

Comportement de Cryptosporidium spp. dans l'eau : conséquences au niveau de la microfiltration tangentielle

Céline Drozd

▶ **To cite this version:**

Céline Drozd. Comportement de Cryptosporidium spp. dans l'eau : conséquences au niveau de la microfiltration tangentielle. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1996. Français. NNT : 1996NAN12143 . tel-01747571

HAL Id: tel-01747571
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747571

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

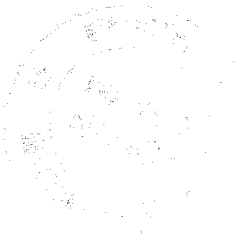
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I

1996

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE & SANTÉ"

THESE



présentée et soutenue publiquement

Le 24 juin 1996

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I

mention

Chimie et Microbiologie de l'Eau

par

Céline DROZD

titulaire du Diplôme d'Études Approfondies
Chimie et Microbiologie de l'Eau

Sujet :

Comportement de *Cryptosporidium spp.* dans l'eau : conséquences au niveau de la microfiltration tangentielle

MEMBRES DU JURY

Juges : Mme Naciri M. (INRA - TOURS)
Pr Schwartzbrod J. (UHP - NANCY)
Pr Block J.C. (UHP - NANCY)
Dr Lahoussine - Turcaud (Agence de l'Eau Seine Normandie - PARIS)

Rapporteurs : Dr Harf - Monteil (Université Louis Pasteur - STRASBOURG)
Pr Timon - David (Doyen de la Faculté de Pharmacie - MARSEILLE)



104 027499 9

"L'homme intelligent connaît la rive en même temps qu'il se laisse emporter au fil de l'eau ; il écoute les sources et se complaît au bord de l'eau."

Shitao - 1710
Théoricien Chinois

"J'ai connu un alchimiste qui, après avoir considéré la nature de mes nouveaux sels, et lui ayant assuré que le dissolvant dont je me servois étoit universel et homogène à tout, parce qu'il se chargeoit également de tous les sels sans distinction, voulut me persuader que j'avois trouvé le dissolvant qui fait la base du Grand Oeuvre : il fut extrêmement surpris, lorsque je l'assurai que c'étoit de l'eau la plus pure et la plus simple. Peu de jours après il revint, et persistant dans sa première idée, il me dit que l'eau étoit le dissolvant que les anciens philosophes avoient caché sous des énigmes et des hiéroglyphes, que tous les noms mystérieux sous lesquels ils l'avoient voilé lui convenoient.

M.L.C.D.L.G. Chimie hydraulique pour extraire
les sels essentiels des végétaux, animaux et minéraux,
avec l'eau pure - Jean-Baptiste Coignard
Paris - 1745

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir accepter cette tâche .

A mon directeur de thèse, Mme Schwartzbrod, j'exprime toute ma gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour la confiance qu'elle m'a témoignée tout au long de ce travail.
A mes rapporteurs, Mme Harf-Monteil et Mr Timon-David, qui ont accepté d'apporter un regard critique précieux sur ce travail, j'exprime toute ma reconnaissance.
A Mr Jean-claude Block, dont les conseils et le dynamisme stimulant, m'ont permis de persévérer et progresser dans mes travaux, qu'il soit ici remercié.
A Mme Naciri, qui a bien voulu accepter de juger ce travail. Qu'elle soit remerciée également pour sa collaboration au cours de ce travail, puisqu'elle nous a permis grâce à des envois réguliers de grandes quantités de parasites, de bénéficier sans discontinuer du matériel de base de cette étude.
Enfin, à Mme Laboussine-Turcaud, pour sa confiance tout au long de ce travail et pour avoir soutenu notre projet auprès de l'Agence de l'Eau Seine Normandie qui a garanti le support financier de cette étude. Qu'elle soit ici remerciée.

Je voudrais également remercier Mme Kures, qui m'a permis avec beaucoup de gentillesse de bénéficier de ses conseils depuis le début de mes travaux.

J'exprime également toute ma gratitude à Mr Maul, qui a su éclairer les nombreux problèmes statistiques qui ont jalonné ce travail et qui a toujours fait preuve d'une grande disponibilité pour apporter ses conseils.

Il me faudrait remercier encore Mr Morlot qui a permis la réalisation de certaines analyses physico-chimiques au Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique de Nancy, mais également l'Ecole de Géologie de Nancy qui a bien voulu nous accueillir dans ses locaux pour bénéficier de ses appareils de mesure, et spécialement Mme Bouquet qui a accepté de m'initier aux joies du zétamètre. Egalement

Enfin, je tiens à remercier Chantal Béril-Stien pour m'avoir fait partager ses compétences techniques et scientifiques, mais également Mr Gauché dont le support technique indispensable a permis de faciliter mon travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude pour leur gentillesse et leur soutien pendant une grande partie de mon séjour au laboratoire.

A mes parents. *Qui m'ont toujours soutenue, aidée, réconfortée et motivée pour accomplir ce travail et l'ensemble de mes études. Que ce travail soit la preuve de mon affection et du bonheur qu'ils m'ont toujours apporté.*

A ma soeur Nathalie. *Qui a constamment été à mes côtés pour me soutenir et me donner le courage d'avancer toujours plus loin. Que ce travail, qui représente le fruit de nos années de travail en commun, soit le gage de mon attachement et de mon affection.*

A mes soeurs Anne-Marie, Ghislaine et Edith. *Qui m'ont toujours soutenue et fait confiance tout au long de mes études. Qu'elles trouvent ici le témoignage de mon affection et de ma reconnaissance.*

A mes neveux et nièces Emilie, Alexandra, Benoit et Valentin. *Que ce travail puisse leur apporter une motivation pour aller toujours plus loin, qu'ils n'oublient pas que le travail et l'acharnement ne sont jamais vains. Qu'ils soient convaincus de ma confiance et mon affection qui les accompagneront dans tous leurs efforts.*

A tous mes amis. *Et particulièrement Laurence et Christophe. Qu'ils trouvent ici le gage de mon amitié.*

OBJECTIFS.....1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....2

I - PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE CRYPTOSPORIDIUM :.....2
I.1.- HISTORIQUE :.....2
I.2 - CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES:.....2
I.2.1. - Taxonomie :.....2
I.2.2. - Morphologie : 3
I.2.3. - Cycle de vie : 4
I.3 - CLINIQUE ET TRAITEMENT :.....5
I.4. - TRANSMISSION, EPIDEMIOLOGIE ET PRESENCE DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'ENVIRONNEMNT :.....7
I.4.1. - Transmission : 7
I.4.2. - Epidémiologie : 11
I.4.3. - Présence de Cryptosporidium dans l'environnement : 16
I.5. - SENSIBILITE A DIFFERENTS TRAITEMENTS PHYSICO-CHIMIQUES:.....21
I.5.1. - Dessication et température : 21
I.5.2. - Radiations U.V. : 22
I.5.3. - Composés chimiques : 22

II - EFFICACITE DES DIFFERENTS SYSTÈMES DE TRAITEMENT DES EAUX SUR L'ELIMINATION DE CRYPTOSPORIDIUM :.....24
II.1. - SYSTEMES DE TRAITEMENT RELATIFS A L'EAU DESTINEE A LA CONSOMMATION:.....25
II.1.1. - Stockage en réservoir: 25
II.1.2. - Floculation : 26
II.1.3. - Les systèmes de filtration : 28
II.1.4. - La désinfection : 32
II.2. - SYSTEMES D'EPURATION DES EAUX USEES:.....36

III - LES NOUVELLES TECHNIQUES DE MICRO ET D'ULTRAFILTRATION APPLIQUÉES AUX TRAITEMENTS DES EAUX:.....40
III.1. - CARACTERISTIQUES GENERALES DES SYSTEMES DE MICRO ET D'ULTRAFILTRATION UTILISES EN TRAITEMENT DES EAUX :.....41
III.1.1. - Le mode de filtration : 41
III.1.2. - Les différents types de module filtrant utilisés : 42

III.2. - EFFICACITE DES SYSTEMES TESTES POUR LE TRAITEMENT DES EAUX :.....47

IV - STRUCTURE ET CARACTERISATION DE LA SURFACE DE CRYPTOSPORIDIUM :.....54
IV.1. - CHARGE DE SURFACE :DES OOCYSTES :.....54
IV.2. - ULTRASTRUCTURE DE LA PAROI DE CRYPTOSPORIDIUM :.....55
IV.3. - STRUCTURE ANTIGENIQUE DU PARASITE :.....58
IV.4. - RESISTANCE STRUCTURALE DES OOCYSTES AUX DIFFERENTES CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE TRAITEMENT DES ECHANTILLONS :.....59

V - METHODES DE DETECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU :.....61
V.1. - METHODES DE CONCENTRATION :.....62
V.1.1. - Méthodes de filtration :.....62
V.1.2. - Méthodes de floculation :.....64
V.2. - METHODES DE PURIFICATION :.....67
V.3. - METHODES D'IDENTIFICATION :.....69
V.3.1. - Méthodes de coloration :.....69
V.3.2. - Techniques ELISA :.....74
V.3.3. - La cytométrie de flux :.....74
V.3.4. - La biologie moléculaire : PCR :.....75
V.4. - VIABILITE :.....76
V.4.1. - Le pouvoir infectant chez l'animal :.....77
V.4.2. - Le développement sur culture cellulaire :.....79
V.4.3. - Les colorants fluorogéniques et l'excystation :.....80

MATERIELS ET METHODES.....88

I - CRYPTOSPORIDIUM :.....88
I.1.- SOURCE DE PARASITES:.....88
I.2.- PURIFICATION DES OOCYSTES A PARTIR DE SELLES:.....88
I.2.1.- Séparation sur formol - éthyl acétate :.....88
I.2.2.- Flottation sur chlorure de sodium :.....89
I.2.3.- Séparation sur gradient de saccharose :.....89
I.3.- DENOMBREMENT:.....91
I.3.1.- Dénombrement classique sans coloration :.....91
I.3.2.- Dénombrement après coloration par immunofluorescence :.....92
I.3.2.1.- Coloration par immunofluorescence directe :.....93

I.3.2.2.- Coloration par immunofluorescence indirecte :.....94

II - ETUDE DE L'HYDROPHOBICITE ET DES PROPRIETES ELECTROSTATIQUES DE SURFACE DE CRYPTOSPORIDIUM:.....96
II.1.- MESURE ET DÉTERMINATION DU POTENTIEL ZETA :.....96
II.2.- DETERMINATION DE L'HYDROPHOBICITE DE SURFACE DES OOCYSTES :.....97

III - ETUDE DE LA VIABILITE DES OOCYSTES :.....99
III.1.- DEVELOPPEMENT SUR CULTURE CELLULAIRE :.....99
III.1.1.- Purification des oocystes :.....99
III.1.2.- Excystation des oocystes :.....99
III.1.3.- Cultures cellulaires :.....101
III.1.4.- Infection des cellules par Cryptosporidium :.....101
III.2.- INCLUSION DES COLORANTS VITAUX FLUOROGENIQUES :.....102
III.2.1.- Purification des oocystes :.....102
III.2.2.- Préincubation :.....102
III.2.3.- Incubation :.....104
III.2.4.- Dénombrement :.....104

IV - DETECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU PAR FLOCULATION :.....104
IV.1.- TYPES D'EAUX UTILISES :.....104
IV.2.- PROTOCOLE DE BASE UTILISÉ POUR L'ETUDE METHODOLOGIQUE :.....106
IV.3.- PROTOCOLE FINAL UTILISE POUR LA DETECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU :.....107

V - ETUDE DU SYSTEME PILOTE DE MICROFILTRATION :.....108
V.1.- DESCRIPTIF DU SYSTEME PILOTE UTILISE :.....108
V.2.- TYPES D'EAUX UTILISES :.....109
V.3.- CARACTERISATION DES ECHANTILLONS D'EAUX ANALYSES ET PROTOCOLE D'ETUDE DU SYSTEME PILOTE :.....109
V.3.1.- Protocole général d'étude du système pilote :.....109
V.3.2.- Caractérisation des échantillons d'eaux analysés :.....109
V.3.2.1.- Analyse physico-chimique :.....109
V.3.2.2.- Analyse microbiologique : Recherche de Cryptosporidium.....111
V.4.- NOTIONS D'HYDRAULIQUE UTILISEES DANS L'ETUDE DU PILOTE :.....111
V.5.- PROTOCOLE DE LAVAGE ET DE DECOLMATAGE DU SYSTEME :.....112

RESULTATS....114

A - PURIFICATION DES OOCYSTES....114

A.I.- PURIFICATION DES OOCYSTES À PARTIR D'ECHANTILLONS CONTAMINES ARTIFICIELLEMENT:....114
A.I.1.- MÉTHODES ET PROTOCOLES TESTES :....114
A.I.1.1.- Contamination artificielle :....114
A.I.1.2.- Protocole général :....115
A.I.1.3.- Méthodes spécifiques utilisées :....116
A.I.1.4.- Expression des résultats et calcul des rendements de purification :....117
A.I.2.- RESULTATS ET DISCUSSION :....118
A.I.2.1.- Comparaison des 4 protocoles de purification principaux testés :....118
A.I.2.2.- Utilisation des détergents et des ultrasons :....122
A.I.2.3.- Variation des rendements de récupération des oocystes suivant le niveau de contamination de départ :....123
A.I.3.- CONCLUSION :....125

A.II.- PURIFICATION DES OOCYSTES À PARTIR DE SELLES RECOLTÉES AUPRES DE SUJETS CONTAMINES....125
A.II.1.- MÉTHODES ET PROTOCOLES TESTES :....125
A.II.1.1.- Protocole général :....126
A.II.1.2.- Méthodes spécifiques utilisées :....127
A.II.1.3.- Expression des résultats :....127
A.II.2.- RESULTATS ET DISCUSSION :....128
A.II.2.1.- Concentration et récupération des oocystes après purification :....128
A.II.2.2.- Estimation du degré de purification obtenu selon les différents protocoles :....129
A.II.3.- CONCLUSION :....130

B - ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE SURFACE DE CRYPTOSPORIDIUM....132

B.I.- EVALUATION DE L'HYDROPHOBICITE ET DU POTENTIEL ZETA DE CRYPTOSPORIDIUM : PRINCIPE ET METHODOLOGIE :....132
B.I.1.- POTENTIEL ZETA : Principe :....133
B.I.2.- HYDROPHOBICITE:....134
B.I.2.1.- Principe :....134

B.I.2.2.- Adaptation du test AMH pour l'évaluation de l'hydrophobicité de Cryptosporidium :....137
B.I.2.2.1.- Protocoles et méthodes utilisées :....137
B.I.2.2.2.- Résultats et discussion :....138
B.I.2.2.3.- Conclusion :....142

B.II.- HYDROPHOBICITE ET PROPRIETES ELECTROSTATIQUES DE SURFACE DE CRYPTOSPORIDIUM :....143
B.II.1.- PROTOCOLE ET METHODES UTILISES :....143
B.II.2.- RESULTATS :....144
B.II.3.- DISCUSSION :....153

B.III.- CONCLUSION :....154

C - ETUDE DE LA VIABILITE DES OOCYSTES....156

C.I.- DEVELOPPEMENT SUR CULTURE CELLULAIRE :....156
C.I.1.- PRINCIPE ET METHODOLOGIE :....156
C.I.2.- RESULTATS :....157
C.I.3.- CONCLUSION :....161

C.II.- EVALUATION DE LA VIABILITE DES OOCYSTES PAR INCLUSION-EXCLUSION DE COLORANTS FLUOROGENIQUES :....161
C.II.1.- PRINCIPE ET METHODOLOGIE :....161
C.II.2.- RESULTATS :....162
C.II.3.- CONCLUSION :....166

D - DETECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU PAR FLOCULATION....167

D.I.- PROTOCOLE GENERAL, PRINCIPE ET METHODES UTILISES :....167
D.I.1.- PRINCIPE :....167
D.I.2.- PROTOCOLE GENERAL ET METHODOLOGIES EMPLOYEES :....168
D.I.2.1.- Optimisation des rendements de récupération des oocystes par floculation :....168
D.I.2.2.- Etude de l'impact des procédés de floculation sur la viabilité des oocystes

concentrés :.....172

D.II.- RESULTATS ET DISCUSSION :.....173
D.II.1.- OPTIMISATION DES RENDEMENTS DE RÉCUPÉRATION DES OOCYSTES PAR FLOCULATION :.....173
D.II.1.1.- Floculation au carbonate de calcium :.....173
D.II.1.2.- Floculation à l'hydroxyde d'aluminium :.....175
D.II.1.3.- Comparaison des deux grands modes de floculation définis :.....177
D.II.2.- ETUDE DE L'IMPACT DES PROCÉDÉS DE FLOCULATION SUR LA VIABILITÉ DES OOCYSTES CONCENTRÉS :.....178

D.III.- CONCLUSION :.....180

E - ETUDE DU SYSTEME PILOTE DE MICROFILTRATION.....182

E.I.- CHOIX DE L'ELEMENT FILTRANT ET DE DIFFERENTS AUTRES COMPOSANTS DU SYSTEME PILOTE :.....182
E.I.1.- CHOIX DE L'ELEMENT FILTRANT :.....182
E.I.2.- CHOIX DE DIVERS AUTRES COMPOSANTS DU SYSTEME PILOTE :.....186

E.II.- REGLAGES ET MISE AU POINT DES CONDITIONS HYDRAULIQUES DE FONCTIONNEMENT OPTIMAL DU SYSTEME :.....186
E.II.1.- OPTIMISATION DES CONDITIONS HYDRAULIQUES DE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME :.....187
E.II.2.- DEFINITION D'UN PROTOCOLE DE NETTOYAGE :.....196

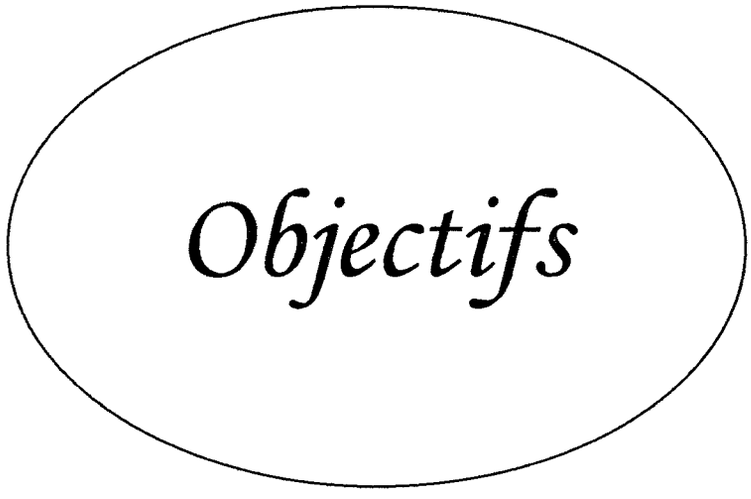
E.III.- EVALUATION DES PERFORMANCES DU SYSTEME PILOTE POUR L'ELIMINATION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU :.....197
E.III.1.- PERFORMANCES HYDRAULIQUES DU SYSTEME PILOTE :.....198
E.III.2.- CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ECHANTILLONS ET IMPACT DE LA FILTRATION SUR CERTAINS DE CES PARAMETRES :.....201
E.III.2.1.- Evolution des paramètres turbidité, MEST et COT au niveau alimentation, filtrat et concentrat au cours des cycles de filtration sur pilote :.....202
E.III.2.2.- Caractérisation du pH et de la conductivité des différentes fractions collectées :.....204
E.III.3.- ELIMINATION DE CRYPTOSPORIDIUM AU COURS DU PROCESS DE

MICROFILTRATION :.....206
E.III.3.1.- Efficacité du système pilote pour l'élimination de Cryptosporidium dans l'eau traitée :.....206
E.III.3.2.- Etude de la viabilité des oocystes au niveau des rejets de concentrat du pilote :.....210

CONCLUSION.....212

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....218

GLOSSAIRE.....236


Objectifs

OBJECTIFS

Depuis les années 80 et de plus en plus au cours des dernières années, de nombreuses épidémies de cryptosporidioses se sont déclarées, la plus récente ayant été décrite à Milwaukee (USA) en avril 1993 où 400 000 personnes ont été contaminées. Face à l'ampleur du problème, l'élimination de *Cryptosporidium* dans les eaux est ressentie aujourd'hui comme un impératif notoire.

Depuis quelques années les systèmes de microfiltration connaissent un essor important dans le domaine du traitement des eaux. L'intérêt pour ces techniques réside notamment dans leur aptitude à clarifier et à décontaminer l'eau en une seule étape. Ces nouveaux procédés, dans le cadre de l'élimination de *Cryptosporidium* dans l'eau, pourraient offrir une alternative aux systèmes de traitement classiques qui ne garantissent pas une fiabilité totale dans ce domaine comme l'ont prouvé les nombreuses épidémies recensées.

L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer l'efficacité des systèmes de potabilisation employant les procédés de microfiltration tangentielle pour l'élimination de *Cryptosporidium* à partir d'eaux de surface.

La réalisation de ce travail a nécessité la mise au point préliminaire de différentes techniques visant à qualifier une méthode permettant de purifier, concentrer et tester la viabilité des oocystes de *Cryptosporidium* présents dans les échantillons d'eaux analysés au cours de l'étude sur pilote de microfiltration.

Afin d'appréhender le comportement des oocystes et les phénomènes d'adhésion aux surfaces et particules en suspension intervenant au cours des procédés de microfiltration mais également lors des phases de concentration par floculation, une étude visant à évaluer les caractéristiques de surface du parasite a été menée.

Un des objectifs fondamentaux de cette étude a donc été de déterminer l'hydrophobicité et la charge de surface (potentiel Zéta) des oocystes de *Cryptosporidium* ainsi que l'impact de certains facteurs environnementaux comme le pH ou la force ionique sur les propriétés de surface du parasite.

A partir de ces données, la dernière partie de l'étude a permis de définir un système pilote de microfiltration tangentiel appliqué aux traitement des eaux de rivière et d'étudier son efficacité sur l'élimination de *Cryptosporidium* et en parallèle de caractériser le potentiel infectieux de ses rejets.

Etude Bibliographique

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I - PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE CRYPTOSPORIDIUM :

I.1.- HISTORIQUE :

Si la première description de *Cryptosporidium* chez la souris est ancienne (Tyzzer, 1907), ce n'est qu'en 1976 qu'est rapporté le premier cas de cryptosporidiose humaine (Nime *et al.*, 1976). Il a ainsi fallu près de 75 ans après sa découverte initiale pour que *Cryptosporidium* fasse l'objet de travaux plus développés.

En effet depuis 1980, le nombre d'infections à *Cryptosporidium* reconnu ne cesse de croître : ainsi en Grande Bretagne le nombre annuel de cas rapportés est passé de 2139 en 1985 à 9147 en 1989 (Badenoch, 1990).

Si cette pathologie a été d'abord majoritairement associée à des patients immunodéprimés et particulièrement ceux atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Barer et Wright, 1990 - Janoff et Reller, 1987), elle est désormais également décrite chez des patients immunocompétents.

En 1985, D'Antonio *et al.* ont rapporté la première épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique au Texas, touchant une communauté de 6000 personnes et depuis cette date de nombreuses épidémies du même type ont été enregistrées (Badenoch, 1990). L'épidémie la plus récente a eu lieu à Milwaukee en avril 1993 où 403000 personnes ont souffert de diarrhées profuses attribuées à *Cryptosporidium*. (Mc Keenzie *et al.* , 1994).

