs provenant de dissection. 203
Figure n°48 : Pourcentage de viabilité des œufs d'*Ascaris* après irradiation des boues contaminées en œufs extraits de boues résiduaires. 204
Figure n°49 : Représentation des flux moyens d'eaux usées par individu et par jour dans un réseau d'assainissement unitaire (Herrmann & Klaus, 1997) 215
Figure n°50 : Bassin versant de l'agglomération nancéienne 227
Figure n°51 : Débit moyen des eaux usées en entrée de station. 228
Figure n°52 : Distribution en fonction des espèces étudiées 229
Figure n°53 : Variation du pourcentage de viabilité au cours du temps. 230
Figure n°54 : Pourcentage de viabilité, précipitations et nombre de jours de pluies à Essey-lès-Nancy de décembre 1996 à avril 1998. 231

Figure n°55 : Concentration en œufs d'helminthes par échantillon de 20 litres dans les eaux brutes de décembre 1996 à avril 1998. 232
Figure n°56 : Flux d'œufs d'helminthes dans les eaux brutes de décembre 1996 à avril 1998. 232
Figure n°57 : Variations du nombre d'œufs d'helminthes (1ère et 2de campagne). 233
Figure n°58 : Variations horaires du nombre d'œufs d'helminthes (3ème et 4ème campagne). 234
Figure n°59 : Flux d'œufs d'helminthes en entrée de station 235
Figure n°60 : Comparaison du débit moyen par heure en entrée de station (temps sec et épisode pluvieux d'avril 1996). 236
Figure n°61 : Comparaison des débits moyens en entrée de station (temps sec et les 2 épisodes pluvieux de novembre 1996) 237
Figure n°62 : Comparaison du débit moyen en entrée de station (temps sec et épisode pluvieux du 8-9 mai 1997). 237
Figure n°63 : Flux d'œufs d'helminthes en entrée de station (campagne du 23 et 24 avril 1996). 238
Figure n°64 : Quantité d'œufs d'helminthes en entrée de station (campagne du 6 et 7 novembre 1996). 239
Figure n°65 : Flux d'œufs d'helminthes en entrée de station (campagne du 20 et 21 novembre 1996). 239
Figure n°66 : Flux d'œufs d'helminthes en entrée de station d'épuration (campagne du 8 et 9 mai 1997). 240
Figure n°67 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 23-24 avril 1996). 241
Figure n°68 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 6 et 7 novembre 1996) 242
Figure n°69 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 20-21 novembre 1996) 243
Figure n°70 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 8 et 9 mai 1997). 244
Figure n°71 : Nombre d'œufs d'helminthes par échantillon et la pluviométrie (campagne de prélèvement du 26 et 27 août 1997). 245
Figure n°72 : Relation entre le nombre d'œufs d'helminthes dans les échantillons d'eaux usées brutes et les MES. 246
Figure n°73 : Quantité d'œufs d'helminthes pour les 7 campagnes. 252

Prénom, Nom : ***Sandrine CAPIZZI***

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy I
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 7 février 2000 n° 343

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I ★ LE PRÉSIDENT

Claude BURLET

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1

24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex · Tél. 03 83 85 48 00 · Fax 03 83 85 48 48

Adresse électronique : _____ @uhp.u-nancy.fr

RESUME

L'ascaridiose est une parasitose intestinale très cosmopolite touchant de nombreux individus. Cette large diffusion peut s'expliquer en partie à travers la grande résistance de l'œuf d'*Ascaris* aussi bien dans l'environnement qu'aux différents traitements d'épuration des eaux usées. La maîtrise de ce danger passe par une meilleure connaissance de la structure de l'œuf et de son comportement dans l'environnement

La première partie de notre travail est consacrée à l'analyse de la structure de la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*.

- L'étude biochimique a été réalisée sur la couche externe utérine de l'œuf d'*Ascaris* qui est responsable de l'apparence mamelonnée de l'œuf. Il a été procédé à l'analyse d'un certain nombre de constituants : protéines, mucopolysaccharides, glycosaminoglycannes, acide hyaluronique. Les colorations histologiques témoignent de la présence de mucopolysaccharides acides. L'analyse des bandes d'absorption par IR indique que parmi les constituants de la couche externe de l'œuf d'*Ascaris*, il y aurait présence de polysaccharides et de protéines. Les dosages enzymatiques n'ont pas permis de mettre en évidence de l'acide hyaluronique dans la couche externe de l'œuf.

- Pour la détermination des caractéristiques de surface (hydrophobicité, hydrophilie, amphiphilie) de l'œuf d'*Ascaris*, nous avons étudié les propriétés de l'adhésion des œufs d'*Ascaris*. L'étude des propriétés hydrophiles sur poudre de verre, a démontré que les pourcentages d'adhésion sont supérieurs à pH acide avec plus de 90 % des œufs adhérant sur le support. Pour la détermination du potentiel d'hydrophobicité des œufs d'*Ascaris*, il est de plus de 95% avec des émulsions d'octane pour les œufs fraîchement émis. La chromatographie d'interactions hydrophobes indique que 77,1% des œufs adhèrent aux microsphères hydrophobes d'octyl-sépharose. De plus, 80,3% des microsphères de latex hydrophobes adhèrent aux œufs.

La seconde partie de notre travail vise à déterminer le comportement de l'œuf d'*Ascaris* dans divers contextes environnementaux. Ainsi, nous avons étudié l'impact des irradiations β sur ces œufs et l'influence des eaux pluviales sur la contamination parasitaire des eaux usées.

- L'irradiation β n'entraîne pas de rupture ou d'éclatement de la coque de l'œuf. En terme de viabilité à faible dose, la couche externe de l'œuf joue un rôle protecteur de l'embryon dans le milieu extérieur. Pour des irradiations importantes, aucune différence en fonction de la présence ou de l'absence de la couche externe n'est observée.

- Enfin, l'étude métrologique du flux d'œufs d'helminthes dans les eaux usées brutes a été réalisée pendant 17 mois. En terme de distribution, les œufs de Nématodes représentent 43% des œufs d'helminthes, les œufs de Cestodes 57%. Au niveau de la viabilité, si des œufs de Nématodes viables sont toujours présents, les pourcentages les plus bas sont retrouvés en été avec 14% et les valeurs maximales de 50% en hiver. Sur le plan quantitatif, les concentrations parasitaires ne sont pas constantes sur une période de 24 heures, puisque deux pics apparaissent, l'un entre 9 heures et 12 heures, l'autre entre 21 heures et 23 heures. Par ailleurs, il semblerait que des pluies intenses succédant à une période sèche provoquent un relarguage important des œufs par lessivage des surfaces.