I.2 - CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES:

I.2.1. - Taxonomie :

Cryptosporidium est un protozoaire:

- Classe : *Sporozoaire*
- Sous - classe : *Coccidia*
- Ordre : *Eucoccidiida* (Levine *et al.*, 1980)
- Sous - ordre : *Eimeriina*
- Famille : *Cryptosporidiida*

Depuis la description de *C. muris* infectant la souris par Tyzzer en 1907, 18 espèces supplémentaires de *Cryptosporidium* ont été dénommées sur l'hypothèse de leur spécificité d'hôte (Levine, 1984).

Des études plus précises sur la spécificité d'hôte de ces différentes espèces ont permis de déterminer plusieurs groupes majeurs :

- *C. parvum* et *C. muris* : responsables des infections chez les mammifères et caractérisés par une faible spécificité d'hôte.
- *C. meleagridis* et *C. baileyi* : inféodés aux oiseaux.
- C. *nasorum* et *C. crotalis* : respectivement inféodés aux poissons et aux reptiles. (Levine, 1984)

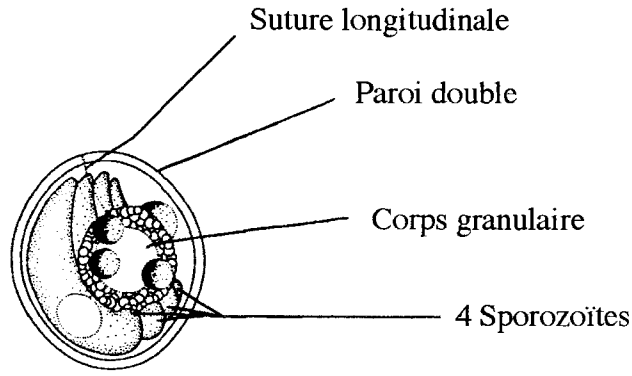
A l'heure actuelle, l'espèce considérée comme responsable dans la majorité des cas de la pathologie clinique chez l'homme et le bétail est *C. parvum.* (Upton et Current, 1985 ; Current, 1987).

En l'absence de travaux complémentaires sur la description et la spécificité d'hôte de chaque espèce, les oocystes isolés à partir de selles de veaux ou humaines sont assimilés à l'espèce *Cryptosporidium parvum* par la plupart des auteurs.

I.2.2. - Morphologie :

Sur le plan morphologique les oocystes de *Cryptosporidium* , de forme ovoïde et d'un diamètre de 4 à 6 µm, contiennent en outre 4 sporozoïtes et un corps granulaire résiduaire (Figure N°1).

Figure N°1 : Structure de l'oocyste (Upton et Current, 1985)



Ces oocystes peuvent se présenter sous deux formes :

- 80% des oocystes générés possèdent une paroi épaisse responsable de la survie à long terme dans l'environnement. Ils constituent la forme de résistance et sont responsables de la

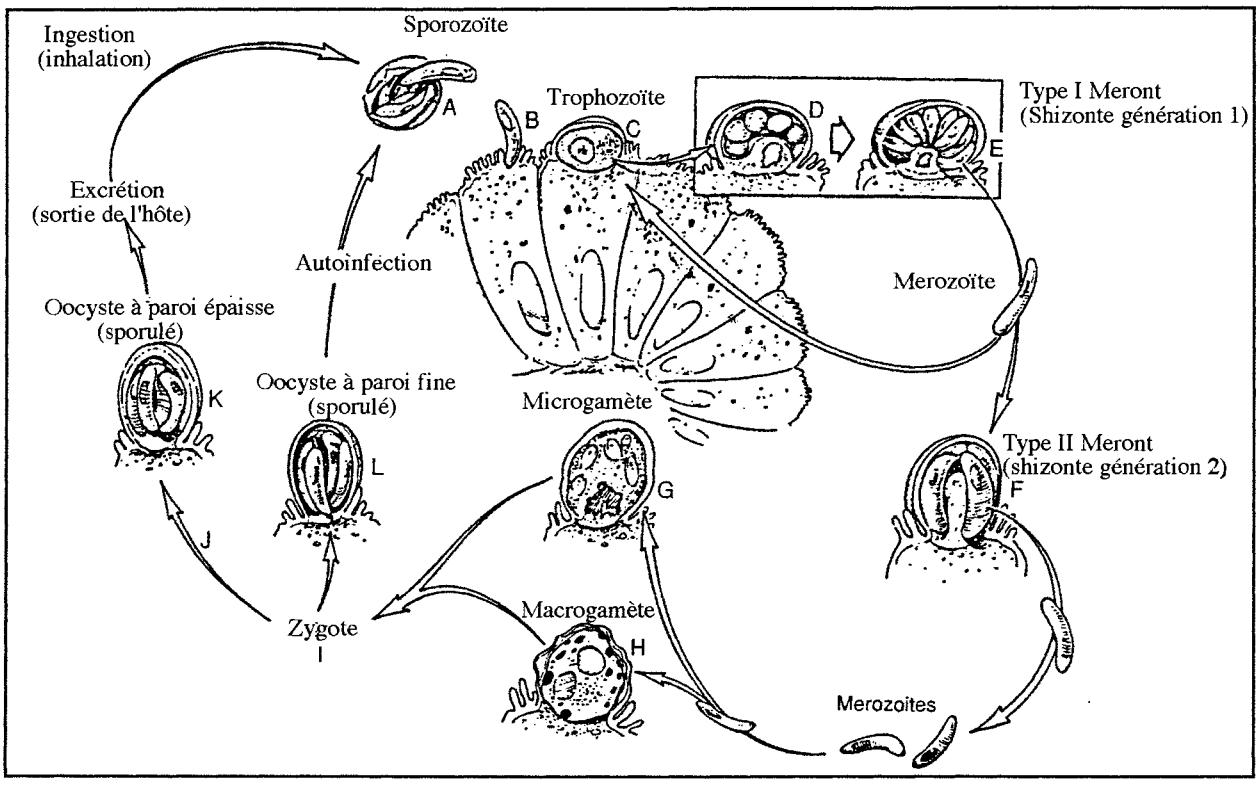
contamination humaine et animale.

- 20% des oocystes par contre ont une paroi simple mince et sont responsables uniquement du cycle d'autoinfestation. Ils ne résistent pas dans l'environnement. (Bonnin et Camerlynck, 1989 ; Barer et Wright, 1990)

I.2.3. - Cycle de vie :

Cryptosporidium est caractérisé par un cycle de vie très complexe et se déroulant sur une période de 1 à 8 jours (Figure N°2)

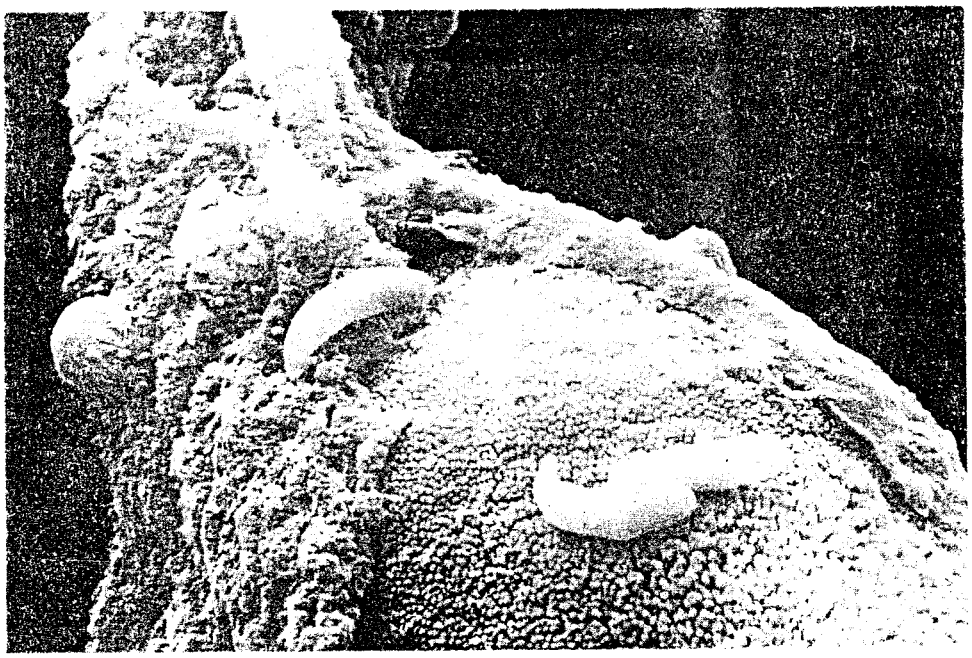
Figure N°2 : Cycle de développement de *Cryptosporidium parvum* (Current et Blackburn, 1990)



Ce cycle évolutif comporte une étape principale de développement dans le tractus gastrointestinal de l'hôte infecté. Les oocystes résistants dans l'environnement sont ingérés et excystés dans le lumen intestinal.

Cette étape de dékystement permet aux 4 sporozoïtes contenus dans chaque oocyste d'être relargués par le biais de l'ouverture de la suture longitudinale caractéristique de la forme enkystée (Figure N°2 (A)). Les sporozoïtes caractérisés par une forme de virgule approchent les cellules par de petits mouvements obtenus par contraction et extension de leur partie antérieure (Figure N°3).

Figure N°3 : Photographie de l'approche de trois sporozoïtes à la surface d'un entérocyte de l'iléon d'une souris en microscopie électronique (Badenoch, 1990). (Le développement d'un trophozoïte protubérant peut être observé sur la gauche de l'entérocyte.)



Ces sporozoïtes une fois libérés vont donc pénétrer dans les cellules épitheliales du tube digestif (B): une fois la partie antérieure des sporozoïtes amenée à proximité des cellules hôtes grâce à la motilité de ces sporozoïtes, la membrane cellulaire s'invagine et de fines extensions des microvillosités membranaires "englobent" le parasite et forment une vacuole intracellulaire mais extracytoplasmique contenant le parasite et localisée à la surface "luminale" des cellules (C) (Petersen, 1993).

Le cycle asexué pourra alors se dérouler (D - E - F) allant du stade trophozoïte jusqu'à la formation de 8 mérozoïtes qui seront relargués des cellules et iront infecter les cellules épithéliales adjacentes (G - H) afin d'aboutir après développement sexué (G - H - I) à la formation de nouveaux oocystes (K - L) qui pourront soit réinitier un cycle asexué endogène (L) soit au contraire être excrétés dans les fèces (K) (Rose, 1988).

I.3. - CLINIQUE ET TRAITEMENT :

❍ *Chez l'Homme* :

➨ ***CLINIQUE :*** *Cryptosporidium* sp. est associé généralement à des diarrhées

liquides profuses accompagnées de douleurs abdominales, vomissements et fièvre faisant suite à une incubation silencieuse de 3 à 8 jours (Jokipï *et al.*, 1985 ; Smith *et al.*, 1988).

La durée et l'intensité des symptômes varient considérablement selon l'individu et sont probablement reliées à des facteurs spécifiques relatifs à l'hôte infecté, comme son statut immunologique.

* Chez les sujets immunocompétents les symptômes diarrhéiques relevés chez 80 à 90 % des patients n'excèdent habituellement pas 30 jours (Jokipï *et al.*, 1985 ; Badenoch, 1990) et sont généralement régressifs sans traitement. La surveillance systématique en coprologie de *Cryptosporidium* indique que l'infection asymptomatique est rare (Girdwood, 1995).

L'excrétion des oocystes se poursuit généralement pendant 2 à 3 semaines, et exceptionnellement sur de plus longues périodes, après cessation des symptômes. Ce phénomène a de nombreuses implications notamment au niveau de la transmission de l'infection par des individus porteurs asymptomatiques (Badenoch, 1990 ; Robertson et Smith, 1992).

Les jeunes enfants (0 à 3 ans) et spécialement ceux souffrant de malnutrition, sont particulièrement sensibles aux infections à *Cryptosporidium* (Mathan *et al.*, 1985 ; Garcia-Rodriguez *et al.*, 1990). Cette observation est sans doute à relier avec une immaturité immunologique et des risques de contamination de type oro-fécal plus importants dans cette tranche d'âge (Ungar, 1990).

* Chez les sujets immunodéprimés, comme les personnes atteintes du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), les enfants hypogammaglobulinémiques ou encore les sujets atteints d'un déficit congénital mixte, les symptômes sont accentués, avec une extension au tractus respiratoire et à la totalité du tractus gastrointestinal incluant le canal et la vésicule biliaires ainsi que le pancréas, et leur durée est généralement allongée. De plus le volume des diarrhées peut atteindre de 3 à 6 L / jour voire 20 L chez certains patients (Current, 1987 ; Badenoch, 1990). Le pronostic est très défavorable avec souvent la mort du patient.

Malheureusement, il apparaît que les personnes atteintes du SIDA, de par leur prédisposition immunologique, sont particulièrement exposées à un risque d'infection par *Cryptosporidium*. Ainsi chez ces patients , la prévalence de la cryptosporidiose est évaluée à 3 à 4% aux USA et à plus de 50% en Afrique et en Haïti (Current, 1988 ; Smith et Rose, 1990).

➦ ***TRAITEMENT*** *:* A l'heure actuelle aucun traitement efficace contre *Cryptosporidium* n'a été développé.

* Chez les patients immunocompétents l'infection généralement "autolimitée", ne nécessite que des traitements visant à prévenir une déshydratation.

* Chez les patients immunodéprimés seuls des traitements symptomatiques sont actuellement proposés comme la réanimation hydro-électrolytique et la nutrition parentérale.

De nombreux traitements thérapeutiques ont été testés mais jusqu'à présent les produits antiprotozoaires, les antihelminthiques, les antimycosiques, les sulfamides et divers antibiotiques n'ont donné que quelques succès épisodiques (Bourée, 1987).

Murdoch *et al.*, 1993, ont signalé par exemple la réussite d'un traitement anti*Cryptosporidium* au létrazuril chez un patient atteint du SIDA.

Un antibiotique tel que la spiramycine par contre testé sur un échantillon de jeunes enfants atteints de cryptosporidiose n'a permis d'obtenir aucun résultat significatif (Rakusan *et al.*, 1989). La paromomycine a par contre permis d'obtenir de bons résultats sur des patients atteints du SIDA (Fichtenbaum *et al.*, 1993).

Récemment l'utilisation de colostrum hyperimmun bovin a permis d'obtenir chez certains patients une amélioration de la diarrhée et une disparition des oocystes fécaux. Ce colostrum contient des Ig G des Ig M et des Ig A spécifiques de *Cryptosporidium.*

○ *Chez l'animal* :

➦ ***CLINIQUE :*** Chez les jeunes veaux, l'infection à *Cryptosporidium* est révélée par des syndromes diarrhéiques importants mais ce phénomène est reconnu comme étant presque exclusivement un problème néonatal (Xiao et Herd, 1994).

Ainsi pour le bétail, l'infection par *Cryptosporidium parvum* chez des animaux d'âge supérieur à 2 mois est considérée comme un phénomène rare (Robertson et Smith, 1992).

➦ ***TRAITEMENT :*** Chez l'animal de nombreux essais thérapeutiques sont actuellement en cours de développement.

Lemeteil *et al.*, 1993, ont ainsi remarqué que la vitamine A ou un agent anti*Cryptosporidium* comme le Sinefungin pourraient avoir une action potentielle sur l'excrétion des parasites chez un modèle de rat, ce qui justifierait des investigations supplémentaires. Watzl *et al.*, 1993, quant à eux, ont démontré l'action bénéfique du colostrum bovin pour le contrôle de la cryptosporidiose chez des souris immunodéprimées souffrant d'une infection rétrovirale. D'autres auteurs avaient déjà d'ailleurs constaté cet effet bénéfique du colostrum bovin (Fayer *et al.*, 1990 ; Perryman *et al.*, 1990).

I.4. - TRANSMISSION, EPIDEMIOLOGIE ET PRESENCE DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'ENVIRONNEMNT :

I.4.1. - Transmission :

La transmission de *Cryptosporidium* se fait grâce à l'ingestion de la forme enkystée : l'oocyste. Ces oocystes sont caractérisés par trois facteurs favorisant particulièrement cette

transmission : leur résistance et leur cinétique d'excrétion importantes ainsi qu'une DMI (Dose minimale infectante) très faible.

➦ ***Résistance*** *:* Les oocystes de *Cryptosporidium* sont capables d'infecter un nouvel hôte immédiatement après leur excrétion dans l'environnement mais peuvent également survivre dans le milieu extérieur pendant des périodes considérables, ainsi les oocystes survivent plusieurs mois dans l'eau (cf § I.5.).

➦ ***Excrétion:*** Un malade atteint de cryptosporidiose excrète dans ses selles de 10^8 à 10^{10} oocystes / jour pendant 12 jours en moyenne avec des extrêmes de 3 à 30 jours. De plus la cinétique d'excrétion chez les animaux est identique à celle décrite chez l'homme (Rose, 1990), ce qui représente un potentiel infectieux très important (Smith, 1990 ; Jeffery, 1991).

➦ ***DMI:*** Si un faible nombre d'oocystes semble capable d'induire la maladie chez l'homme, la DMI n'est cependant pas connue avec précision (Rose, 1990).

➤ *Chez l'homme* : Très peu de données sont actuellement recensées quant à l'étude de la dose minimale infectieuse pour *Cryptosporidium* chez l'homme. Une étude réalisée par Dupont, 1990, a permis de montrer que sur 21 volontaires contaminés massivement avec *Cryptosporidium*, 15 ont excrété des oocystes et 6 d'entre eux ont présentés les symptômes classiques de la maladie. D'autre part dans un groupe de 8 volontaires contaminés à raison de 10^2 oocystes viables, 3 ont présenté des signes d'infection par *Cryptosporidium.*.

➤ *Chez l'Animal*: : De nombreuses expériences ont récemment été réalisées sur des animaux révélant une moyenne de 10 oocystes nécessaires à la contamination chez des primates (Miller *et al.*, 1990) et des valeurs encore plus faibles allant jusqu'à 1 oocyste pour infecter des souris immunodéprimées (Kwa *et al.*, 1993) ou des agneaux (Blewett *et al.*, 1993).

Cette faible DMI est quelque peu controversée par Finch *et al.*, 1993(a), qui ont eux déterminé une dose infectante à 50 % estimée à 79 oocystes sur un modèle de souriceaux nouveaux nés CD-1 différent du modèle de Kwa *et al.*

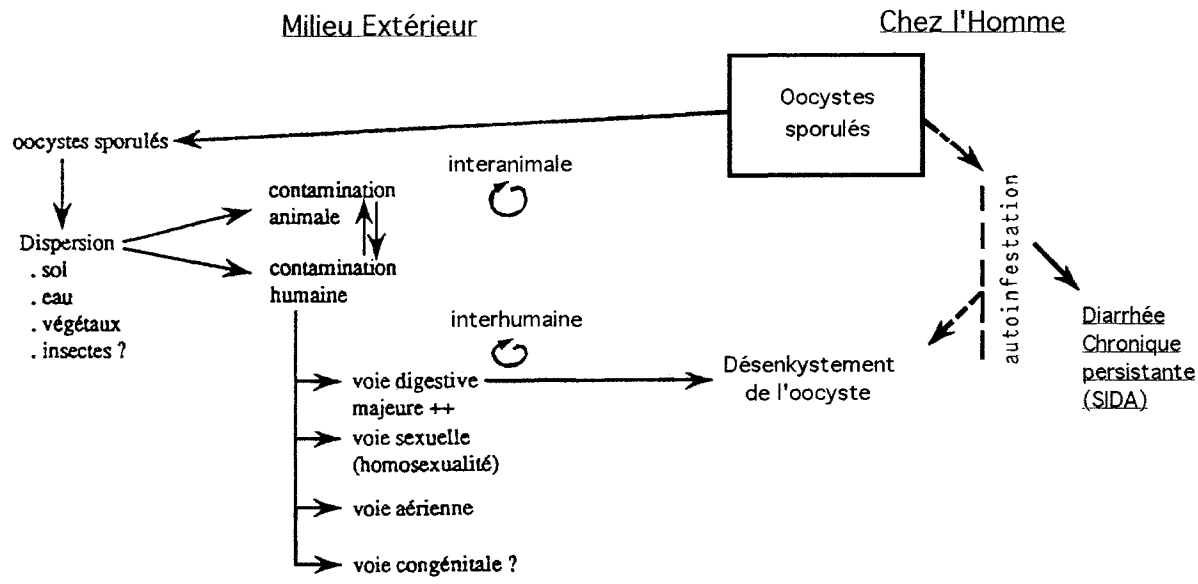
Rasmussen et Healey, 1992, ont montré que le background génétique de la souris infectée par *Cryptosporidium* pourrait jouer un rôle dans la détermination de la susceptibilité à contracter une cryptosporidiose et ceci pourrait peut-être servir d'hypothèse pour expliquer entre-autre les différences observées entre les DMI pour les deux types de souris inoculées.

Deux grandes voies de transmission sont définies : (Figure N°4)

- La transmission directe : Personne ➟ personne ou animal ➟ personne

- La transmission indirecte : {eau, sol, végétaux} ➟ personne

Figure 4 : Transmission de *Cryptosporidium* (Bonnin et Camerlynck, 1989)



○ *Transmission directe* :

La transmission directe orofécale est initialement la voie principale de propagation de la maladie (excrétion des oocystes dans les fèces animaux et humains et ensuite ingestion).

➳ Une transmission directe animal-personne a été constatée notamment chez les agriculteurs ou au cours de travaux vétérinaires en contact avec le bétail : une hygiène personnelle importante est donc préconisée (Casemore, 1990). Ainsi selon Lengerich *et al.*, 1993, les employés d'industrie laitière sont soumis à un risque de contracter *Cryptosporidium* 1.9 fois plus important que pour des personnes non exposées à des contacts avec le bétail.

En revanche les animaux domestiques (chats, chiens, ...) ne représentent pas une source importante d'infection pour l'homme. De plus aucune infection croisée n'a été mise en évidence entre poisson, reptile et mammifère, ceci témoignant de la spécificité d'hôte de chaque espèce (Badenoch, 1990).

➳ La transmission directe de personne à personne est une voie également importante de propagation de la maladie et ceci surtout au sein des familles, de groupes de jeux, de nurseries et d'hôpitaux où des précautions d'hygiène particulières doivent être prises.

○ *Transmission indirecte* :

La transmission indirecte du parasite se fait par le biais d'eaux mais également de sols et de végétaux contaminés.

➵ ***L'eau*** : Il est maintenant certain que la maladie peut être contractée par le biais d'eaux contaminées, mais l'importance réelle de ce mode de contamination n'est pas encore connue avec précision.

La contamination de cet écosystème va s'effectuer via les décharges publiques, les effluents industriels et domestiques et le ruissellement sur des sols contaminés (Isaac-Renton *et al.*, 1987 ; Le Chevalier *et al.*, 1990).

Ainsi la contamination des eaux peut être observée après des chutes de pluies importantes qui entraînent un lessivage des oocystes vers les eaux de surface (Casemore, 1990). Ce phénomène est souvent constaté après des périodes de sécheresse exceptionnelle (Barer et Wright, 1990). Par conséquent, le climat et les saisons semblent favoriser la transmission de *Cryptosporidium* (Fripp *et al.*, 1991 ; Newman *et al.*, 1993(a)).

Une tendance saisonnière de manifestations à *Cryptosporidium* a ainsi été mise en évidence dans différents pays :

- au cours de la saison des pluies en Amérique Centrale ;
- en été en Australie ;
- à la fin de l'été en Amérique du Nord ;
- au printemps et à la fin de l'automne au Royaume Uni.

L'observation de ces pics pourrait être mise en relation avec une augmentation des chutes de pluies seules ou avec des événements particuliers survenus dans les élevages (pics des naissances au printemps et en automne par exemple) (Casemore, 1990).

Les nombreuses épidémies d'origine hydrique rapportées ces dernières années, permettent de mettre en évidence l'importance de presque tous les types d'eaux dans la transmission de *Cryptosporidium* (cf § I.4.2.).

Ainsi, les eaux de baignades comme les eaux de boissons participent d'une façon importante dans la transmission du parasite.

L'eau de surface utilisée en irrigation comme la réutilisation d'eaux usées ou de boues de station en agriculture participe également à la dissémination du parasite.En effet, dans des régions à ressource en eau limitée, la réutilisation d'eaux usées à des fins agricoles peut présenter des risques : en Arizona et en Floride, la réutilisation des eaux usées traitées représente 10^6 m^3 par jour, or malgré un traitement secondaire de 10^2 à 10^3 oocystes / L sont encore retrouvés dans les eaux. (Rose et Gerba, 1991).

➵ ***Sols et Végétaux*** : Les sols et les végétaux peuvent représenter des facteurs sporadiques de transmission de la maladie.

En effet les sols peuvent être exposés à une contamination par *Cryptosporidium* lors de l'utilisation de terrain comme pâturage mais également lors d'épandage de lisiers ou de boues de station sur des terrains agricoles. Ces sols constituent donc dans ces conditions un réservoir de germes susceptibles de participer à la transmission du parasite à travers les cultures et les récoltes.

Les végétaux sont plus directement impliqués dans la transmission de *Cryptosporidium*, notamment lors de leur consommation à l'état cru. Ces végétaux constituent des intermédiaires de la transmission étant eux même contaminés par le biais de l'eau d'irrigation ou des sols.

I.4.2. - Epidémiologie :

D'une façon générale, depuis les années 80, un nombre croissant d'épidémies de cryptosporidiose a été recensé. Ainsi il a été rapporté que *Cryptosporidium* constituait la 4ème cause de diarrhées confirmées en laboratoire après *Campylobacter*, *Salmonella* et rotavirus (Barer et Wright, 1990), avec respectivement 13 et 8 % du nombre total de cas diagnostiqués par examen coprologique en Ecosse et en Angleterre en 1989 (Badenoch, 1990) et avec 5000 cas rapportés en Angleterre et au Pays de Galles en 1990 (Joseph *et al.*, 1991).

Par ailleurs une vaste étude multicentrique réalisée auprès de laboratoires anglais sur des patients souffrant de diarrhées infectieuses importantes, a montré que l'infection par *Cryptosporidium* est retrouvée avec la même fréquence que les infections à *Salmonella* et avec une fréquence 3 fois supérieure à celle des infections à *Shigella* (Public Health Laboratory Service study group, 1990).

L'épidémiologie concernant la cryptosporidiose reflète bien la diversité des modes de transmission vus précédemment (cf § I.4.1.).

Ainsi le relevé des épidémies peut être subdivisé selon le mode de contamination observé : soit une transmission orofécale animal-personne ou personne-personne, soit une transmission par le biais de consommation d'aliments contaminés ou encore et ceci dans la majorité des épidémies recensées une contamination d'origine hydrique.

○ *Epidémies d'origine hydrique* :

Les épidémies d'origine hydrique représentent la majorité des épisodes de cryptosporidioses massives rapportés ces dernières années. Elles sont recensées dans le tableau N° 1.

Tableau N°1 : Principales épidémies de cryptosporidiose d'origine hydrique relevées au cours des dernières années.

ANNEE	NOMBRE DE CAS	LIEU	COMMENTAIRES	REFERENCES
1984	47	Braunstation Texas USA	Contamination probable de puits artésien par des eaux d'égout. Absence d'oocystes dans l'eau potable	D'Antonio *et al.*, 1985
1987	13000	Carollton Georgia USA	Faute de procédure dans la filière de traitement d'eau potable au niveau de la floculation Remise en marche des filtres sans contre-lavage préalable. Oocystes détectés dans l'eau potable.	Hayes *et al.*,1989
1988	67	Yorkshire UK	Contamination de l'eau d'alimentation d'un complexe aquatique par des égouts. Oocystes retrouvés dans l'eau de piscine (50 oocystes /L)	Joce *et al.*, 1991
1988	27	Ayrshire UK	Infiltration d'eau contaminée dans un réservoir contenant l'eau de distribution traitée. Oocystes détectés dans l'eau traitée	Smith *et al.*, 1988 et 1989(a)
1989	516	Swindom Oxfordshire UK	Traitement inefficace de l'eau de lavage des filtres à sable. Lessivage des pâturages lors des pluies. Oocystes isolés dans l'eau de lavage et l'eau traitée	Richardson *et al.*, 1991
1989	442	Scotland UK	Contamination de l'eau de boisson par de l'eau de rivière. Oocystes isolés dans l'eau brute et l'eau traitée.	Barer et Wright, 1990
1991	77	Adelaide AUSTRALIE	Epidémie supposée d'origine hydrique affectant essentiellement des enfants.	Van Leenwen *et al.*, 1991
1991	551	Pensylvanie USA	Contamination d'un puits alimentant une aire de pique nique. Déficience dans le système de traitement.	Moore *et al.*, 1994
1992	3000	Oregon USA	Contamination de puits d'eau de source dans une communauté.	Moore *et al.*, 1994
1992	500	Oregon USA	Contamination d'une piscine à vague dans un parc.	Moore *et al.*, 1994
1992	26	Idaho USA	Contamination d'eau récréationnelle (toboggan aquatique) dans un parc.	Moore *et al.*, 1994
1993	85	Dane County Wisconsin USA	Association entre l'épidémie et la fréquentation de plusieurs piscines.	US Department of Health and Human Services, 1994
1993	403000	Milwaukee USA	Recyclage des eaux de lavage des filtres.	Mac Kenzie *et al.*, 1994

Les protozoaires sont les agents étiologiques les plus fréquemment impliqués dans les épidémies d'origine hydrique aux USA. Entre 1978 et 1991, *Giardia* était le pathogène le plus communément impliqué, mais en 1992 le même nombre d'épidémies de Giardiase et de cryptosporidiose a été rapporté.(Moore *et al.*, 1994).

Il faut remarquer que le traitement de l'eau est traditionnellement basé sur le contrôle des infections bactériennes et l'émergence des parasites comme agents pathogènes résistants aux traitements de l'eau a ouvert un nouveau chapitre dans l'étude épidémiologique des maladies à transmission hydrique (Casemore, 1995).

Ainsi il faut bien noter que les épidémies dues à *Cryptosporidium*, ont jusqu'ici été certainement sous-estimées et le développement d'analyses de routine pour la recherche de *Cryptosporidium* en laboratoire permettra peut-être (comme cela a été le cas pour les épidémies relevées en 1992 et 1993 aux USA) de réévaluer la responsabilité de *Cryptosporidium* dans les épidémies constatées.(Hugues , 1993).

De plus il semblerait, d'après Casemore, 1995, que le nombre de cas détectés pour chaque épidémie ne refléterait que la "partie émergée de l'iceberg". En effet certaines estimations laisseraient suggérer que chaque cas détecté représenterait 9 à 99 ou plus de cas non détectés.

Deux grandes catégories d'épidémies d'origine hydrique peuvent être différenciées :
- les épidémies reliées à la consommation d'eau de boisson contaminée ;
- les épidémies reliées à des eaux récréationnelles : complexe aquatique, piscine, ...

➳ ***Epidémies reliées à la consommation d'eau contaminée*** :

L'apparition des épidémies ne semble pas seulement corrélée à des problèmes rencontrés dans le système de traitement lui-même mais plutôt dans la plupart des cas à la présence d'une très grande quantité de *Cryptosporidium* dans l'eau d'alimentation du système dont les performances n'ont pas permis de gérer la décontamination complète.

La première épidémie importante (13000 cas) a été relatée en 1987, à Carrolton en Géorgie. Cette épidémie laisse suggérer que l'arrêt d'un filtre et sa remise en service sans contre - lavage ont contribué à l'augmentation de la concentration en oocystes dans l'eau traitée. Cette constatation révèle une certaine inadéquation des traitements conventionnels pour la décontamination d'eaux très fortement contaminées (Richardson *et al.*, 1991) comme ce fut également le cas lors de l'épidémie de 1989 en Angleterre où 516 personnes ont été contaminées..

Dans le cas de cette épidémie survenue à Swindom et Oxfordshire, aucune erreur de procédure n'a été détectée dans le système de traitement des eaux, pourtant 34 % des échantillons prélevés de février à mars ont démontré la présence de *Cryptosporidium* dans l'eau de distribution à des concentrations variant de 0.002 à 24 oocystes/l. De très grandes quantités d'oocystes (plus de 10^4 / l) ont également été détectées dans l'eau de lavage des filtres.

Les résultats de l'étude réalisée sur cette épidémie ont montré l'existence d'un risque non négligeable de contamination par *Cryptosporidium* lors d'approvisionnement en eau traitée par

les systèmes actuels de potabilisation , et il s'avère que la mise au point de systèmes de traitement plus adéquats doit faire l'objet de travaux de recherche et de développement importants afin de prévenir d'autres épidémies de ce type (Richardson *et al.*, 1991).

Dans le cas de l'épidémie particulièrement importante de Milwaukee en avril 1993, aucune faute grave dans le système de traitement n'a non plus été décelée, si ce n'est un problème de mise en service du moniteur permettant de moduler la teneur de coagulant suivant la turbidité de l'eau d'alimentation.

Le recyclage des eaux de lavage des filtres à sable a également été employé dans le système de traitement, ce qui est peut-être à l'origine d'une probabilité de passage des oocystes au travers des filtres plus importante. (Mac Kenzie *et al.*, 1994).

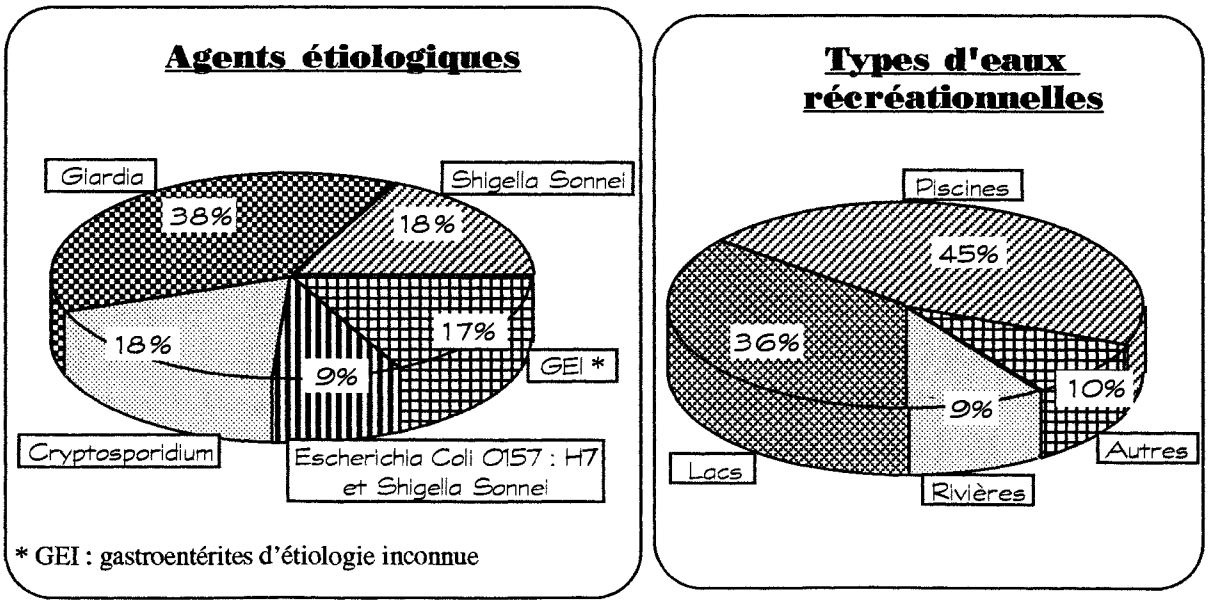
Il faut noter que l'augmentation ces dernières années du nombre d'épidémies de cryptosporidiose d'origine hydrique ne représente pas une réelle explosion du phénomène mais correspond plutôt aux capacités des laboratoires à diagnostiquer de nouvelles "maladies" et également à un meilleur suivi dans l'enregistrement des épidémies (Hunter , 1994).

➢ ***Epidémies reliées aux eaux récréationnelles :***

Les eaux de baignades ont été dénoncées dans plusieurs cas comme vecteur de la maladie (Tableau N°1).

Aux Etats Unis, il a été rapporté que *Cryptosporidium* était responsable de 18% des épidémies de gastroentérites associées aux eaux de baignades en 1991 et 1992 (Figure N°5).

Figure N°5 : Agents étiologiques responsables d'épidémies de gastroentérites associées à l'utilisation d'eaux récréationnelles (Moore *et al.*, 1994)



Il faut également remarquer que les eaux de piscines sont mise en cause dans 45 % des cas, ce qui confirme bien que l'utilisation de chlore comme agent désinfectant ne permet pas de protéger contre tous les types d'infection, et notamment la cryptosporidiose.

La dernière épidémie de cryptosporidiose mettant en cause une eau récréationnelle, a eu lieu en août 1993, quelques mois après la vaste épidémie de Milwaukee, à Dane County dans le Wisconsin. 85 personnes ont présenté une analyse coprologique positive pour *Cryptosporidium*. Aucune corrélation n'a été rapportée entre l'apparition des cas de cryptosporidiose et l'alimentation en eau potable ou l'épidémie de Milwaukee (situé à 80 miles à l'est de Dane County).

Par contre une association entre l'épidémie et la fréquentation de plusieurs piscines a été rapportée (US Department of health and human services, 1994).

Il apparaît ici que l'épidémie de Milwaukee en avril 1993, a stimulé la recherche de *Cryptosporidium* comme agent pathogène à Dane County, favorisant ainsi l'enregistrement de cette épidémie.

○ *Epidémies relevant d'autres facteurs de transmission* :

➳ *Ingestion d'aliments contaminés :* Un exemple d'épidémie de cryptosporidiose, mettant en cause l'ingestion d'aliments contaminés, a été rapporté en octobre 1993 dans le Maine (USA) où 390 personnes ont été contaminées (Millard *et al.*, 1994).

L'origine de cette épidémie s'est révèlée être la consommation de cidre fermier fraîchement pressé lors de la visite d'un groupe d'écoliers dans une ferme. Cette étude confirme la potentialité de larges épidémies de cryptosporidiose d'origine alimentaire.

➳ *Transmission orofécale de personne à personne :* En 1989, une épidémie de cryptosporidiose a été rapportée dans une crèche en Géorgie touchant 42 personnes dont 39 enfants. L'origine de l'épidémie était dans ce cas une transmission orofécale du parasite relatée dans de nombreux cas dans ce type d'institution regroupant de jeunes enfants (Tangermann *et al.*, 1991).

Une autre épidémie a été rapportée en 1992 en Oregon mettant à première vue en cause une piscine à vague. Mais il faut noter que lors de cette épidémie la grande majorité des cas rapportés de cryptosporidiose, a été mise en relation avec une contamination par transmission de personne à personne du parasite et non directement par le biais de l'eau de baignade (McAnulty *et al.*, 1994). Cette étude témoigne de la difficulté d'isoler distinctement le mode de transmission face à la présence importante de *Cryptosporidium* dans le milieu hydrique.

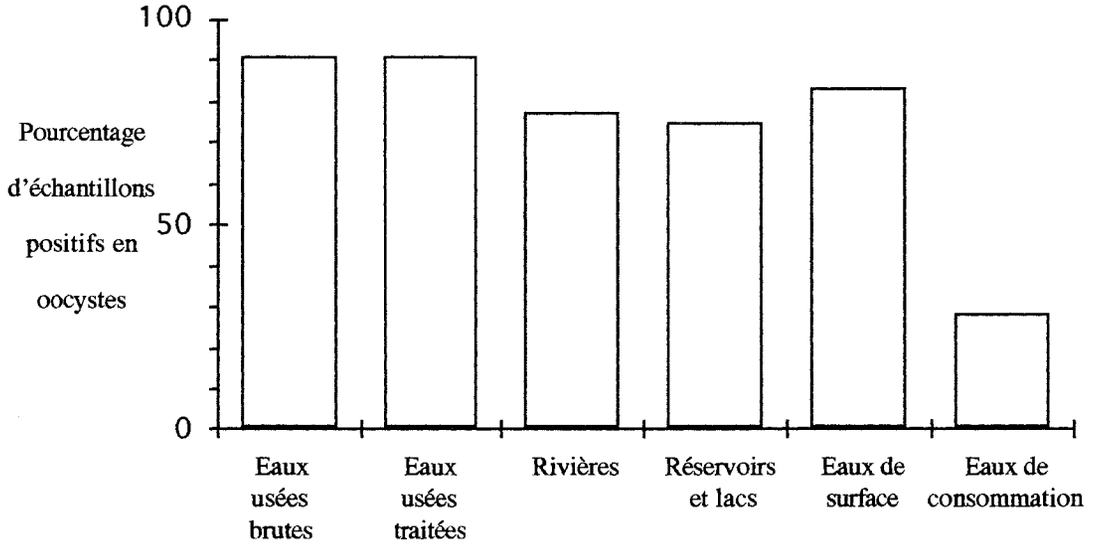
I.4.3. - Présence de Cryptosporidium dans l'environnement :

○ *Répartition des oocystes dans l'environnement* :

Des études réalisées aux Etats Unis et en Grande Bretagne ont révélé récemment la présence de *Cryptosporidium* dans tous les types d'eaux : eaux usées, eaux de surface, eaux de consommation, lacs et réservoirs.

La figure N°6 regroupe les résultats d'une étude réalisée en 1988 dans l'ouest des Etats Unis reflétant la fréquence de détection de *Cryptosporidium* dans les différents types d'eaux analysés.

Figure N°6 : Pourcentage d'isolements positifs de *Cryptosporidium* dans différents types d'eaux (Rose, 1990).



Il a ainsi été montré que dans cette région des Etats Unis 91% des échantillons d'eaux usées analysés contenaient des oocystes de *Cryptosporidium* et que respectivement 77 et 75% des rivières et lacs étaient également contaminés à des niveaux variables.

Un rapport présenté à l'EPA a révélé également la présence de *Cryptosporidium* non seulement dans 90% des eaux non traitées mais également dans 30% des eaux traitées aux Etats Unis (Edwards, 1993).

Si la présence de *Cryptosporidium* a été mise en évidence au cours de nombreuses études dans les pays industrialisés comme aux Etats Unis ou en Europe, très peu de données sont rapportées dans les pays en voie de développement. Ces pays sont pourtant soumis à de forte probabilité de contamination du fait de la conjonction de plusieurs facteurs comme le faible

niveau d'hygiène, le mauvais état sanitaire de la population et l'absence de contrôle de la qualité des eaux de boisson.

Il apparaît que Cryptosporidium serait responsable de 2% des cas de diarrhées sévères dans les pays développés et 6% dans les pays en voie de développement (Anonyme, 1996).

Ainsi la répartition géographique de la contamination de l'environnement par *Cryptosporidium* n'est pas connue avec précision. De plus l'absence de technique performante pour la détection de *Cryptosporidium* mais également l'absence de législations bien définies dans ce domaine n'ont pas permis d'établir une surveillance assez développée pour obtenir des données internationales plus complètes.

Il n'en demeure pas moins que la séroprévalence élevée mise en évidence dans certaines régions par Current et Garcia en 1991, témoigne de la présence très ubiquitaire de ce parasite dans l'environnement. En effet une séroprévalence de 25 à 35% en Europe et en Amérique du Nord a été rapportée, ce qui suggère que l'infection par *Cryptosporidium* est commune dans les pays industrialisés. (Current et Garcia, 1991).

A titre indicatif, les résultats de quelques études, réalisées sur le niveau de contamination des eaux de surfaces par *Cryptosporidium* dans des pays différents des Etats Unis ou de l'Angleterre, sont regroupés dans le tableau N°2.

Tableau N°2 : Niveau de contamination par *Cryptosporidium* dans les eaux de surface de différents pays (à l'exclusion des Etats Unis ou de l'Angleterre) (Carrington et Smith, 1995).

Pays	Nombre de sites	Nombre d'échantillons positifs / nombre total	Concentration (oocystes / L)	Références
Canada (Nord)	2	2 / 52	0.2 - 0.50	Roach *et al.*, 1993
Pays - Bas	1	6 / 52	0.002 - 0.018	Ketelaars *et al.*, 1994
Australie	14	53 / 114	0.1 - 14.3	Hutton *et al.*, 1995
Israël	2	11 / 16	0.006 - 0.52	Armon at al, 1995

○ *Quantité d'oocystes retrouvée dans l'environnement* :

Il apparaît d'après une étude de Rose *et al.*, effectuée aux USA en 1991, que *Cryptosporidium* est détecté plus souvent que *Giardia* dans tous les types d'eaux et que les concentrations en oocystes sont en moyenne de 1 log supérieures à celles en kystes de *Giardia*.

De vastes études menées notamment aux Etats Unis et en Angleterre ont permis d'évaluer le niveau de contamination des eaux par *Cryptosporidium* (Tableau N°3).

Tableau N°3 : Niveau de contamination de différents types d'eaux par *Cryptosporidium* (Smith et Rose, 1990).

Types d'eaux	Nombre d'échantillon	Oocystes / L	Pays
Eaux usées :			
- eaux brutes	15	4 - 5180	Etats Unis
- effluent boue activée	25	4 - 1297	Etats Unis
- bassin de stabilisation	9	3.3 - 8.51	Royaume Uni
	22	10^3 - 2.10^4	Afrique de l'Est
Eaux de surface :			
- recevant des eaux usées	150	0.58 - 1.2	Etats Unis
ou agricoles	42	0.006 - 2.5	Royaume Uni
-sans apport d'eaux	20	0.02 - 0.08	Etats Unis
Eaux potables :			
- non associées à une	36	0.04 - 0.26	Etats Unis
épidémie	65	0.006 - 0.26	Royaume Uni
- associées à une épidémie	20	0.46 - 2.2	Etats Unis
	7	0.04 - 4.8	Royaume Uni
Eaux de loisirs :	28	0.66 - 500	Royaume Uni

Les données rapportées dans le tableau N°3 montrent la présence de concentrations en oocystes particulièrement importantes dans les eaux usées (jusqu'à 5180 oocystes / L en eaux usées brutes) ou encore les eaux de loisirs (jusqu'à 500 oocystes / L). L'explication de ce phénomène réside dans l'exposition particulièrement marquée de ces types d'eaux à des contaminations fécales qui constituent le véhicule principal de la transmission du parasite.

Dans les eaux potables et les eaux de rivière par contre le niveau de contamination par *Cryptosporidium* est assez faible avec des maximum atteignant respectivement 0.26 et 2.5 oocystes / L. Il faut par contre reconnaître que même si le nombre d'oocystes présents est généralement assez faible, ce background peut être fortement exacerbé lors d'épidémies ou de pollutions accidentelles des sources d'alimentation en eaux par exemple lors de chutes de pluies intensives provoquant un lessivage des pâturages ou des terres agricoles traitées par épandages de lisier. Ainsi 3 études de surveillance réalisées sur des eaux de surface aux Etats Unis ont permis de mettre en évidence l'incidence importante de rejets agricoles sur le niveau de contamination d'eaux de surfaces : les concentrations en oocystes étaient de 1.5 à 1.9 fois plus importantes dans des eaux de surface polluées par des rejets agricoles que dans des eaux polluées par des effluents d'égouts de communauté humaine (Smith, 1992).

Une variation saisonnière dans la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau a également été montrée et celle ci peut être mise en relation avec l'apparition des infections à *Cryptosporidium* (Rose *et al.*, 1991). Ainsi dans 57 % des études, le pic saisonnier a été

retrouvé en été et en automne, et une seule étude a signalé un pic en hiver.

Les études les plus précises sur la présence des oocystes dans les eaux de surface et les eaux potables ont été menées aux Etats Unis et en Europe (Tableaux N°4).

Tableau N°4 : Résultats obtenus lors d'études de surveillance du niveau de contamination des eaux par *Cryptosporidium* aux Etats Unis et en Europe.

	Sites	Nombre d'échantillons	Pourcentage d'échantillons positifs	Concentration (oocystes /L)	Moyenne des résultats positifs (oocystes /L)	Références
USA	Arizona : rivière	32	44		44	Rose *et al.*, 1991
	lac	22	41		1.7	
	Arkansas : source	2	100		0.08	
	Californie : rivière	14	43		0.04	
	lac	7	100		0.06	
	Colorado : rivière	2	100		2.8	
	Connecticut : rivière	9	22		0.04	
	lac	4	50		<0.01	
	Floride : rivière	3	67		0.05	
	Georgie : rivière	2	0		<0.01	
	Hawai : source	1	100		0.0025	
	Montana : lac	1	100		0.03	
	Michigan : rivière	1	0		<0.01	
	Missouri : rivière	3	67		0.08	
	New York : rivière	5	20		0.02	
	lac	6	33		0.01	
	source	3	0		<0.0025	
	Oregon : rivière	7	57		0.03	
	lac	1	0		<0.01	
	source	1	100		0.13	
	Pennsylvanie : lac	2	0		<0.01	
	Texas : rivière	1	100		0.2	
	lac	4	100		0.92	
	Utah : rivière	29	79		13	
	lac	23	70		3.8	
	Washington : rivière	3	0		<0.01	
USA	Virgin Islands : Citernes.	46	48	<0.01- 0.70	0.024	Crabtree et al, 1996
UK	Rivière A : site A1	183	4.9	0.07-2.5	0.91	Miller et Carrington, 1992
	site A2	192	4.2	0.10-4	0.99	
	Rivière B : site B3	171	53	0.04-2	0.30	
	site B4	160	56	0.06-1.59	0.41	
	site B5	180	57	0.06-2.48	0.4	
	site B6	180	44	0.06-3	0.4	
	Rivière C : site C7	108	0.9	0.12	0.12	
	site C8	106	6.6	0.07-0.73	0.38	
	site C9	110	4.5	0.1-0.81	0.41	
	site C10	106	5.7	0.1-2.75	1.09	
	Forage D : site D11	44	0	0.07-2.75	0.5	
	site D12	42	0	-	-	
	site D13	34	0	-	-	
	Forage E : site E14	46	6.5	-	-	
	site E15	48	4.1	0.004-0.026	0.01	
	site E16	44	6.8	0.007-0.922	0.47	
				0.009-0.390	0.2	
Europe	Rivière Meuse	52	11.5	0.002-0.018	0.001	Ketelaars et al, 1994

➢ *Aux Etats Unis*, dans une étude réalisée par Rose *et al.*, 1991,où 257 échantillons ont été analysés, en provenance de 17 états, les oocystes ont été détectés dans 55% des eaux de surface analysées à une concentration moyenne de 43 oocystes / 100 L. La présence fréquente à des taux non négligeables de ces oocystes dans une eau utilisée pour l'approvisionnement des stations d'eaux potables, laisse apparaître un risque important de transmission de l'infection.

Ainsi parmi 36 échantillons d'eaux potables analysés, 17% ont révélé la présence de *Cryptosporidium* à des taux variant de 0.5 à 1.7 oocystes / 100 L.

La présence de *Cryptosporidium* dans des citernes de récupération d'eaux de pluie a également été rapportée (Crabtree *et al.*, 1996). Cette étude, focalisée sur l'évaluation du risque encouru lors de l'utilisation de ces citernes comme source d'eaux potables notamment dans certaines villes de Virgin Island aux Etats Unis (80 % des résidents en possédant une), a démontré que 50 % des 46 échantillons testés provenant d'eaux de citernes se sont révélés positifs pour la présence de *Cryptosporidium* à des concentrations moyennes de 2.4 oocystes / 100 L. Les auteurs ont donc suggéré , face au pourcentage élevé de citernes contaminées, de mettre en oeuvre une surveillance renforcée auprès de ces populations particulièrement exposées.

➢ *En Angleterre*, une étude similaire a été menée de janvier 1990 à mars 1991 par le National *Cryptosporidium* Survey Group sur 3 rivières et 6 points de forage.

Au total 1754 échantillons ont été analysés qui ont révélé la présence de *Cryptosporidium* à des concentrations variant de 0 à 4 oocystes / L (Miller et Carrington, 1992), le pourcentage d'échantillons positifs variant de 4 à 50 % pour les eaux de surface selon le point de prélèvement.

Une étude européenne conduite par Ketelaars *et al.*, 1994, a permis de montrer que la fréquence d'isolement et la concentration en oocystes en eaux de rivière (Moselle) était plus faible aux Pays Bas qu'aux Etats Unis avec seulement 11.5% d'échantillons positifs et des concentrations variant de 0.002 à 0.018 oocystes / L. Mais il faut préciser que les divergences entre les résultats obtenus aux Etats Unis et en Europe peuvent s'expliquer par des différences importantes dans les performances des techniques de détection utilisées. Ainsi l'étude de Ketelaars *et al.* était caractérisée par un rendement de détection assez faible avec seulement 0.09 à 1.7 % de récupération des oocystes contre 29 à 58 % pour l'étude de Rose *et al.*, 1991.

Globalement il apparaît que la présence de *Cryptosporidium* dans tous les types d'eaux et notamment dans les eaux de surface et les eaux potables, laisse présager la possibilité d'un risque pour la santé publique.

Mais il faut préciser, afin de mieux évaluer ce risque, qu'il est nécessaire, comme beaucoup d'auteurs l'ont signalé, de développer des investigations quant à la viabilité des

oocystes détectés dans l'eau mais également quant à leur origine, sachant que toutes les espèces ne sont pas pathogènes pour l'homme.

Malheureusement le faible nombre d'oocystes habituellement détectés ne permet pas à l'heure actuelle d'accéder à la détermination de leur viabilité.

I.5. - SENSIBILITE A DIFFERENTS TRAITEMENTS PHYSICO-CHIMIQUES:

Les organismes de la classe des coccidies sont généralement reconnus pour leur nature très résistante. Les oocystes de *Cryptosporidium* font partie de ceux ci et sont particulièrement doués d'une résistance importante vis-à-vis de nombreux stress environnementaux létaux pour la plupart des autres espèces d'agents infectieux.

Dans ce chapitre la résistance des oocystes de *Cryptosporidium* à différents facteurs physico-chimiques, est présentée.

I.5.1. - Dessication et température :

➦ **Dessication :** Robertson *et al.*, en 1992, ont montré que la dessication était un facteur de létalité pour *Cryptosporidium.*

➦ **Température :** La sensibilité de *Cryptosporidium* a été testée pour toutes les gammes de température, allant de la congélation à l'exposition à la chaleur.

➦ ***Congélation :*** Des résultats assez divergents ont été obtenus pour la congélation.

➤ Dans certains cas, la congélation a permis une inactivation complète de *Cryptosporidium* : ainsi Tzipori, en 1983, a été l'un des premiers à avoir remarqué l'inactivation de *Cryptosporidium* par congélation, puis Fayer et Leek, en 1984, ont montré qu'une exposition à une température de -20 °C pouvait provoquer le dékystement des oocystes avec comme conséquence la mort rapide des sporozoïtes relargués en l'absence de cellules à envahir.

Goodwin et Brown, 1994, ont quant à eux signalé qu'une corrélation existait entre le nombre de jours de gelée et la diminution de la fréquence du diagnostic de cryptosporidiose respiratoire chez des poulets.

➤ Une inactivation incomplète de *Cryptosporidium* par la congélation a par contre été mise en évidence par d'autres auteurs. Ainsi Rossi *et al.*, 1990, ont décrit une technique de cryoconservation d'oocystes dans du diméthyl sulfoxide à 10%. Robertson *et al.*, 1992, après avoir montré qu'une légère proportion d'oocystes était capable de survivre jusqu'à 775 h à -22 °C, ont donc suggéré qu'il était imprudent de considérer que les oocystes étaient incapables

d'infection après congélation. Nichols et Thom, 1985, ont ainsi décrit des infections à *Cryptosporidium* résultant de l'ingestion accidentelle de tripes congelées contaminées.

➵ ***Température ambiante :*** Dans le milieu extérieur, il a été montré que les oocystes de *Cryptosporidium* perdaient leur pouvoir infectieux en deux semaines à des températures de 15 à 20 °C (Bonnin et Camerlynck, 1989). En revanche à des températures positives inférieures, des survies de plusieurs mois sont décrites dans l'eau (Barer et Wright, 1990).

➵ ***Températures supérieures à 20°C et chauffage :*** Pour des températures comprises entre 20 et 37 °C le dékystement des oocystes est observé à des taux variant de 5 à 30 % (Fayer et Leek, 1984). De plus, Anderson en 1985 a montré qu'un chauffage à 45°C pendant 20 minutes entraînait la perte du pouvoir infectieux des oocystes et Fayer en 1994 qu'une exposition à 64.2 °C pendant 2 minutes suffisait pour provoquer l'inactivation d'une suspension aqueuse de *Cryptosporidium*.

I.5.2. - Radiations U.V. :

Plusieurs études montrent que les radiations U.V., pour certaines doses et durées d'exposition, sont capables d'inactiver les oocystes de *Cryptosporidium* .

Ainsi il apparaît que les doses nécessaires pour inactiver de 90 à 99 % des oocystes sont très élevées et nécessitent des expositions respectives à 80 $mW.s.cm^{-2}$ et 120$mW.s.cm^{-2}$ (Ransome *et al.*, 1993) ; à titre indicatif, les doses utilisées classiquement dans le traitement des eaux sont environ de 30 $mW.s.cm^{-2}$.

Lorenzo-Lorenzo *et al.*, en 1993, ont décrit une inactivation des oocystes après une période d'exposition aux U.V. prolongée (150 min) pour des doses de 15 000 mW / sec , mais lors de cette étude la surface spécifique d'application des U.V. n'a pas été précisée. Il faut donc souligner que l'interprétation voire la comparaison des résultats est toujours délicate car les modes d'expression des doses d'U.V. appliquées varient selon les études.

I.5.3. - Composés chimiques :

L'efficacité de deux grands types de désinfectants a été analysée : Les désinfectants classiques utilisés pour les mesures d'hygiène générales et les désinfectants spécifiquement utilisés dans les systèmes de traitement des eaux comme l'ozone ou le chlore et ses dérivés.

➵ *Désinfectants utilisés pour les mesures d'hygiène classiques :*

Le comportement de *Cryptosporidium* a été testé vis-à-vis de nombreux agents désinfectants habituellement actifs sur la plupart des agents pathogènes. Il apparaît que *Cryptosporidium* est résistant à la plupart de ces désinfectants (Tableau N°5).

Tableau N°5 : Résistance de *Cryptosporidium* vis-à-vis de différents agents désinfectants.

Agents désinfectants	Condition d'expérimentation (concentration, température, temps d'exposition)	Comportement des oocystes	Références
Hypochlorite de sodium	3 %, 4°C, 18 h	Résistant	Rose, 1990
	5.25%, 21°C, 120 min	Résistant.	Fayer, 1995
	2 et 5%	Résistant	Campbell *et al.*, 1982
Hydroxyde de sodium	0.02 M, 4°C, 18 h	Résistant	Rose, 1990
	0.02%	Résistant	Campbell *et al.*, 1982
Peroxyde d'hydrogène	10 volumes, 30 min, 22°C	Inactivé	Blewett, 1988
Acide crésylique	3%	Résistant	Campbell *et al.*, 1982
Formaldéhyde	10%, 18 h	Inactivé	
Chlorure de benzalkonium	5%	Résistant	
Iodophore	1 et 4%	Résistant	
Ammoniaque	5 et 10%, 18h	Inactivé	

Il apparaît ainsi qu'un agent désinfectant aussi puissant que l'hypochlorite de sodium ne permet pas, même pour des concentrations de 5.25% et pour une période d'exposition prolongée, l'inactivation de *Cryptosporidium*.

De plus parmi les 7 agents désinfectants testés par Campbell *et al.*, 1982, et recommandés par le ministère de l'agriculture anglais pour leur utilisation en laboratoire vétérinaire, seuls le formaldéhyde à 10% et l'ammoniaque à 5 et 10% se révèlent effectifs pour l'inactivation de *Cryptosporidium* après 18 heures d'exposition.

Selon Blewett, 1988, une exposition des oocystes pendant 30 minutes à 22°C avec du peroxyde d'hydrogène à 10 volumes permettrait d'obtenir également un effet kysticide satisfaisant.

➵ *Désinfectants utilisés plus particulièrement dans les systèmes de traitement des eaux :*

Des mesures de viabilité ont été réalisées afin de déterminer l'action kysticide de l'ozone et des dérivés du chlore utilisés habituellement pour la désinfection de l'eau (voir § II.1.4.).

➤ *Le chlore et les monochloramines :* Smith *et al.*, en 1989(b), ont montré que la désinfection au chlore, aux concentrations utilisées pour le traitement des eaux, était inefficace et que des concentrations aussi importante que 16000 mg / L pendant 24 h étaient nécessaires pour

obtenir une inactivation complète des oocystes. Les travaux de Korich *et al.*, 1990, ont confirmé l'inefficacité du chlore mais également des monochloramines, comparée au dioxyde de chlore ou à l'ozone, pour l'inactivation de *Cryptosporidium*.

➤ *Le dioxyde de chlore :* Ce désinfectant a permis d'obtenir de meilleurs résultats que le chlore. Ainsi selon Peeters *et al.*, 1989 des doses de 0.43 ppm de dioxyde de chlore pendant 30 minutes ont permis l'inactivation de 94.3 % des oocystes lors d'infection sur souris, tandis que Korich *et al.*, 1990, ont montré une inactivation de 90 % des oocystes après une exposition à 1.3 ppm de dioxide de chlore pendant 1 h.

➤ *L'ozone :* Il apparaît aujourd'hui selon de nombreux auteurs, comme le désinfectant le plus prometteur. Ainsi Korich *et al.*, 1990, ont montré une réduction de 90% de l'infectivité chez la souris pour des oocystes traités par 1 mg / L d'ozone pendant 5 minutes. De même, Peeters *et al.*, 1989, ont rapporté qu'une dose de 2.27 mg / L pendant 8 minutes était suffisante pour obtenir une inactivation complète d'une suspension de 5.10^5 oocystes / ml dans l'eau.

Il faut remarquer que si ces auteurs ont émis l'hypothèse que les doses résiduelles d'ozone de 0.4 mg / L pendant 6 minutes employées lors du traitement des eaux étaient suffisantes pour inactiver des eaux contenant moins de 10^4 oocystes / ml, Parker *et al.*, 1993, estiment que ce traitement n'est pas susceptible d'inactiver tous les oocystes qui peuvent être présents. Ils ont ainsi montré qu'une concentration résiduelle de 3 à 5 mg / L d'ozone pendant 2 à 6 minutes à 20°C était nécessaire pour inactiver 100 % des oocystes. Ils ont également remarqué que la température était un facteur important intervenant lors de l'inactivation des oocystes par l'ozone : en effet, à 5°C l'action de l'ozone est moins importante que pour des températures plus élevées.

Ce phénomène serait expliqué par une perméabilité plus importante de la paroi des oocystes à des températures élevées permettant un accès plus facile du désinfectant.

Au vu des données bibliographiques, la résistance de *Cryptosporidium* aux désinfectants apparaît donc indéniablement comme très importante.

II - EFFICACITE DES DIFFERENTS SYSTEMES DE TRAITEMENT DES EAUX SUR L'ELIMINATION DE CRYPTOSPORIDIUM :

La présence très ubiquitaire de *Cryptosporidium* dans tous les types d'eaux (§ I.4.) et les nombreuses épidémies d'origine hydrique rapportées récemment ont engendré la réalisation de nombreux travaux en vue d'évaluer l'efficacité des systèmes de traitement pour l'élimination de *Cryptosporidium*.

Par ailleurs sur le plan législatif, les directives européennes dans le domaine de l'eau recommandent que l'eau de boisson soit exempte de tout agent pathogène et notamment des

parasites tels que *Cryptosporidium* dont l'élimination doit bénéficier d'une priorité élevée selon les dernières recommandations de l'O.M.S. (Directives de qualité pour l'eau de boisson, OMS, 1994).

Dans ce chapitre, les performances de divers systèmes de potabilisation et d'épuration pour l'élimination de *Cryptosporidium* sont passées en revue.

II.1. - SYSTEMES DE TRAITEMENT RELATIFS A L'EAU DESTINEE A LA CONSOMMATION:

De nombreuses études de surveillance ont démontré la présence de *Cryptosporidium* dans des eaux potables traitées. Ainsi des études réalisées aux Etats Unis et en Angleterre sur respectivement 23 et 103 échantillons d'eaux potables ont révélé la présence de *Cryptosporidium* dans 28 et 61 % des cas (à des concentrations variant de 0.002 à 2.5 oocystes / L) (Badenoch, 1990). Ces études sont bien sûr limitées à un nombre d'échantillons restreints et ne sont certainement pas représentatives de l'ensemble des eaux de consommation mais elles permettent de témoigner de l'incapacité de certains systèmes de traitement pour l'élimination de la totalité des oocystes de *Cryptosporidium*.

La qualité de l'eau brute conditionne le type de traitement et il existe aujourd'hui une grande diversité de procédés utilisés par les industriels.

Quelques séquences typiques de traitement des eaux de surface sont regroupées dans le tableau N°6.

Tableau N°6 : Séquences types de traitement des eaux de surface.

Exemple 1	**Exemple 2**	**Exemple 3**
Rivière	Rivière	Rivière
Floculation	Réservoir	Réservoir
Sédimentation	Floculation	Filtration primaire
Filtration rapide	Flottation	Filtration lente sur sable
Charbon actif	Filtration rapide	Chloration
Chloration	Chloration	

Du fait qu'il n'existe pas deux eaux brutes de qualité identique, ces procédés doivent être associés de diverses façons afin d'obtenir les meilleures performances.

Les résultats de plusieurs études ont permis d'évaluer l'efficacité des principales étapes de ces process .

II.1.1. - Stockage en réservoir:

Le stockage d'eaux dans des réservoirs est un système qui permet de préserver un contingent d'eau pouvant alimenter une station en cas de pollution ponctuelle limitant l'approvisionnement direct en eau de rivière. La rétention d'eaux dans ces réservoirs pendant plusieurs semaines permet de mettre en oeuvre un processus de purification naturelle alliant une sédimentation des matières en suspension et une prédation des agents pathogènes présents par le zooplancton développé.

Une agitation lente permet dans la plupart des cas, d'une part de favoriser la formation de floculats naturels qui sédimenteront ensuite plus facilement et d'autre part de limiter la prolifération d'algues à l'intérieur du réservoir. Dans ces conditions aucune élimination de *Cryptosporidium* ne peut être envisagée. En effet la vitesse de sédimentation très faible qui caractérise *Cryptosporidium* limite l'efficacité du processus.

Ainsi, d'après la loi de Stockes, la vitesse de sédimentation de *Cryptosporidium* dans l'eau est de 0.5 µm / s pour des oocystes pris individuellement et de 1.6 µm / s pour un agrégat de 10 oocystes. Il faudrait donc dans ces conditions de 145 à 463 jours pour que de tels agrégats ou des oocystes isolés sédimentent jusqu'au fond d'un réservoir de 20 mètres de haut où aucune turbulence ne serait décelable.

Une possibilité de prédation des oocystes par le zooplancton est également envisageable, mais aucune observation n'a pu conforter cette hypothèse pour l'instant.

Cette étape ne permet donc théoriquement aucun abattement de *Cryptosporidium* dans l'eau.

II.1.2. - Floculation :

Cette étape qui consiste en l'ajout d'un agent floculant à l'eau traitée est utilisée dans de nombreux systèmes.

Les agents floculants les plus utilisés sont les sels d'aluminium et de fer tels que le sulfate d'aluminium, le chlorure de poly-aluminium, le sulfate de fer ou encore le chlorure ferrique.

Ces sels métalliques s'hydrolysent et provoquent la formation de précipités d'hydroxydes métalliques qui s'agrègent entre eux suivant les conditions chimiques du milieu. Ces précipités formés entraînent dans un "filet" les petites particules présentes dans l'eau.

De plus les flocs d'hydroxyde métallique possèdent une charge positive résiduelle qui interagit par attraction avec les potentiels négatifs caractéristiques des particules colloïdales présentes dans l'eau. *Cryptosporidium* est également caractérisé par un potentiel négatif de surface impliqué dans son adhésion aux flocs.

La floculation par hydroxyde d'aluminium ou hydroxyde ferrique semble présenter une efficacité sensiblement identique quant à l'élimination de *Cryptosporidium*. (Tableau N°7).

Dans certaines circonstances, la génération de flocs d'hydroxyde métallique peut être renforcée par l'addition d'agents coagulants constitués de polymères synthétiques ou naturels possédant des propriétés anioniques ou cationiques. Ces polymères peuvent également être utilisés juste avant une filtration rapide afin d'augmenter la taille des particules plus facilement retenues, ce qui pourrait favoriser l'élimination de *Cryptosporidium* par rétention sur les filtres (Schuler *et al.*, 1991).

La séparation du floc est ensuite obtenue par une étape de clarification utilisant soit une flottation soit une sédimentation.

Hall *et al.*, 1995, ont réalisé une étude détaillée sur les performances de la flottation par air dissous pour l'élimination de *Cryptosporidium*. Ils ont ainsi constaté une élimination comparable des oocystes par sédimentation ou flottation d'après les résultats en Jar Test réalisés sur des eaux de surface contaminées par *Cryptosporidium*.

Tableaux N°7 : Elimination de *Cryptosporidium* par Flottation - floculation en Jar Test.

Flottation - floculation en Jar Test par utilisation de sulfate de fer			
Dose (mg / l)	Ratio air : eau (mg air / l)	Turbidité (NTU)	Oocystes / L
0	-	6.2	72000
5	2.3	4.7	3250
5	4.7	3.3	1500
5	6.9	2.8	110
5	9.4	2.3	110

Coagulation pH = 4.5

Flottation - floculation en Jar Test par utilisation de sulfate d'aluminium			
Dose (mg / l)	Ratio air : eau (mg air / l)	Turbidité (NTU)	Oocystes / L
0	-	6.2	72000
6	2.3	0.7	11.8
6	4.7	0.6	ND
6	6.9	0.5	ND
6	9.4	0.3	ND

Coagulation pH = 5.5
ND : non détecté

Les tableaux N°7 indiquent un très haut degré d'élimination des oocystes par flottation - floculation, particulièrement élevé d'ailleurs pour le Jar Test utilisant le sulfate d'aluminium.

Les expériences réalisées sur pilote au cours de cette étude ont permis d'estimer à 80 - 90 % l'élimination des oocystes lors de l'étape de clarification employant une coagulation couplée à une flottation.

De nombreux auteurs ont d'ailleurs reconnu que l'étape de coagulation - floculation intervenait d'une façon significative dans les performances des systèmes "multi-séquentiels" de traitement. Ainsi Schuler *et al.*, en 1991, ont relevé une élimination de 99.9 % des oocystes par un système alliant une floculation suivie d'une filtration sur terres de diatomées, les meilleurs résultats ayant été obtenus pour une combinaison avec un floculat d'hydroxyde d'aluminium.

Il apparaîtrait selon ces auteurs, que la rétention mécanique des oocystes par le filtre ne serait pas le mécanisme le plus efficace dans l'élimination de *Cryptosporidium*, mais par contre l'adsorption ou l'inclusion des oocystes dans le floc d'hydroxyde d'aluminium à pH 5.5

semblerait intervenir d'une façon significative dans les performances du système.

II.1.3. - Les systèmes de filtration :

Deux grands types de système de filtration ont été développés pour le traitement des eaux : La filtration rapide sur divers matériaux et la filtration lente sur sable employée dans presque 20 % des stations de traitement en Angleterre et au Pays de Galles.

○ *La filtration rapide* :

➤ *Caractéristiques des filtres rapides :* Les filtres utilisés lors de cette étape sont constitués d'une ou plusieurs couches de matériaux filtrants tels que le sable, l'anthracite, le charbon actif en grain ou la terre de diatomées. Le sable est le support le plus fréquemment utilisé dans les systèmes actuels de traitement.

La taille des particules constituant les filtres, avoisine généralement 1 mm et l'épaisseur de la couche filtrante de 0.6 à 1 mètre.

La filtration rapide est caractérisée par une vitesse de filtration (de 5 à 10 m / h) près de 50 fois supérieure à celle appliquée en filtration lente sur sable. Cette filtration est généralement précédée d'une clarification alliant une floculation et une sédimentation. Les flocs et les particules ayant échappé à cette étape de clarification sont retenus sur le filtre. Mais il faut remarquer que de par leur petite taille, leur faible densité et leur forme sphérique, les oocystes de *Cryptosporidium* sont particulièrement susceptibles de passer à travers ce filtre.

➤ *Efficacité des filtres rapides sur l'élimination de Cryptosporidium* : Lors d'une étude réalisée aux USA sur des stations de traitement utilisant une filtration rapide, il apparaît que ces filtres ne présenteraient pas une efficacité totale pour l'élimination de *Cryptosporidium* (Tableau N°8).

Tableau N°8 : Détection de *Cryptosporidium* dans les filtrats de station de traitement utilisant une filtration rapide aux USA (Lechevalier *et al.*, 1989 cité par Badenoch, 1990).

Type de filtres	**Nombre de systèmes positifs (oocystes dans le filtrat) / Nombre total de systèmes examinés**	**Concentration en oocystes dans l'eau brute / 100 L**
Sable	3 / 5	2540
Deux couches de matériaux distincts	1 / 4	310
Matériaux hétérogènes	2 / 6	77
Charbon actif en grain	8 / 13	880

Les 28 systèmes examinés utilisent une étape de clarification par floculation-sédimentation postfiltration

Les résultats de cette étude laissent également suggérer que le passage des oocystes au travers des différents filtres est principalement dépendant du nombre initial d'oocystes dans l'eau brute.

Afin de suivre les changements de la qualité des filtrats obtenus, un suivi de la turbidité est habituellement réalisé en sortie des systèmes de filtration mais il faut préciser que les avis sur la validité de la turbidité comme indicateur de la présence d'oocystes en sortie de filtre sont assez divergents.

➤ *Validité de la turbidité comme indicateur de la présence d'oocystes en sortie de filtre :*
Des études assez récentes, ont suggéré que l'abattement de la turbidité en log pouvait être corrélé avec un abattement en log de *Cryptosporidium* (Lechevalier *et al.*, 1991, 1992).

Une étude réalisée sur des eaux collectées à partir de 3 sources de qualité variable, a permis de constater qu'un abattement de 1 log de la turbidité par filtration rapide était corrélé à un abattement de 0.89 log de *Cryptosporidium*, pour une eau de surface recevant en amont une collecte d'eaux usées.

Leland *et al.*, 1993, ont ainsi suggéré, lors d'une étude concernant l'épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique de 1992 en Oregon, que la plupart des systèmes de filtration devraient répondre à des consignes opérationnelles restreignant les valeurs de turbidité en sortie de filtrat à 0.1 - 0.2 NTU. En effet selon ces auteurs, au cours de l'épidémie de Talent (Oregon), le respect des standards fédéraux en matière de turbidité de 1 NTU, comme celui des réglementations du SWTR de 0.5 NTU, en sortie de station n'ont pas permis de garantir une protection suffisante quant à l'élimination de *Cryptosporidium.*

Malheureusement, même si ces recommandations permettaient de limiter les risques de contamination par *Cryptosporidium*, elles ne garantissent pas l'absence totale d'oocystes dans les effluents de stations ; ainsi Lechevalier *et al.*, 1991, ont montré que pour des turbidités aussi faibles que 0.19 NTU, *Cryptosporidium* a été détecté dans des effluents de station utilisant des systèmes de filtration rapide.

Il apparaît donc que la turbidité ne représente pas un indicateur suffisant pour évaluer la présence de *Cryptosporidium* dans le filtrat, ainsi une faible turbidité ne permettra pas d'affirmer l'absence d'oocystes dans le filtrat.

En définitive, il s'avère que même si la filtration rapide peut atteindre des rendements d'élimination de *Cryptosporidium* aussi élevés que 91 % (Rose *et al.*, 1986) ou 99.9 % dans certains cas (Schuler *et al.*, 1991), la production d'une eau exempte d'oocystes ne peut être garantie par ce type de traitement.

Au vu de ces résultats, la détermination de l'impact de ce traitement sur la viabilité des oocystes devrait permettre de mieux évaluer les risques relatifs à la présence de

Cryptosporidium dans les effluents de tels systèmes (Leland *et al.*, 1993 - Lechevalier *et al.*, 1991).

➤ *Inactivation de Cryptosporidium par le sable :* Afin d'accéder à des renseignements sur l'impact de la filtration rapide sur sable, sur la viabilité de *Cryptosporidium*, Parker et Smith, 1993, ont réalisé une étude sur l'inactivation de *Cryptosporidium* par le sable.

Ces auteurs ont montré que l'agitation d'une suspension d'oocystes avec le sable pendant 5 minutes permettait de tuer un nombre significatif d'oocystes et que sur une durée de 2 à 24 h, la fragmentation de la totalité des oocystes était obtenue. Si cette agitation est indubitablement plus drastique qu'un simple passage à travers un filtre à sable, ces expériences permettent néanmoins d'indiquer que les collisions entre oocystes et grains de sable sont préjudiciables pour la viabilité des oocystes.

De plus, l'effet abrasif d'une agitation de 5 minutes des oocystes en présence de sable semble suffisant pour sensibiliser les oocystes à des concentrations en chlore libre de 1 mg / L généralement inefficaces sur des oocystes isolés à partir de selles (Smith *et al.*, 1989(b)).

Une telle abrasion devrait raisonnablement survenir durant le passage au travers d'un système de filtration rapide sur sable, et les mêmes dommages devraient être constatés quant à la viabilité surtout si le process est suivi d'une chloration.

Parker *et al.*, suggèrent également que le traitement des eaux de lavage des filtres particulièrement chargées en oocystes (Rose, 1988 ; Richardson *et al.*, 1991), par agitation avec du sable, permettrait une clarification et une réduction sensible des oocystes présents.

○ *La filtration lente sur sable* :

➤ *Caractéristiques des filtres lents sur sable :* La filtration lente sur sable est caractérisée par l'emploi d'une surface de filtration assez importante (voisine de 0.4 hectare), d'une épaisseur de sable fin (0.3 - 0.4 mm) de 0.7 m en moyenne et d'une vitesse de filtration de 0.1 à 0.2 m / h.

La filtration lente offre, grâce à la finesse du sable et la lenteur du flux, une opportunité pour la rétention des petites particules. Pourtant la porosité des canaux la plus faible, retrouvée dans les couches de sable, approche les 60 µm, ce qui rend improbable la rétention de particules de la taille de *Cryptosporidium.*

Une des caractéristiques du filtre à sable lent est la colonisation bactérienne et alguale constituant un film au niveau des 10 à 20 mm supérieurs du filtre. Ce phénomène biologique, appelé "schmutzdecke", contribue majoritairement aux performances du filtre, en permettant la capture des particules les plus petites, dont une partie sera dégradée par les protozoaires, larves

et autes microorganismes qui y prolifèrent. La majorité de l'élimination des oocystes se fait par un piégeage dans cette première couche du filtre.

Après les étapes de lavages des filtres, cette schmutzdecke est détruite et la remise en service du système doit être amorcée très lentement afin de permettre la reconstitution de ce film biologique actif.

Une préfiltration par microtamisage ou par filtration rapide sommaire sur sable est généralement réalisée avant passage sur le filtre lent afin de limiter le colmatage. (Badenoch, 1990).

➤ *Efficacité des filtres lents sur l'élimination de Cryptosporidium* : Fogel *et al.*, 1993, lors de l'étude d'une station de traitement au Canada, utilisant une filtration lente sur sable ont montré une élimination de 48 % seulement des oocystes.

Ces faibles rendements seraient à relier avec un problème de conception du système lui-même. En effet l'utilisation d'un coefficient d'uniformité des grains de sable non approprié (supérieur au maximum recommandé : 3.0) aurait engendré des espaces de porosité trop élevée à l'intérieur du lit de sable limitant la capacité biologique de rétention du filtre. De plus les températures très basses enregistrées lors de cette étude ont également dû influencer le développement de l'activité biologique à l'intérieur du filtre et ainsi altérer les capacités du filtre pour l'élimination de *Cryptosporidium.*

Cette étude, comme beaucoup d'autres, a permis de confirmer l'importance de la "schmutzdecke" dans les mécanismes de rétention des filtres.

Ainsi, Schuler *et al.*, 1991, ont également remarqué que des mécanismes physiques mais également biologiques intervenaient dans l'élimination des microorganismes par les systèmes de filtration lente sur sable et que le développement de la microflore à l'intérieur des filtres était réduit en hiver (pour des températures très basses) ce qui affectait la rétention des protozoaires.

Ces auteurs ont étudié un système pilote de filtration lente sur sable. Ils ont ainsi montré que pour une eau contaminée à 2.10^4 oocystes / L, les concentrations retrouvées dans les effluents du filtre étaient de 13 à 174 oocystes / 1000 L, ce qui témoignait d'un abattement de 99.99 % des oocystes.

Selon les auteurs, les résultats obtenus en contamination artificielle, laissent suggérer que pour les concentrations habituellement retrouvées dans les eaux naturelles, une élimination satisfaisante de *Cryptosporidium* par filtration lente sur sable peut être attendue.

Ces résultats sont confirmés par Timms *et al.*, 1995, qui ont observé un abattement de 99.997 % des oocystes par ces systèmes de filtration. Ces auteurs ont également démontré que les oocystes étaient arrêtés par les couches supérieures de sable, ce qui avait déjà été remarqué par Chapman et Rush en 1990.

Mais il faut remarquer que cette étude a été réalisée sur une durée assez courte (3.5 h) ne permettant pas de prédire le devenir et le niveau de migration exact des oocystes lors de filtration prolongée.

En définitive, dans tous les cas, il apparaît que la filtration lente sur sable pourrait présenter une alternative intéressante pour éliminer *Cryptosporidium* au cours des systèmes de traitement.

II.1.4. - La désinfection :

Les sytèmes de traitement classique utilisés pour la potabilisation des eaux incluent presque systématiquement une étape de désinfection à la fois comme ultime barrière contre les agents pathogènes mais aussi pour assurer le maintien d'un désinfectant résiduel dans le système de distribution.

Malgré ces précautions, il apparaît d'après les nombreuses épidémies d'origine hydrique répertoriées, que ce système final de désinfection ne permet pas une prévention efficace de la transmission de la maladie, et ceci notamment en cas de désinfection par le chlore.

Trois agents désinfectants principaux sont actuellement utilisés dans l'industrie de l'eau :

- le chlore (le plus utilisé) et ses dérivés,
- l'ozone
- les U.V. (beaucoup plus rarement utilisés).

Le tableau N°9 résume l'efficacité de ces 3 désinfectants sur l'inactivation de *Cryptosporidium*.

Les résultats obtenus par les différents auteurs représentés dans ce tableau, ne sont pas strictement comparables car la viabilité des oocystes a été évaluée à partir de différentes méthodes regroupant aussi bien le dékystement, que le pouvoir pathogène chez l'animal ou encore l'inclusion / exclusion de colorants fluorogéniques.

A la lecture du tableau N°9, il n'en demeure pas moins évident que les agents classiques de désinfection comme le chlore ou l'ozone utilisés dans les systèmes de traitement, ne permettent pas de garantir l'élimination complète de *Cryptosporidium*.

Tableau N°9 : Inactivation de *Cryptosporidium* par différents agents désinfectants utilisés dans les systèmes de traitement des eaux.

Agent désinfectant	Efficacité % inactivation	Référence
❑ CHLORE :		
80 mg / L, 25°C, pH 7, 2 h	99	Korich *et al.*, 1990
8 - 16 g / L, 24 h	100	Smith *et al.*, 1989
1 g / L, 10°C, 24 h	70.5	Ransome *et al.*, 1993
❑ DIOXYDE DE CHLORE :		
0.43 mg / L, 15 - 30 min	64 - 69	Peeters *et al.*, 1989
0.49 mg / L, 30 min	63.8	Ransome *et al.*, 1993
4.97 mg / L, 15 min	95.8	Ransome *et al.*, 1993
1.3 mg / L, 1 h	90	Korich *et al.*, 1990
❑ OZONE :		
2.25 mg / L, 8 min	99	Peeters *et al.*, 1989
1 mg / L, 10 min	99	Korich *et al.*, 1990
1 mg / L, 10 min	> 95	Ransome *et al.*, 1993
5 mg / L, 5 min, 5 - 20°C	75 - 100	Parker *et al.*, 1993
1.11 mg / L, 5 min	100	Peeters *et al.*, 1989
❑ ULTRA - VIOLET :		
63 $mW.s.cm^{-2}$	80	Ransome *et al.*, 1993
80 $mW.s.cm^{-2}$	95	Ransome *et al.*, 1993
120 $mW.s.cm^{-2}$	99	Ransome *et al.*, 1993
8748 $mW.s.cm^{-2}$	99.9	Campbell *et al.*, 1995

➳ ***Le chlore et ses dérivés :*** Bien que la plupart des autres microorganismes soit sensible aux doses de chlore appliquées généralement dans les systèmes de traitement (5 mg / L en routine aux USA), il s'avère que *Cryptosporidium* nécessite des doses aussi élevées que 8 à 16 g / L de chlore libre pendant 24 heures pour être complètement inactivé (Smith *et al.*, 1989(b)).

D'après Korich *et al.*, 1990, les dérivés du chlore ne sont guère plus efficaces contre *Cryptosporidium*. Ainsi d'après leurs résultats, même si 1.3 mg / L de dioxyde de chlore permet en 1 h l'inactivation de 90 % des oocystes, contre 80 mg / L de chlore ou de chloramine en 90 min pour le même résultat, il apparaît que le dioxyde de chlore bien que plus efficace ne garantisse pas encore une élimination totale des oocystes dans l'eau de distribution. Il n'en demeure pas moins l'agent de chloration le plus prometteur quant à son efficacité.

Il faut également signaler que des limites de 0.5 mg / L de ClO_2 ont été fixées en désinfection de l'eau afin de préserver des dangers liés à la formation de sous produits toxiques lors de la distribution.

➢ ***L'ozone*** : L'utilisation de l'ozone apparaît pour l'instant comme le système de désinfection potentiel le plus prometteur pour une eau contaminée par *Cryptosporidium*.

Ainsi une élimination totale de la viabilité des oocystes a été obtenue par traitement d'une eau (à 10^4 oocystes / ml) avec 1.11 mg / L d'ozone pendant 6 minutes (Peeters *et al.*, 1989) ou encore par traitement d'une eau (à 10^5 oocystes / ml) avec 1 mg / L d'ozone pendant 10 minutes (Korich *et al.*, 1990).

Or, en Europe notamment, les concentrations résiduelles d'ozone habituellement préconisées par les industriels de l'eau sont de 0.4 mg / L pendant 4 à 6 minutes, à partir de l'application d'une dose de 1.5 à 4 mg d'ozone / L d'eau (Peeters *et al.*, 1989 ; Langlais *et al.*, 1991). Mais d'après de nombreuses études ces doses n'apparaissent pas suffisantes pour inactiver la totalité des oocystes potentiellement présents dans l'eau.

D'après Parker et al, 1993, une concentration résiduelle d'ozone aussi élevée que 5 mg / L pendant 2 à 6 minutes à 20°C est nécessaire pour une inactivation de 100 % des oocystes.

Ces auteurs ont également observé l'importance du facteur température dans l'efficacité des agents désinfectants pour l'inactivation de *Cryptosporidium* ; ainsi il apparaît qu'à des températures élevées, la paroi des oocystes devient plus perméable, permettant un accès plus facile du désinfectant.

Afin de pouvoir mieux évaluer et comparer l'efficacité de l'ozonation obtenue dans les différentes études rapportées à ce jour, une méthode analytique, employant la définition d'une valeur indicative calculée : [C x T] pour chaque expérimentation, a été mise au point.

Cette valeur correspond au produit de C = moyenne arithmétique de la concentration de désinfectant résiduel en début et fin d'expérimentation, par T = temps de contact. Le calcul de cette valeur [C x T] s'est inspiré de cinétique d'inactivation décrite par un modèle du 1er ordre défini par Chick - Watson (Finch *et al.*, 1993(b) ; Korich *et al.*, 1990 ; Langlais *et al.*, 1991).

D'après le tableau N°10, il apparaît qu'une fourchette assez large de valeur de [C x T] permet d'obtenir 99 à 99.9 % d'inactivation des oocystes. Ainsi une valeur de [C x T] de 3 à 4 mg.min / L suffirait pour l'inactivation de 99 % des oocystes à température ambiante. En revanche une diminution de la température pourrait modifier ces résultats en augmentant sensiblement la valeur de [C x T].

Tableau N°10 : Efficacité de l'ozonation pour l'inactivation de *Cryptosporidium* évaluée par le produit [C x T] (Finch *et al.*, 1993(b)).

Espèces	Protocole d'ozonation	Type d'eaux	Ozone résiduel (mg / L)	Temps de contact (min)	T°C	CxT pour une inactivation ≥ 99% (mg.min/L)	Références
C. parvum	Batch liquide, batch ozone	0.05 M Tampon phosphate	0.16 - 1.3	5, 10, 15	7	7	Finch *et al.*, 1993
C. parvum	Batch liquide, batch ozone	0.05 M Tampon phosphate	0.17 - 1.9	-	22	3.5	Finch *et al.*, 1993
C. parvum	Batch liquide, batch ozone	Eau désionisée	0.77	6	ambiante	4.6	Peeters *et al.*, 1989
C. parvum	Batch liquide, batch ozone	Eau désionisée	0.51	8	ambiante	4	Peeters *et al.*, 1989
C. parvum	Batch liquide, ozone continu	0.01 M Tampon phosphate	1	5, 10	25	5 - 10	Korich *et al.*, 1990
C. parvum	Batch liquide, ozone continu	Eau distillée	0.44	6	20	2.6	Perrine *et al.*, 1990
C. baileyi	Batch liquide, Batch ozone modifié	Eau distillée	0.6 - 0.8	4	25	2.4 - 3.2	Langlais *et al.*, 1990

Grâce à la définition de cette valeur indicative une comparaison entre les différents désinfectants a pu être ébauchée, même si les avis sont très divergents quant à la généralisation de la valeur C x T comme paramètre indicatif pour l'interprétation de l'action des désinfectants sur *Cryptosporidium*..

Ainsi Ives, en 1990, a comparé les performances de la désinfection au chlore et à l'ozone (Tableau N°11).

Tableau N°11 : Inactivation de *Cryptosporidium* dans l'eau par différents désinfectants évaluée sur la souris.

Désinfectant	**Inactivation**	**C x T** (mg.min / l)	**Références**
OZONE	99 %	5 - 10	Peeters *et al.*, 1989 ; Sterling *et al.*, 1989
DIOXYDE DE CHLORE	90 %	78 - 51	Sterling *et al.*, 1989
CHLORE	99 %	7200	Sterling *et al.*, 1989
	100 %	23.10^6	Smith *et al.*, 1989(b)
MONOCHLORAMINE	90 %	7200	Sterling *et al.*, 1989

L'ozone et le dioxyde de chlore apparaissent respectivement sur ce tableau comme les deux agents les plus performants.

➢ ***Les ultra violets:*** Ils correspondent au dernier mode de désinfection évalué sur *Cryptosporidium*.

Malgré le peu de données recensées sur ce sujet, il s'avère que les U.V. se révèleraient inefficaces pour l'élimination de *Cryptosporidium* dans l'eau, avec des doses nécessaires de 80 à 120 $mW.s.cm^{-2}$ pour l'inactivation de 90 à 99 % des oocystes (Ransome *et al.*, 1993), alors que les systèmes de traitement actuellement développés utilisent des doses de 30 $mW.s.cm^{-2}$ seulement.

Selon Campbell *et al.*, 1995, une opportunité pourrait s'offrir dans ce domaine, grâce à l'utilisation d'un système d'irradiation différent de celui habituellement utilisé dans les stations de traitement et qui permettrait l'exposition des oocystes, par le biais de deux filtres, à une radiation de 8748 $mW.s.cm^{-2}$ qui provoquerait une inactivation de 99.9 % de *Cryptosporidium*.

Selon ces auteurs, une investigation plus poussée dans ce domaine pourrait permettre de recommander ce type de traitement pour l'élimination de *Cryptosporidium*.

II.2. - SYSTEMES D'EPURATION DES EAUX USEES:

Les eaux usées brutes alimentant les stations d'épuration sont susceptibles de charrier de grandes quantités d'oocystes, les excréments humains et animaux collectés par les systèmes d'égouts représentant la source principale de transmission de *Cryptosporidium*.

L'élimination de *Cryptosporidium* par les systèmes de traitement d'eaux usées est donc une étape primordiale permettant de limiter les risques de pollution des eaux de surface destinées à la consommation.

Afin d'évaluer les performances des stations d'épuration pour l'élimination de *Cryptosporidium*, une surveillance de plusieurs effluents a été réalisée en Angleterre et aux Etats Unis (Tableau N°12).

Tableau N°12 : Niveau de contamination par *Cryptosporidium* de plusieurs effluents de station d'épuration en Angleterre et aux Etats Unis (Carrington et Smith, 1995).

Localisation	Nombre d'échantillon positif / Nombre d'échantillon total	Concentration (oocystes / L)	Référence
Etats Unis	11/11 *(100 %)*	4 - 3960	Madore *et al.*, 1987
Angleterre	37/50 *(74 %)*	1 - 321	Dawson *et al.*, 1994
Etats Unis	26/70 *(37 %)*	0.03 - 2.3	Parker *et al.*, 1994
Ecosse	76/117 *(65 %)*	5 - 60	Robertson *et al.*, 1995

Le tableau N°12 indique que la présence de *Cryptosporidium* apparaît avec une fréquence assez importante (60 % en moyenne des échantillons) dans les effluents de station d'épuration à des concentrations variables allant de 0.03 jusqu'à 3960 oocystes / L, ce qui laisserait présager que les systèmes actuels de traitement ne garantissent pas une élimination complète des oocystes.

Ainsi plusieurs études ont montré le passage de *Cryptosporidium* au travers des procédés de traitement conventionnels des eaux usées avec une élimination variant de 79 à 99 % des oocystes selon le degré d'élaboration du traitement secondaire employé (Madore *et al.*, 1987 ; Smith *et al.*, 1992 cité par Grimason *et al.*, 1993) et selon Rose *et al.*, 1986, une élimination de 74 % des oocystes par l'association traitement secondaire - désinfection.

Globalement, les procédés utilisés pour le traitement des eaux usées sont assez diversifiés même si les boues activées sont les plus souvent utilisées. Ces procédés de traitement par boues activées ont fait l'objet de nombreuses études en vue de l'évaluation de leur performance sur l'élimination et l'inactivation de *Cryptosporidium* dans les eaux usées.

Une étude détaillée a également été réalisée sur les systèmes utilisant des bassins de stabilisation.

❍ *Les procédés de traitement par boues activées :*

Enriquez *et al.*, 1995 ont suivi le devenir de *Cryptosporidium* dans trois stations de traitement utilisant les boues activées dont une supplémentée d'un traitement tertiaire par filtration (sable) et chloration.

Au cours de toute la période de surveillance, les concentrations en oocystes dans les effluents de traitement secondaire sont demeurées relativement constantes avec des valeurs de 0 à 20 oocystes / 40 L. La réduction du nombre d'oocystes durant le procédé de traitement tertiaire s'est révélée par contre insignifiante, ce qui était attendu par les auteurs de par l'inefficacité des désinfections au chlore et l'inadéquation déjà indiquée de la filtration pour l'élimination de *Cryptosporidium* (voir § II.1.).

Une simulation en laboratoire a permis également d'étudier l'élimination de *Cryptosporidium* par boues activées (Villacorta-Martinez De Maturana *et al.*, 1992). Une réduction de 80 à 84 % des oocystes a été obtenue au cours de cette étude, ce qui confirme les résultats de 79% obtenus par Madore *et al.*, 1987. De plus il apparaît que les oocystes retrouvés dans les eaux traitées, lorsqu'ils sont inoculés à des souris, conservent leur infectivité et sont présents dans un nombre suffisamment important pour permettre une infection .

Stadterman *et al.*, 1995 ont eux aussi étudié le devenir de *Cryptosporidium* durant le traitement des eaux usées sur un modèle utilisant un procédé par boues activées (tableau N°13).

Tableau N°13 : Elimination et inactivation de *Cryptosporidium* lors du traitement d'eaux usées par un procédé employant les boues activées.

Elimination			**Inactivation**		
Traitement	***Temps de séjour***	***% d'élimination***	***Traitement***	***Temps d'exposition***	***% d'inactivation***
Sédimentation Iaire	2 h	83.4	Digestion anaérobie	4 h	90
Sédimentation IIaire	3.6 h	90.7	Digestion anaérobie	24 h	99.9
Procédé complet de traitement par boues activées	6 h	98.6			

Cette étude a permis de démontrer que les procédés de traitement par boues activées et la digestion anaérobie permettaient une élimination et une inactivation de *Cryptosporidium* très efficace. Il faut préciser que les résultats obtenus au cours de cette étude, mettent en évidence une certaine influence du temps de séjour sur l'élimination du parasite qui atteint pour le temps de séjour maximal une valeur (98.6%) supérieure à toutes celles décrites dans les autres études.

L'étude de Stadterman et al a également permis de définir avec précision l'impact du traitement par boues activées sur l'inactivation des oocystes. Whitmore et Robertson, 1995 ont également étudié en détail ce phénomène (Tableau N°14).

Tableau N°14 : Inactivation de *Cryptosporidium* dans les boues digérées d'une station de traitement d'eaux usées.

Traitement	**Période d'exposition**	**Température (°C)**	**% d'inactivation**
Digestion anaérobie mésophile	3 jours	35	80
Digestion anaérobie mésophile	18 jours	35	90
Contrôle eau distillée	5 jours	35	80
Digestion aérobie thermophile	2h et 24 h	55	100
Pasteurisation des boues	2h et 24 h	55	100

Les résultats de cette étude ont mis en évidence l'importance du facteur température dans l'inactivation de *Cryptosporidium* lors des procédés d'épuration par boues activées. A ce facteur s'ajoute l'influence de la période d'exposition comme l'avaient déjà montré Stadterman *et al.* dans l'étude précédente.

○ *Les bassins de stabilisation :*

Grimason et al, 1993, ont réalisé une étude en vue d'évaluer les performances de 11 bassins de stabilisation utilisés pour le traitement d'eaux usées au Kenya (tableau N°15).

Tableau N°15 : Présence de *Cryptosporidium* et niveau de contamination des échantillons prélevés dans des bassin de stabilisation.

Nature du prélèvement	**Nombre d'échantillon positif / Nombre d'échantillon total**	**Concentration (oocystes / L)**
Eaux brutes	2 / 11 *(18.18%)*	12.5 - 72.97
Effluent de bassin anaérobie	3 / 5 *(60%)*	2.25 - 50
Effluent de bassin de stabilisation facultatif	2 / 14 *(14.28%)*	3.33 - 16.66
Effluent de bassin de maturation Iaire et IIaire	2 / 21 *(9.52%)*	2.5 - 4.54
Effluent de bassin de maturation final	0 / 11	0

Au cours de cette étude, *Cryptosporidium* a été isolé dans les eaux brutes en entrée du système à des concentrations variant de 12.5 à 72.97 oocystes / L dans 18.2 % des échantillons testés. En revanche, il faut souligner qu'aucun oocyste n'a été retrouvé dans les effluents finaux pour les 11 systèmes étudiés, ce qui indique une efficacité importante de la chaîne de traitement sur l'élimination du parasite.

Les auteurs ont montré une diminution progressive de la concentration en oocystes dans les différents bassins constituant la chaîne de traitement avec des concentrations variant de 2.25 à 50 oocystes / L. Cette décroissance séquentielle de la présence et des concentrations en oocystes détectées dans les effluents de bassin en série indique que l'élimination de *Cryptosporidium* serait reliée à l'effet cumulatif des temps de rétention hydraulique au cours du traitement.

Une période de rétention hydraulique minimum de 14.36 à 36.2 jours a ainsi été déterminée par les auteurs pour l'élimination de *Cryptosporidium*.

III - LES NOUVELLES TECHNIQUES DE MICROFILTRATION ET D'ULTRAFILTRATION APPLIQUÉES AUX TRAITEMENTS DES EAUX:

D'après les résultats exposés dans le chapitre précédent, il apparaît que les filières de traitement classiques ne garantissent pas une fiabilité totale pour l'élimination de certains microorganismes tels que *Cryptosporidium*. De plus les étapes finales de désinfection comme la chloration ne se sont pas révélées complètement efficaces pour l'inactivation des oocystes.

Le développement des techniques de filtration sur membrane a permis d'offrir une alternative aux systèmes classiques de désinfection, grâce à leur aptitude à clarifier et à décontaminer l'eau en une seule opération. En outre, l'utilisation de ces procédés à "membranes" permet sans ajout de réactifs d'obtenir une qualité d'eau constante quelle que soit la qualité de l'eau brute (Tazi-Pain *et al.*, 1992). En effet lors de la filtration sur membrane, l'élimination des microorganismes est assurée par un procédé de séparation physique dont l'efficacité est uniquement fonction de la taille des pores de la membrane et de la configuration du module.

Ainsi quatre domaines de filtration sont définis en fonction de la dimension des contaminants retenus (Figure N°7) :

- La macrofiltration : rétention de contaminants supérieurs à 10 µm (correspondant aux systèmes de filtration classiques utilisés dans les systèmes de traitement des eaux) ;

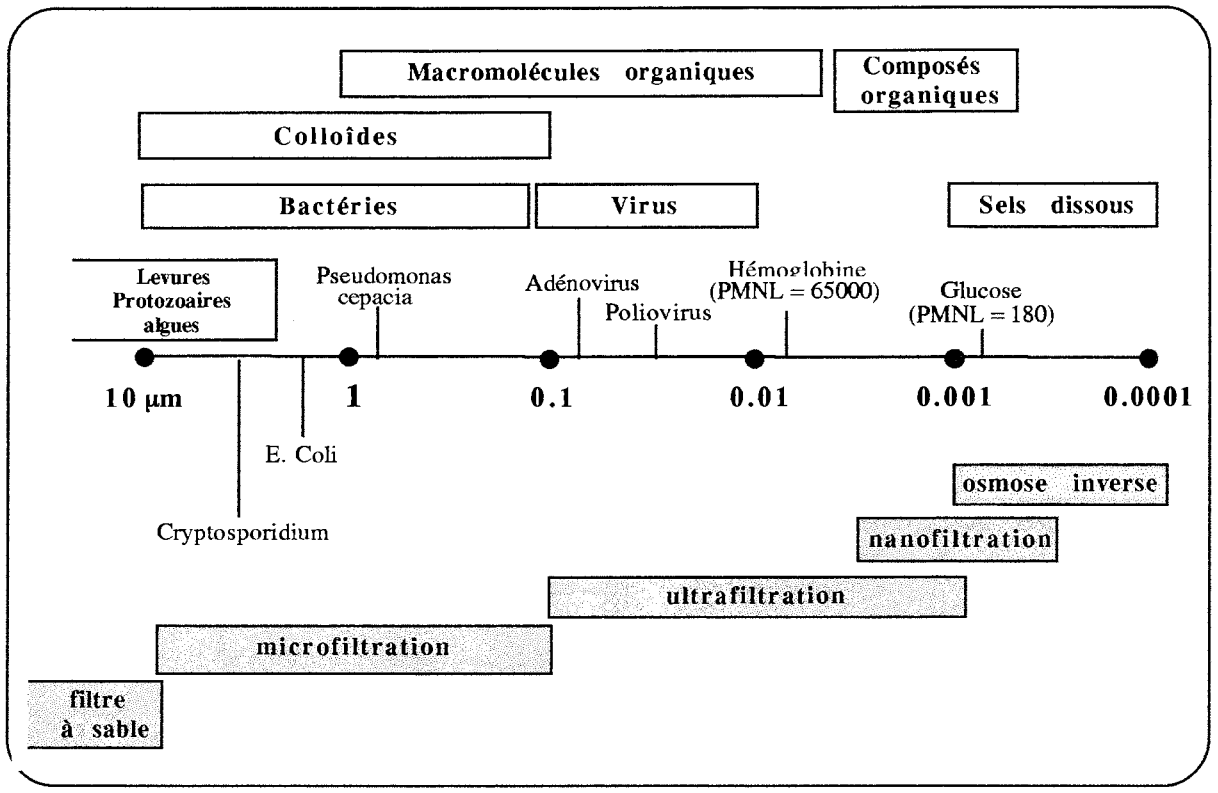
- La microfiltration : rétention de contaminants de dimensions comprises entre 0.1 et 10 µm (traitement des suspensions : clarification - stérilisation) ;

- L'ultrafiltration : séparation de solutés sur la base de leur poids moléculaire : de 0.001 à 0.1 µm (élimination des macromolécules en solution) ;

-L'osmose inverse : rétention de solutés de faible poids moléculaire : de 0.0001 à 0.001 µm (dessalinisation, dénitratation, production d'eau ultra pure).

Les procédés de microfiltration et d'ultrafiltration ont connu un essor important au cours de ces dernières années dans le domaine du traitement des eaux et de nombreuses études se sont focalisées sur ce sujet.

Figure N°7 : Classement des procédés à membranes en fonction de la taille des composés à éliminer :



III.1. - CARACTERISTIQUES GENERALES DES SYSTEMES DE MICROFILTRATION ET D'ULTRAFILTRATION UTILISES EN TRAITEMENT DES EAUX :

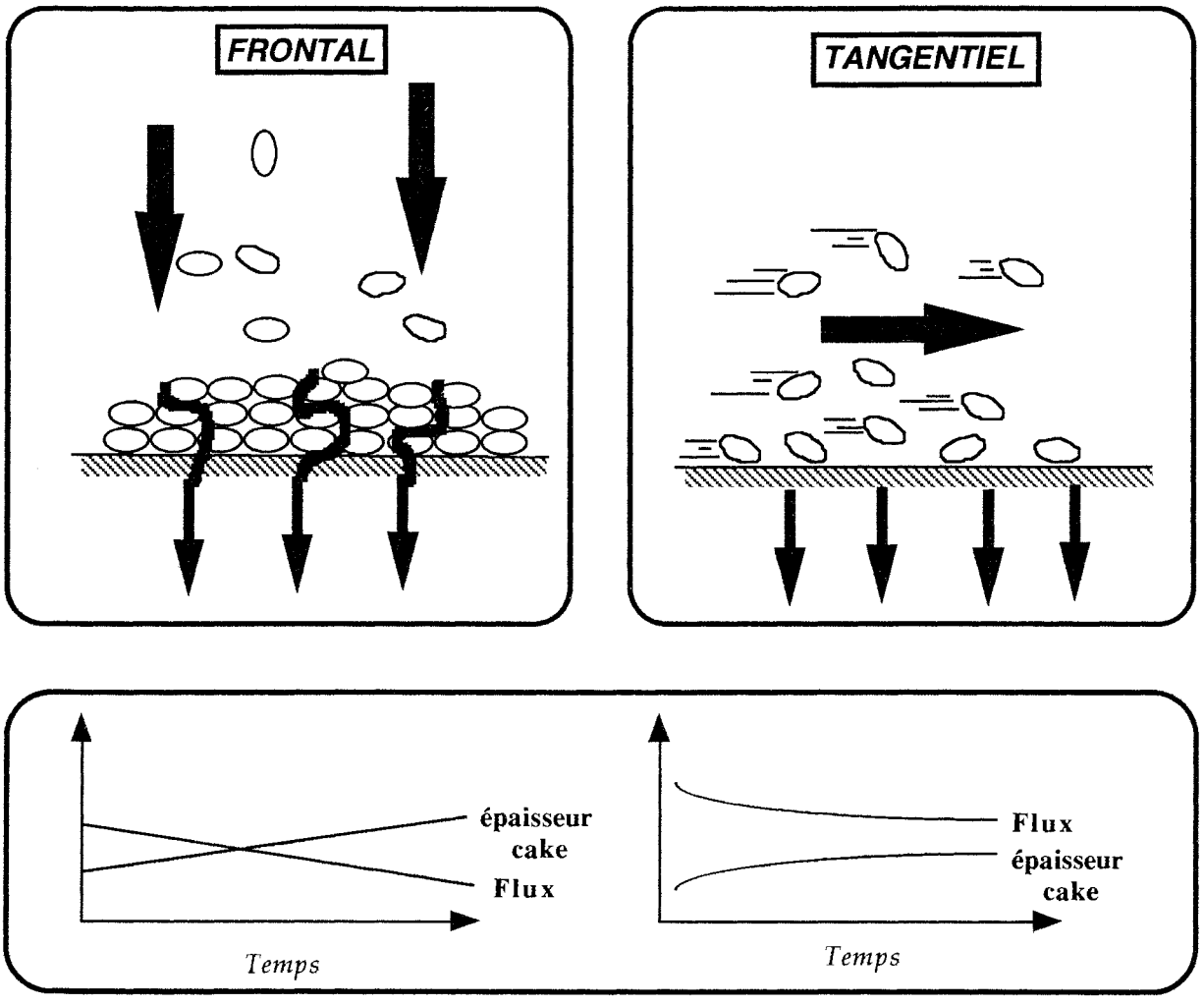
III.1.1. - Le mode de filtration :

Les systèmes membranaires utilisés dans l'industrie de l'eau fonctionnent généralement dans un mode tangentiel.

Lors d'une filtration en flux tangentiel, le flux d'eau à traiter est amené parallèlement à la surface du média filtrant contrairement à la filtration sur support classique en mode frontal où le fluide à traiter est alors amené perpendiculairement au filtre (Figure N°8).

Ce procédé permet d'optimiser la séparation et le débit filtrat, tout en concentrant les macromolécules retenues par la membrane dans le rétentat, mais également de minimiser le colmatage de la membrane.

Figure N°8 : Comportement des macromolécules dans un système de microfiltration en mode frontal et en mode tangentiel



En effet l'avantage principal de la filtration en mode tangentiel réside dans le fait, que les contraintes de cisaillement générées par ce type d'écoulement permettent de limiter la formation de dépôts de particules sur la surface membranaire et donc la chute du débit de filtrat contrairement aux résultats obtenus en filtration frontale classique où le gâteau de colmatage formé entraîne une augmentation de la résistance globale à l'écoulement ce qui induit une diminution rapide du débit filtrat.

III.1.2. - Les différents types de module filtrant utilisés :

Outre le mode de fonctionnement, le choix de l'élément filtrant est primordial pour l'obtention de conditions optimales de traitement.

Ainsi il existe une gamme assez étendue de systèmes utilisés et commercialisés notamment pour le traitement des eaux.

Le choix du module filtrant est défini selon trois caractéristiques :

- la composition du matériau utilisé ;
- la structure de la membrane ;
- la conception générale du module.

○ *Le matériau filtrant :*

Deux grandes catégories de membranes sont retrouvées sur le marché : les membranes organiques et les membranes minérales.

- Les premières sont composées de polymères du type : polypropylène, polysulfone, polyacrylonitrile, acétate de cellulose....
- Les secondes sont en alumine, carbone ou encore oxyde de zirconium sur support microporeux en alumine, carbone, métal ou silice.

Le choix du matériau est focalisé d'une part sur la résistance du filtre aux conditions drastiques de lavage des membranes et d'autre part sur les impératifs de fonctionnement (résistance aux fortes pressions,...) et les propriétés du "liquide" à traiter (nature abrasive, oxydants,...). La biodégradabilité et les caractéristiques hydrophobes ou hydrophiles du support interviennent également d'une façon significative dans le choix du matériau filtrant.

La sélection du matériau pour une application donnée (type spécifique d'eau à traiter) représente un compromis entre les qualités et les contraintes représentatives de la nature de l'élément filtrant. Trois exemples permettent d'illustrer la diversité du choix et les caractéristiques spécifiques aux différents types de matériaux proposés.

➤ Les membranes en acétate de cellulose sont hydrophiles et sont caractérisées par une très bonne résistance au colmatage. Par contre elle sont constituées de polymères biodégradables. La mise en oeuvre de contre - lavage fréquents avec du perméat chloré est donc conseillée afin de prévenir la croissance bactérienne au niveau de la membrane.

➤ Les membranes en polypropylène sont elles hydrophobes et ne résistent pas au chlore. L'utilisation de système de contre lavage à l'air est donc préconisée pour ce type de membrane, ce qui permet de maintenir un flux perméat élevé et constant.

➤ Les membranes en céramique (alpha - alumine) sont hydrophiles, non biodégradables et possèdent une grande compatibilité chimique. Leur résistance au colmatage est moyenne mais des contre lavages à l'acide et à la soude permettent de conserver un flux élevé et constant.

○ *La structure de la membrane :*

Trois types de structure membranaire sont disponibles :

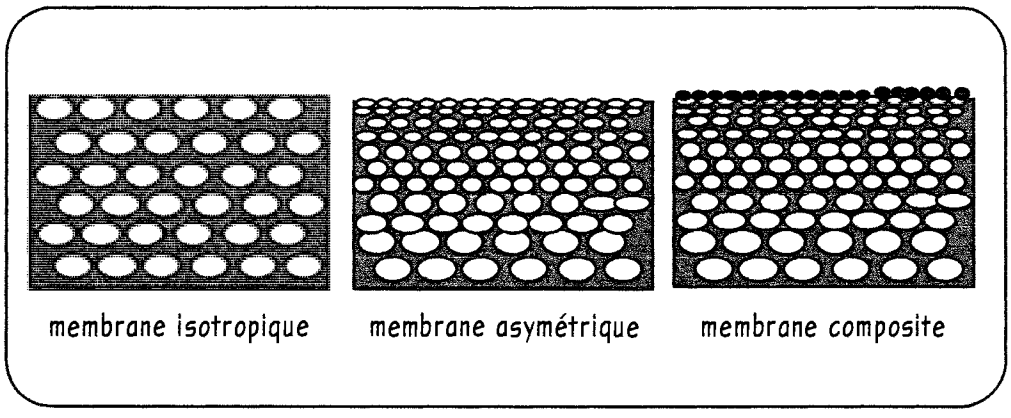
➤ Les membranes isotropiques constituées d'un seul matériau et dont la porosité et la

structure des pores ne changent pas d'une face à l'autre de la membrane. L'inconvénient majeur relatif à ces membranes est la possibilité de colmatage en profondeur.

➤ Les membranes asymétriques toujours constituées d'un seul matériau avec des pores de taille plus importante sur la face "perméat" par rapport à la face "alimentation". Cette technique permet de retenir le matériel "colmatant" à la surface de la membrane.

➤ Les membranes composites possédant les mêmes caractéristiques que les membranes asymétriques mais utilisant deux matériaux différents pour la face "perméat" et la face "alimentation". Mais l'inconvénient majeur de ces membranes composites est qu'elles ne peuvent normalement pas être nettoyées à contre courant.

Figure N°9 : Structures des membranes de micro et d'ultrafiltration



O *La conception générale du module :*

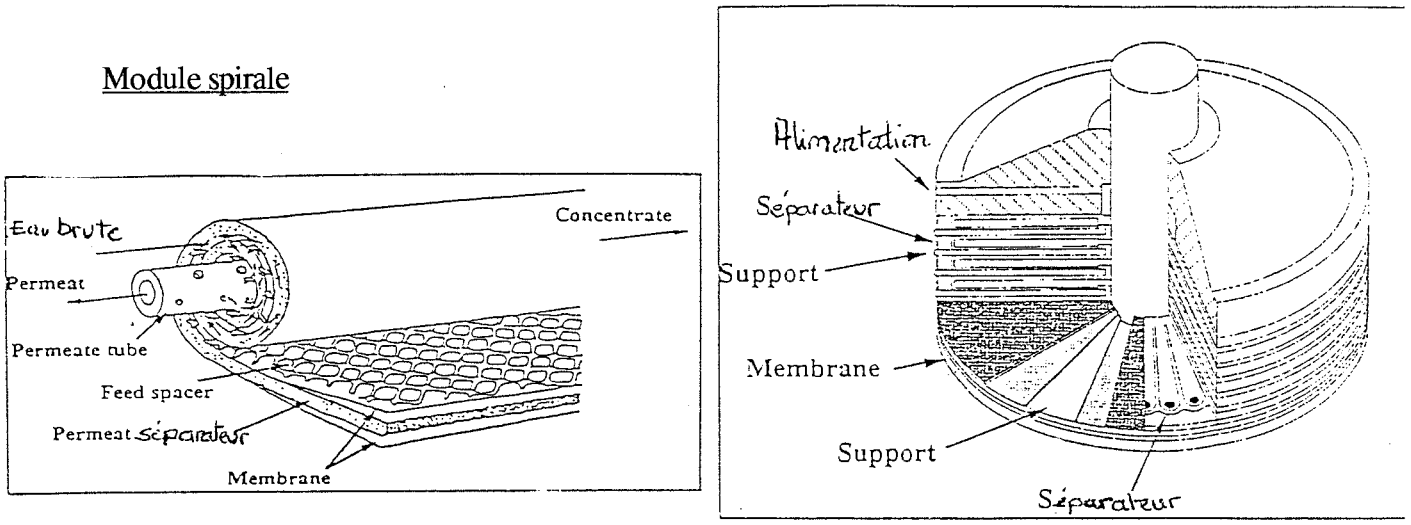
Les membranes d'ultrafiltration et de microfiltration sont commercialisées sous trois formes principales : les membranes planes, tubulaires ou sous forme de fibres creuses.

➤ Les modules à membranes planes ont été les premiers développés et se présentent généralement sous forme de cassettes mais également de spirales. Celles-ci sont constituées d'un support, de séparateurs perméat / alimentation et de membranes "soudées" par des matières plastiques (par exemples collées avec des polyuréthanes : Packet pellicon, Millipore). Les inconvénients majeurs de ce type de filtre sont les compatibilités chimiques limitées, la tolérance restreinte à l'encrassement par les matières solides en suspension, les pertes de pression en perméat limitant l'importance des flux.

Figure N°10 : Modules utilisant des membranes planes sous forme de spirale et cassette.

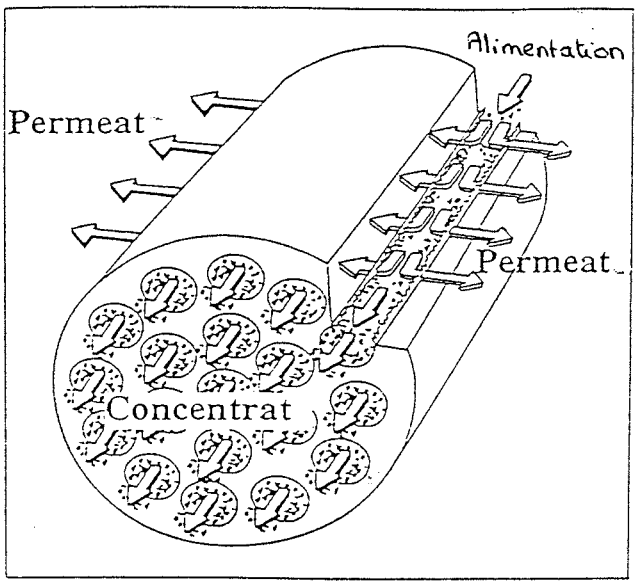
Module à cassette

Module spirale



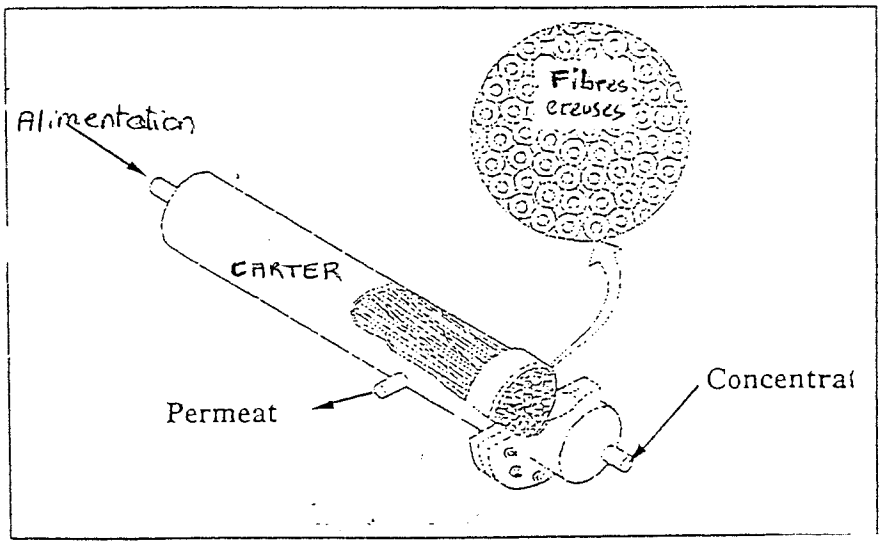
➤ Les modules tubulaires sont constitués d'éléments cylindriques microporeux comportant des canaux de circulation du flux disposés coaxialement sur toute leur longueur. La surface interne des canaux est recouverte d'une membrane qui détermine la taille des pores de l'élément filtrant. Les avantages majeurs de ces modules résident dans leur grande compatibilité chimique et leur tolérance vis-à-vis des matières solides en suspension.

Figure N°11 : Module tubulaire.



➤ Les fibres creuses de diamètre variant de 0,5 à 2 mm permettent, parmi les trois géométries potentielles des filtres, d'obtenir une compaction optimale et donc un encombrement minimum. Ce type de filtre est fréquemment utilisé dans le domaine de l'ultrafiltration en industrie. Leur compatibilité chimique est moins importante que celle développée dans les modules tubulaires et le risque de rupture de fibre à l'intérieur du système tend à leur conférer une durée de vie également moins importante que les modules tubulaires plus résistants.

Figure N°12 : Module à fibres creuses.



Les performances respectives de ces trois grands types de module, vis-à-vis de différentes propriétés et conditions opérationnelles particulièrement importantes en traitement des eaux, sont comparées dans le tableau N°16.

Tableau N°16 : Comparaison des performances des différents types de module disponibles.

	Membranes planes		Module tubulaire	Fibres creuses
	Cassette	Spirale		
Prétraitement	XX	XX	XXX	X
Perte de pression	XXX	XX	XXX	X
Degré de compaction	XX	XXX	X	XXX
Contre lavage	X	XXX	XXX	Impossible

X -Acceptable, XX - Bonne, XXX - Excellente

III.2. - EFFICACITE DES SYSTEMES TESTES POUR LE TRAITEMENT DES EAUX :

Les procédés de microfiltration et d'ultrafiltration sont utilisés comme systèmes de clarification et dans certains cas de désinfection physique dans 40 usines de traitement d'eaux potables dans le monde. Il existe également de l'ordre de 2500 installations d'osmose inverse et de nanofiltration en service dans le monde entier (Mandra *et al.*, 1995).

La plupart de ces installations avaient comme objectif le dessalement et l'adoucissement d'eaux chargées en minéraux, et ce n'est que très récemment que ces technologies ont été envisagées pour l'élimination de microorganismes ou de matières organiques.

L'avantage de l'utilisation de ces procédés en désinfection est l'élimination des risques de formation de sous produits de désinfection rencontrés au cours de l'utilisation de procédés de désinfection chimiques classiques.

Plusieurs études ont été réalisées afin d'évaluer l'impact de ces systèmes sur l'élimination de microorganismes comme les bactéries, virus ou parasites tels que *Cryptosporidium* ou *Giardia*. Ces travaux ont été réalisés soit sur systèmes pilotes soit sur des installations industrielles déjà en service.

○ *Etudes réalisées sur systèmes pilotes :*

Deux grands types d'application des systèmes d'ultrafiltration et de microfiltration ont été envisagés en industrie de l'eau :

- La clarification et la désinfection d'eaux de surface dans les systèmes de production d'eaux potables.
- Le traitement tertiaire des eaux usées en station d'épuration.

➳ L'ultrafiltration et la microfiltration appliquées pour le traitement des eaux de surface :

Différents types de modules précités dans le paragraphe III.1.2. ont été testés aussi bien dans le cadre d'étude de systèmes de microfiltration que d'ultrafiltration.

Mandra *et al.*, 1995 ont réalisé une étude détaillée visant à tester et comparer un éventail assez large de systèmes de microfiltration et d'ultrafiltration utilisant aussi bien des procédés à membranes organiques fibres creuses ou céramiques tubulaires (Tableau N°17).

Tableau N°17 : Caractéristiques des différents systèmes de microfiltration et d'ultrafiltration testés.

	Type de filtration	Seuil de coupure (µm)	Constitution de la membrane	Structure	Mode de fonctionnement	Surface filtrante par module (m^2)	Nombre de modules regroupés
(1)	Microfiltration	0.2	organique	Fibre creuse Peau externe	Frontal	1	10
(2)	Ultrafiltration	0.01	organique	Fibre creuse Peau interne	Frontal ou tangentiel	7.2 ou 50	1 2
(3)	Microfiltration	0.2	céramique	Tubulaire peau interne	Tangentiel	1	1
(4)	Ultrafiltration	0.005	céramique	Tubulaire peau interne	Tangentiel	1	1

Le bon fonctionnement des systèmes pilotes nécessite la mise en oeuvre d'une succession de cycles de production - rétrolavage. Ces rétrolavages sont réalisés soient à l'eau (membranes 2, 3, 4) soient à l'air (membrane 1) d'une façon régulière en fréquence et en durée pour assurer le décolmatage hydraulique des membranes.

L'efficacité des membranes vis-à-vis de la rétention de protozoaires tels que *Giardia* et *Cryptosporidium*, de bactéries et d'entérovirus, a été évaluée.

Il est apparu que toutes les membranes d'ultrafiltration et de microfiltration testées permettaient d'éliminer totalement les kystes de protozoaires présents dans l'alimentation avec un abattement estimé à 5.5 log (Tableau N°18).

Tableau N°18 : Elimination des kystes de *Giardia* et de *Cryptosporidium* par les différents systèmes de microfiltration (M.F.) et d'ultrafiltration (U.F.) testés.

Ressource	Microorganisme	Concentration Eau Brute (Nombre de parasite / L)	U.F. organique	M.F. céramique	M.F. organique
Eau de réseau	*Giardia*	5.10^3 *	0 (2)	-	-
Eau de surface	*Giardia*	380	0 (8)	0 (2)	0 (5)
Eau de surface	*Cryptosporidium*	230	0 (7)	0 (2)	0 (5)

** concentrations obtenues par dopage de l'eau par contamination artificielle.*

() Nombre d'analyses effectuées.

Par contre d'après les résultats obtenus pour l'élimination de bactéries, il apparaît que les membranes céramiques ne permettraient pas de retenir la totalité des contaminants.

Ainsi pour une concentration de départ de 10^4 coliformes / 100 ml obtenue par un dopage d'une eau de surface, des concentrations atteignant jusqu'à 16 bactéries / 100 ml ont été retrouvées dans les perméats ce qui correspond à un abattement de 2 à 3 log. Une coagulation pré-filtration semble améliorer de prés d'1 log la rétention des bactéries et virus en agrégeant les microorganismes.

L'interprétation de l'ensemble des résultats rapportés au cours de cette étude laisse présager que toutes les membranes testées seraient capables d'éliminer totalement les protozoaires.

Par contre il s'est avéré que des problèmes au niveau des joints assurant l'étanchéité des systèmes, combinés à des défauts de structure au niveau des membranes peuvent limiter les performances des systèmes de micro et d'ultrafiltration sur céramique

Ainsi des microorganismes comme *Pseudomonas diminuta* ou des coliformes fécaux de tailles comprises entre 1 et 2 µm ont pu échapper aux systèmes et passer dans les perméats. Or le seuil de coupure maximal garanti par le constructeur pour les membranes testées était de 0.2 µm (microfiltration).

Par ailleurs du fait qu'aucun essai en dopage artificiel n'a été réalisé au cours de cette étude pour *Cryptosporidium* et en raison du haut degré de déformabilité relevé pour ce parasite, capable malgré sa taille de 4 à 6 µm de passer au travers de systèmes de filtration d'une porosité de 1 à 3 µm (Drozd *et al.*, 1993 ; Rose, 1990), des investigations plus poussées apparaissent nécessaires afin d'évaluer plus strictement les performances de ces systèmes de microfiltration et d'ultrafiltration.

Les résultats obtenus au cours de l'étude de Mandra *et al.*, 1995, ont globalement trouvé une confirmation au cours de diverses investigations menées par d'autres auteurs (Tableau N°19).

Ainsi Tazi-Pain *et al.*, 1992, au cours de travaux sur des systèmes employant des modules en fibres creuses organiques, pour le traitement d'eaux de surface chargées en matière organique, ont montré que toutes les membranes testées étaient capables de retenir les composés présents sous forme particulaire avec un abattement total des matières en suspension, du fer, de l'aluminium et des germes microbiens dans les perméats. Seule la pollution carbonée sous forme dissoute et particulaire n'a été que partiellement retenue par les membranes (Abattement de 43 % en microfiltration et en ultrafiltration).

Tableau N°19 : Elimination de bactéries et protozoaires (*Cryptosporidium, Giardia*) par différents systèmes pilotes de micro ou d'ultrafiltration.

Type filtration	Seuil coupure	Constitution membrane	Structure	Mode	Elimination des bactéries			Elimination de Giardia			Elimination de Cryptosporidium			Références
					Eau brute	Perméat	Abattement	Eau brute (kystes/L)	Perméat (kystes/L)	Abattement	Eau brute (oocystes/L)	Perméat (oocystes/L)	Abattement	
M.F.	0.2 µm	organique	Fibres creuses	Tang.	*6.10^2 - $3.4.10^6$	0	100 %	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tazi-Pain *et al.*, 1992
U.F.	0.1 µm	organique	Fibres creuses	Tang.	*6.10^2 - $3.4.10^6$	0	100 %	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
U.F.	50000 D	organique	Fibres creuses	Tang.	*6.10^2 - $3.4.10^6$	0	100 %	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
U.F.	13000 D	organique	Fibres creuses	Tang.	*$6.8.10^2$ - $4.8.10^5$	0	100 %	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
M.F.	0.2 µm	organique	Fibres creuses	Front.	✞$6.6.10^7$	<1	>7.8 log	$5.4.10^4$	<1	>4.7 log	$2.6.10^4$	<1	>4.4 log	Adham *et al.*, 1995
					#$1.5.10^8$	<1	>8.2 log	$1.5.10^5$	<1	>5.2 log	$8.2.10^4$	<1	>4.9 log	
M.F.	0.2 µm	organique	Fibres creuses	Tang.	✞$6.6.10^7$	<1	>7.8 log	$5.4.10^4$	<1	>4.7 log	$2.6.10^4$	<1	>4.4 log	
					#$1.5.10^8$	<1	>8.2 log	$1.5.10^5$	<1	>5.2 log	$8.2.10^4$	<1	>4.9 log	
M.F.	0.1 µm	organique	Spirale	-	✞$6.6.10^7$	<1	>7.8 log	$1.2.10^5$	3	4.6 log	$7.4.10^4$	5	4.2 log	
					#$1.5.10^8$	<1	>8.2 log	$1.1.10^5$	<1	>5 log	$6.2.10^4$	<1	>4.8 log	
U.F.	500000 D	organique	Fibres creuses	Tang.	✞$9.6.10^8$	<1	>9 log	9.10^4	<1	>5 log	6.10^4	<1	>4.8 log	
					#$1.5.10^8$	<1	>8.2 log	$1.5.10^5$	<1	>5.2 log	$8.2.10^4$	<1	>4.9 log	
U.F.	300000 D	céramique	Tubulaire	Tang.	✞$3.7.10^8$	$4.6.10^1$	6.9 log	9.10^4	<1	>5 log	6.10^4	<1	>4.8 log	
					✞$4.3.10^8$	$1.1.10^3$	5.6 log							
					#$1.5.10^8$	<1	>8.2 log							
U.F.	100000 D	organique	Fibres creuses	Tang.	✞$6.6.10^7$	<1	>7.8 log	$5.4.10^4$	<1	>4.7 log	$2.6.10^4$	<<1	>4.4 log	
					#$5.3.10^8$	<1	>8.2 log	$1.5.10^5$	<1	>5.2 log	$8.2.10^4$	<1	>4.9 log	

* Coliformes, Streptocoques, spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrice (ufc / 100 ml), ✞ *Escherichia coli* (ufc / 100 ml), # *Pseudomonas aeruginosa* (ufc/ 100 ml)
M.F. : microfiltration ; U.F. : ultrafiltration ; Tang. : tangentiel ; Front. : frontal.

Il a également été constaté que le débit d'eau traitée et le coût énergétique de fonctionnement étaient plus intéressants pour les systèmes de microfiltration, ce qui a amené les auteurs à recommander ces systèmes, éventuellement couplés avec un traitement d'affinage en aval des membranes afin d'améliorer leurs performances à l'occasion de traitement d'eaux chargées en pollution carbonée dissoute.

Les travaux d'Adham *et al.*, 1995, ont également permis de démontrer l'efficacité de tous les systèmes de microfiltration et d'ultrafiltration organique et céramique testés sur l'élimination de *Cryptosporidium* et *Giardia* avec toutefois une exception pour une membrane spirale pour laquelle des problèmes d'étanchéité alimentation-perméat ont été mis en cause.

En ce qui concerne l'élimination des bactéries, *E.coli* a été détectée uniquement dans les perméats des systèmes employant l'ultrafiltration tubulaire sur céramique. L'explication de ce phénomène réside selon les auteurs dans une distribution plus irrégulière des pores et des défauts de structure plus importants pour les membranes céramiques par rapport aux membranes organiques.

Enfin, Jacangelo *et al.*, 1991 ont réalisé une étude visant à tester l'efficacité d'un système d'ultrafiltration employant une membrane organique en cellulose sous forme de fibres creuses (porosité 100000 D). Un abattement supérieur à 4 log a été obtenu pour *Giardia* quelle que soit la qualité de l'eau traitée. Par contre, les auteurs ont pu remarquer, l'importance du maintien et du contrôle de l'intégrité de la membrane au cours du process. En effet, dans le cas de la rupture de seulement une fibre à l'intérieur du système, *Giardia* a été détecté dans le perméat.

➳ L'ultrafiltration et la microfiltration appliquées pour le traitement des eaux usées :

L'utilisation de la microfiltration et de l'ultrafiltration pour le traitement tertiaire des effluents de station offre l'opportunité d'allier en une seule étape une clarification et une désinfection, sans risque de formation de composés organo-halogénés.

Le développement de ces techniques pour le traitement de l'eau usée est récent et les études rapportées ne sont pour l'instant focalisées que sur des installations pilotes.

A l'heure actuelle, quelques systèmes employant des procédés de microfiltration sont en service au Japon pour le recyclage d'eaux usées dans des immeubles (Roullet, 1985 ; Audic *et al.*, 1986).

Les caractéristiques de quelques systèmes pilotes récemment développés sont présentées dans le tableau N°20.

Tableau N°20 : Efficacité et caractéristiques de 3 systèmes pilotes employant des procédés de microfiltration pour le traitement des eaux usées.

Traitement préliminaire	Caractéristiques du système utilisé	Efficacité	Références
Tamisage, Elimination du sable, dégraissage, préfiltration 800 µm, Bioréacteur à boues activées en amont du système de filtration	**Microfiltration** Membrane céramique Fibres creuses - 0.1 µm Surface filtrante : 1.1 m^2 Flux tangentiel	Elimination de 93 à 99.9% du COD et des solides en suspension.	Trouve *et al.*, 1994
Traitements secondaires classiques : - procédés par boues activées suivis ou non d'une étape de coagulation-floculation-décantation - procédé secondaire physico-chimique uniquement.	**Microfiltration** Membrane minérale Tubulaire - 0.2 µm surface filtrante : 0.2 ou 0.12 m^2 Flux tangentiel	Elimination totale des matières en suspension, turbidité < 1 NTU	Pouet *et al.*, 1994
Sédimentation secondaire en réservoir	**Microfiltration** membrane type "MEMCO" Flux tangentiel	Elimination totale des bactéries et virus, réduction de 92% de la turbidité.	Ben Aim *et al.*, 1993

Les données permettant d'évaluer l'efficacité de ces systèmes n'ont concerné que la qualité bactériologique et physico-chimique des effluents.

Dans tous les cas l'abattement ≥ 99.9% des matières en suspension et l'élimination totale des bactéries en sortie de système, laissent supposer que l'efficacité des systèmes de microfiltration tangentielle pour l'élimination de protozoaires comme *Cryptosporidium* devrait être maximale. Des investigations plus poussées dans ce domaine, afin de confirmer cette hypothèse, resteraient néanmoins nécessaires.

La limitation essentielle pour l'application de ce type de procédé en industrie réside pour l'instant dans la difficulté à gérer les problèmes de colmatage en profondeur des membranes. Les premiers travaux réalisés sur pilote laissent présager de l'importance des traitements primaires et secondaires affectés aux eaux usées sur la capacité des effluents à colmater les membranes.

○ *Etudes réalisées sur systèmes industriels :*

Les membranes les plus utilisées se présentent généralement sous forme de fibres creuses car elles possèdent un très net avantage par rapport aux membranes planes : elles permettent tout en occupant un volume réduit de développer une très grande surface de filtration ce qui est particulièrement appréciable en application industrielle.

Par contre lorsque le fluide à traiter circule à l'intérieur des fibres, il faut s'assurer qu'il ne contient pas de particules trop grosses qui pourraient gêner l'écoulement ou détériorer la membrane.

Un prétraitement de l'eau est alors nécessaire (préfiltration). Dans ce cas des modules sous forme tubulaire sont préférés par les industriels car même si le rapport encombrement / surface filtrante est plus important que pour les modules à fibres creuses, le passage dans les tubes d'eaux même chargée est possible. (Salvat et Leborgne, 1990).

Tableau N°21 : Caractéristiques de plusieurs systèmes de traitement d'eaux de surface employant la microfiltration ou l'ultrafiltration en France.

Type d'eaux traitées	Localisation	Entreprise	Capacité nominale	Procédé employé	Références
Eaux de source subissant des perturbations météorologiques	St Maurice-Les-Chateauneuf (Syndicat du Sornin)	C.G.E.	2000 m^3 / j	**Microfiltration** Membrane minérale céramique Tubulaire 0.2 µm 32 modules - surface filtrante totale : 122 m^2 Flux Tangentiel	Salvat et Leborgne, 1990
Eaux de forages karstiques	Marques (Syndicat des eaux de la vallée de l'Eaulne)	C.E.G.E.L.E.C. Agence de l'eau Seine Normandie	850 à 1000 m^3 / j	**Microfiltration** Membrane minérale céramique Tubulaire 0.2 µm 19 modules - surface filtrante totale : 60 m^2 Flux Tangentiel	Lahoussine-Turcaud *et al.*, 1991
Eaux de source karstiques Pollution bactérienne importante	Douchy (Loiret)	Lyonnaise des eaux	1200 m^3 / j	**Ultrafiltration** Membrane organique Fibres creuses 0.01 µm 2x8 modules - surface filtrante totale : 800 m^2 Flux Tangentiel	Anselme *et al.*, 1992
Eaux de source karstiques	Amoncourt (Haute Saône)	Lyonnaise des Eaux	240 m^3 / j	**Ultrafiltration** Membrane organique Fibres creuses 0.01 µm 2x10 modules - surface filtrante totale : 140 m^2 Flux Tangentiel	Bersillon *et al.*, 1989

4 exemples précis d'installations employant les procédés de microfiltration et d'ultrafiltration pour le traitement des eaux de surface ont été décrits en France au cours de ces dernières années (Tableau N°21).

Dans aucune de ces quatre études, l'efficacité des systèmes utilisés, sur l'élimination des protozoaires comme *Cryptosporidium* ou *Giardia*, n'a été évaluée.

Les données recensées ont permis uniquement d'évaluer la qualité bactériologique et physico-chimique en sortie perméat des installations. Ainsi l'analyse bactériologique a révélé dans tous les cas un abattement maximal en sortie de système de tous les germes tests jusqu'aux limites des seuils de détection.

Dans le cas des deux systèmes employant des modules de microfiltration tubulaire, un prétraitement par floculation, par adjonction de polychlorure d'aluminium basique (WAC) en alimentation, a permis de limiter les contraintes relatives au colmatage en profondeur des membranes grâce à la formation d'une précouche à la surface des membranes par coagulation - agrégation des particules colloïdales en suspension dans l'eau.

Deux études réalisées respectivement par Ben Aim *et al.*, 1993 et Peters et Pedersen, 1990, ont permis de souligner également l'intérêt d'un couplage des procédés de microfiltration à une floculation pour le traitement des eaux karstiques.

Dans tous les cas, il faut remarquer que les systèmes de microfiltration utilisés, qu'ils soient couplés ou non à ce type de prétraitement, ont démontré la même efficacité pour l'élimination des bactéries en sortie perméat.

Les deux autres systèmes, décrits dans le tableau N°21, emploient quant à eux un procédé d'ultrafiltration organique. Ce procédé a été dans ces deux cas préféré à la microfiltration sur céramique car il permettait d'éviter les problèmes de colmatages en profondeur cités précédemment.

IV - STRUCTURE ET CARACTERISATION DE LA SURFACE DE CRYPTOSPORIDIUM :

Les seuls travaux rapportés sur la caractérisation de la surface de *Cryptosporidium* ont concerné l'ultrastructure et la composition antigénique des parois du parasite. Peu de travaux ont été réalisés sur la composition biochimique et les propriétés physiques, telles que l'hydrophobicité ou la charge de surface, de la structure externe des oocystes.

IV.1. - CHARGE DE SURFACE DES OOCYSTES :

Jusqu'à ces dernières années, seuls quelques rares travaux ont été réalisés sur la détermination des charges de surface de *Cryptosporidium.*

Ongerth, 1989, a remarqué que le potentiel de surface des oocystes de *Cryptosporidium* frais était de -20 / -25 mv à pH neutre et augmentait jusqu'à 0 ou devenait positif si le pH diminuait jusqu'à une valeur de 4 - 4.5.

Cette variation du potentiel zéta en fonction des conditions de pH pourrait avoir des implications sur l'optimisation des traitements chimiques, comme la floculation, pour l'élimination des oocystes au cours du traitement des eaux.

D'après Montiel et Welte, 1992, le potentiel zéta de *Cryptosporidium* serait de -10 mV dans l'eau. Il faut préciser que dans tous les cas le manque d'information sur les conditions expérimentales, caractérisation du milieu de suspension ou de la source d'oocystes utilisée, ne permet pas d'interpréter les résultats pour l'instant obtenus avec une grande rigueur, ni de les exploiter sans une grande réserve.

Néanmoins une étude récente a permis d'éclairer l'incertitude relative aux résultats précités.

En effet Gregory et Pugh, 1995, ont réalisé une étude plus complète permettant d'affirmer que la concentration saline n'avait aucun effet sur la charge de surface des oocystes, qui seraient caractérisés par un potentiel zéta de -12 mV dans de l'eau du robinet. Ils ont également constaté que les oocystes étaient caractérisés par une charge négative de surface pH-dépendante, atteignant le point isoélectrique pour un pH voisin de 4. Selon ces auteurs l'ensemble des ces résultats sembleraient suggérer la présence d'une couche de composés polymériques adsorbés à la surface des oocystes.

Le développement d'investigations plus poussées permettrait d'apporter plus de renseignements dans ce domaine.

IV.2. - ULTRASTRUCTURE DE LA PAROI DE CRYPTOSPORIDIUM :

L'existence de deux types distincts d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* a été rapportée :

- ❑ des oocystes à paroi fine ("thin-walled oocysts"), qui sont responsables du cycle d'autoinfection et qui subissent un processus de dékystement endogène;
- ❑ des oocystes à paroi épaisse ("thick-walled oocysts"), qui sont éliminés dans les fécès.

L'ultrastructure des oocystes à paroi épaisse, constituant la forme de résistance retrouvée dans l'environnement et responsable de la transmission de la maladie, a fait l'objet de nombreuses études.

La paroi de ces oocystes mesure en moyenne 49,7 nm d'épaisseur et se compose de deux couches (Figure N°13) :

➤ *La couche externe* mesure 10 nm en moyenne, elle est finement granulée et modéremment électron-dense.

Un espace mince, de 2,5 nm en moyenne, est interposé entre les deux couches qui constituent la paroi.

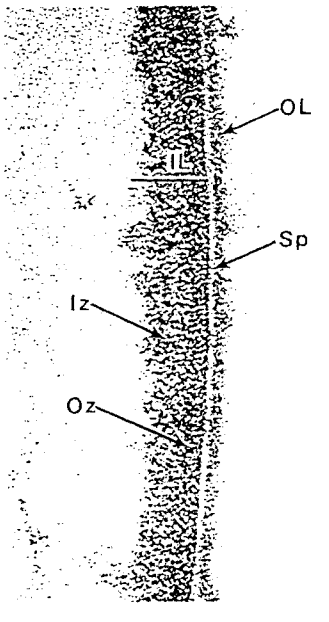
➤ *La couche interne* possède une épaisseur de 37,4 nm en moyenne et elle est constituée de 2 zones distinctes :

❑ *une zone externe* : de surface extérieure lisse et possèdant des bords externes et internes électron dense, encadrant une région médiane transparente aux électrons. Elle mesure 11,6 nm en moyenne et elle est collée à la zone interne.

❑ une zone interne : modérément électron dense et d'une épaisseur de 25,8 nm en moyenne.

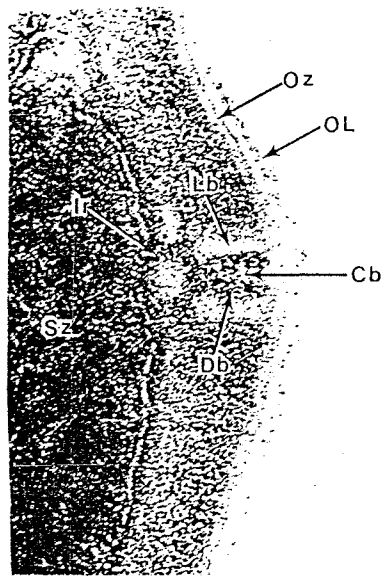
Le bord adjacent de la cavité de l'oocyste est irrégulier en apparence et attaché à une matrice de matériel et aux sporozoïtes.

Figure N°13 : Paroi de l'oocyste de *Cryptosporidium parvum* (Microscope électronique à transmission x 300 000) (Reducker *et al.*, 1985 (a)) *(couche externe (OL); couche interne (IL); zone externe de la couche interne (Oz); zone interne de la couche interne (Iz); espace séparant couche externe de couche interne (Sp))*



La paroi de l'oocyste est interrompue à un pôle de celui-ci par une suture simple. Cette suture incomplète est observée autour de l'oocyste dans la couche interne de la paroi (Figure N°14) (Reducker *et al.*, 1985 (a)).

Figure N°14 : Suture de la paroi de l'oocyste de *Cryptosporidium parvum* (microscopie électronique à transmission x 300 000) (Reducker *et al.*, 1985 (a)). (bande transparente aux électrons (Lb) ; bande interne électron-dense (Db) ; bande centrale transparente aux électrons (Cb) ; distension inférieure (Ir) ; sporozoïte (Sz))



Il existe également une espèce de *Cryptosporidium* atypique nommée : *C. fragilis* par Baxby et Blundell, 1988.

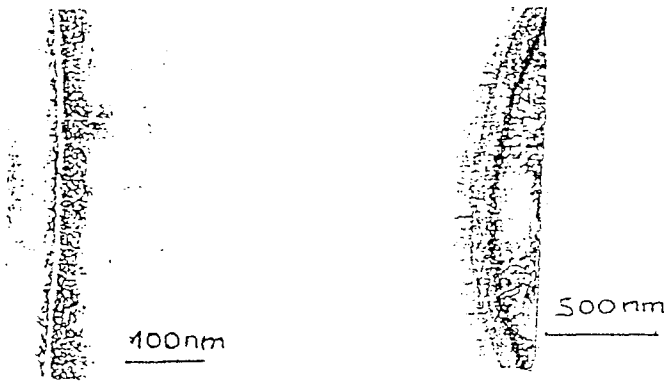
Cette dénomination repose sur la fragilité osmotique spécifique de l'oocyste.

Cette variété d'oocyste est caractérisée par une membrane externe épaisse, distincte de celle des oocystes typiques de *C. parvum* et par la présence de sporozoïtes de forme sphérique.

Cette membrane externe est constituée de 3 couches (Figure N°15) :

- La couche la plus externe: de 30 à 50 nm d'épaisseur;
- La couche médiane : plus fine mais plus électron-dense, de 15 à 20 nm d'épaisseur;
- Et dans la majorité des cas, une dernière couche amorphe de 60 à 70 nm d'épaisseur.

Figure N°15 : Section de la paroi d'un oocyste typique (gauche) et atypique (droite). (Microscopie électronique) (Baxby et Blundell, 1988)



Ces oocystes atypiques pourraient être des formes immatures de "thin" et/ou "thick-walled" oocystes et seraient excrétés dans des circonstances inhabituelles et inexpliquées. (En l'absence d'antisérum monoclonal spécifique, les oocystes atypiques ne peuvent être détéctés que par microscopie électronique fine-section.)

Ils ne sont jamais retrouvés dans des échantillons reconnus comme contenant la variété typique de *C. parvum* . (Baxby et Blundell, 1988)

A l'exclusion des études visant à la détermination de l'ultrastructure de la paroi de *C. parvum* .en microscopie électronique , aucune démarche n'a été effectuée concernant la constitution biochimique moléculaire des membranes.

Les seuls travaux menés sur la composition des membranes, ont été réalisés en vue de déterminer un anticorps spécifique de *C. parvum* localisé à l'extérieur de la paroi des oocystes (Lumb *et al.*, 1988), ceci dans un but thérapeutique ou pour la mise au point de technique de détection des oocystes par immunofluorescence. Il apparaît ainsi d'après différents travaux réalisés (Lumb *et al.*, 1988 - Nichols *et al.*, 1991- Nina *et al.*, 1992 (a)), que la composition antigénique du parasite peut être altérée selon le type d'hôte en réponse à des pressions de sélection créées par l'environnement de cet hôte.

IV.3. - STRUCTURE ANTIGENIQUE DU PARASITE :

La composition antigénique d'isolats d'oocystes de *Cryptosporidium* a été étudiée au cours de nombreux travaux. Il est apparu que la majorité des glycoprotéines et des molécules de surface du parasite étaient immunogènes (Tilley *et al.*, 1990).

Selon Nina *et al.*, 1992 (b), la composition antigénique des oocystes de *Cryptosporidium parvum*, et plus particulièrement de leurs sporozoïtes, varie selon les isolats et serait affectée par l'origine de l'hôte.

Nichols *et al.*, 1991, avaient déjà montré que la composition antigénique de la paroi des oocystes variait suivant la nature de l'hôte, en l'occurence humain, bovin ou ovin. La composition antigénique du parasite ne serait donc pas statique mais varierait selon le type d'hôte en réponse aux pressions de sélection exercées par l'environnement de l'hôte.

La signification biologique de la variation de taille entre les antigènes de surface des sporozoïtes de certains isolats est inconnue, mais cette petite différence pourrait indiquer un changement mineur dans la composition en acides aminés ou une variation dans la composition en carbohydrates des glycoprotéines (Nina *et al.*, 1992 (b)).

L'isolement d'antigènes communs à plusieurs isolats a pourtant permis la préparation d'anticorps spécifiques permettant la mise au point de méthode de détection des oocystes par immunofluorescence (Lumb *et al.*, 1988).

Les antigènes des oocystes de plusieurs espèces de *Cryptosporidium* (*C. baileyi*, *C. parvum*, *C. muris*) ont été examinés par Westernblot et immunofluorescence (Nina *et al.*, 1992 (a)). Ces travaux ont permis de montrer qu'il existe une plus grande diversité antigénique entre les différentes espèces de *Cryptosporidium* qu'il n'en existe entre les différents isolats d'une même espèce.

D'après plusieurs études il apparaît d'ailleurs, que les différentes espèces de *Cryptosporidium* sont différenciées par la composition en polypeptides de la paroi de leurs oocystes (Lumb *et al.*, 1988 - Tilley *et al.*, 1990) et la mobilité électrophorétique de leurs chromosomes (Mead *et al.*, 1988).

IV.4. - RESISTANCE STRUCTURALE DES OOCYSTES AUX DIFFERENTES CONDITIONS DE STOCKAGE ET DE TRAITEMENT DES ECHANTILLONS :

D'après Robertson *et al.*, 1992, il apparaît que les oocystes séjournant dans les fécès témoignent d'une résistance plus importante aux stress environnementaux : En effet une diminution de la perméabilité au D.A.P.I. (4', 6 diamidino - 2 phénylindole (colorant fluorogénique)) a été remarquée pour les oocystes ayant séjourné dans des selles (pendant 33 jours); ceci laisserait suggérer qu'un composant des fécès, sans doute un mucopolysaccharide, s'insèrerait dans la paroi des oocystes et ce composé accorderait aux oocystes une protection vis-à-vis des stress environementaux (mais cette propriété serait perdue au cours du processus digestif).

Dans la majorité des cas les selles contenant les oocystes sont conservées à 4°C dans une solution de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$, 2,5 %) . Mais il apparaît, selon Upton *et al.*, 1988, que la charge de surface des oocystes pourrait être modifiée en présence de $K_2Cr_2O_7$, 2,5 %. Les réactifs utilisés lors des protocoles de purification des oocystes comme une solution de saccharose contenant une petite quantité de phénol ou le chlorure de césium modifieraient de même cette charge de surface.

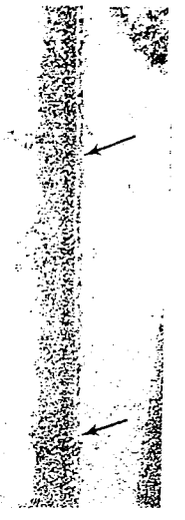
Selon Current, 1987, le stockage de *Cryptosporidium* dans de l'eau du robinet altérerait également les oocystes. En effet, la présence d'éléments bactériens et fongiques, qui relarguent, entre autre, une variété d'enzyme protéolytique, induirait la dégradation de la suture de la paroi de l'oocyste (il y aurait donc rapidement un influx d'eau qui altérerait l'oocyste si cette forme était placée en environnement hypotonique).

En ce qui concerne le traitement par l'hypochlorite de sodium des résultats divergents ont été obtenus selon les publications :

* D'après Reducker *et al.*, 1985 (a), un traitement par 1,75 % d'hypochlorite de sodium altère la paroi de l'oocyste (Figure N°16) : Il est observé une perforation ou une destruction totale de la couche externe de la paroi et occasionnellement du bord externe électron-dense

de la couche interne, mais la zone interne de la couche interne n'est pas affectée.

Figure N°16 : Perforations de la couche externe par traitement avec hypochlorite de sodium (Microscope électronique à transmission x 150 000) (Reducker *et al.*, 1985 (a)).



* Par contre, d'après Nichols *et al.*, 1991, et Baxby et Blundell, 1988, il n'y a pas de modification observée après traitement par l'hypochlorite de sodium. Le "banding patterns" des oocystes n'est pas affecté significativement par traitement par NaOCl 1% (30 min, 35°C), proteinase K, trypsine ou formol (Nichols *et al.*, 1991).

Dans le tableau ci-après, sont regroupés les résultats obtenus après différents traitements physico-chimiques des oocystes de *Cryptosporidium* (Tableau N°22);

Tableau N°22 : Effets de différents traitements physiques et chimiques sur la stabilité des oocystes de *Cryptosporidium* (Baxby et Blundell, 1988)

	oocystes		
Traitement	Frais Typiques	"Agés" Typiques	Atypiques
Sucrose-phenol (survie)	>120 min	60 to >120 min	10-12 min
40% Sucrose (survie)	>120 min	>60 min	10-12 min
100% Glycerol	NF	NF	F
32% NaCl	NF	NF	F
Acetone (2-5 min)	NF	NF	F
Ether (2-5 min)	NF	NF	F
Chloroform (2-5 min)	NF	NF	F
70% Ethanol (2-5 min)	NF	NF	F
7% NaOCl (2-5 min)	NF	NF	NF†
33% $ZnSO_4$ (2-5 min)	NF	NF	NF†
10% $K_2Cr_2O_7$ (2-5 min)	NF	NF	NF‡
2.5% Glutaraldehyde (2-5 min)	NF	NF	F
Bouin's (2-5 min)	NF	NF	F
Ultrasons			
20 s	NF	NF	NF†
40 s	NF	NF	F

NF, oocystes détectés - F, oocystes non détectés, † Résistance à sucrose phénol inaltérée (10 min), ‡ résistance à sucrose-phénol altérée (2-4 min).

Il apparaît qu'une exposition à une pression osmotique importante (saccharose, 32% NaCl) provoque une destruction des oocystes de *Cryptosporidium* atypiques, de même que l'exposition à des solvants des lipides comme le chloroforme.

Après concentration par formol-éther des caractéristiques semblables sont observées : Les oocystes apparaissent endommagés et "distordus" au microscope électronique.

Il apparaît également que même si les oocystes typiques plus "âgés" sont moins résistants que les oocystes frais, une différence significative est toujours constatée avec les oocystes atypiques. En effet, ces oocystes atypiques apparaissent comme osmotiquement fragiles et possédant une structure particulièrement chargée en lipides.(Baxby et Blundell, 1988).

V - METHODES DE DETECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU :

La mise au point de techniques de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau est apparue indispensable, notamment depuis les épidémies récentes qui ont montré que les indicateurs bactériens, utilisés pour l'évaluation de la qualité microbiologique de l'eau, se révélaient totalement inadéquates pour la détermination de la qualité parasitologique de celle-ci (Rose *et al.*, 1991). Il faut pourtant signaler qu'à l'heure actuelle aucune méthode préférentielle n'a encore été normalisée et seules certaines techniques font l'objet de recommandations nationales.

Les techniques actuelles de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau se décomposent en trois étapes principales :

- *La concentration de l'échantillon* : En effet, les faibles concentrations d'oocystes habituellement présentes dans l'eau nécessitent de concentrer de grands volumes d'échantillons afin de limiter le seuil de détection des méthodes.
- *La purification du concentrat* : Le concentrat obtenu au cours de l'étape précédente réunit effectivement une quantité de débris très importante qui rend la détection directe de *Cryptosporidium* très difficile. Cette étape permet donc de séparer les oocystes de toutes les particules gênantes pour l'identification et le dénombrement des parasites présents.
- *L'identification et le dénombrement des oocystes* : L'étape de purification ne permettant pas de sélectionner uniquement les oocystes mais également les éléments de taille et de densité voisines, une étape d'identification spécifique, comprenant soit une coloration chimique (coloration simple ou immunofluorescence) soit la mise en évidence de caractères spécifiques aux oocystes (ADN : détection par PCR, morphologie : cytométrie de flux), est nécessaire.

V.1. - METHODES DE CONCENTRATION :

Parmi les techniques expérimentées jusqu'à présent, les méthodes de filtration sur cartouche et plus récemment de floculation ont été les plus sollicitées.

V.1.1. - Méthodes de filtration :

Parmi les différents modes de filtration déjà testées, la filtration sur cartouche polypropylène et la filtration sur membrane sont les plus souvent employées (tableau N°23).

➤ *La filtration sur cartouche* pour la recherche de *Cryptosporidium* dans l'eau apparaît pour l'instant la plus utilisée. En effet, l'industrie de l'eau au Royaume-Unis a adopté d'une façon générale la méthode SCA "Blue Book" (DOE/SCA, 1990) basée sur une filtration sur cartouche pour le suivi de l'eau usée et traitée. Cette méthode a été utilisée par plusieurs laboratoires en Angleterre et en Ecosse dans le cadre du "National Catchment Survey" conduit de 1990 à 1991 (Miller et Carrigton, 1991).

Les filtres cartouches les plus usités se présentent sous forme de bobine de fibres en polypropylène affichant une porosité de 1 µm (Micro Wynd II AMF-Cuno division, Meriden, Connecticut). Les oocystes après filtration sont élués du support suivant différents protocoles de lavage utilisant le plus souvent des solutions de Tween 80 ou autres détergents.

Mais il faut remarquer que les méthodes basées sur les cartouches de filtration sont longues et fastidieuses et ne donnent que de faibles rendements de récupération. En effet, malgré les intéressantes performances des cartouches concernant la rétention des oocystes sur le filtre (de 75 à 90 %), (Musial *et al.*, 1987, Drozd *et al.*, 1993), l'élution des oocystes présente de grandes difficultés .

Ainsi les rendements de récupération évalués pour cette technique oscillent seulement entre 10 % pour des eaux de rivière (Ongerth et Stibbs, 1987) à 59 % pour des eaux de distribution (Badenoch, 1990). De plus, ces rendements varient beaucoup selon le taux de contamination des échantillons (Musial *et al.*, 1987 ; Dawson *et al.*, 1993).

Selon Vesey et Slade (1991), des rendements de récupération aussi faibles que 1 % ont été déterminés. Le seul avantage de cette méthode est la possibilité d'analyse de larges volumes d'eaux (jusqu'à 1000 L en eau de surface).

➤ *Des systèmes de filtration sur membrane* (142 mm Ø, porosité 0,45 µm ou 293 mm Ø, porosité 1 µm) sont également utilisés mais des volumes beaucoup plus faibles sont filtrés (10-20 L) et il est nécessaire soit de laisser sédimenter l'échantillon préalablement à la filtration soit de préfiltrer l'échantillon (Ongerth et Stibbs.1987 ; Rush *et al.*, 1990) afin d'éliminer le plus de débris possibles pour éviter le colmatage.

Tableau N°23 : Efficacité et caractéristiques des différentes méthodes de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau par filtration.

Type d'eaux	Méthode de concentration	Purification	Identification	Rendement	Inconvénient / avantage signalés par les auteurs	Auteurs
Eaux de distribution* Eaux usées : effluents secondaires traités par boues activées†	**Filtre cartouche** polypropylène 1 µm Volume filtré : 20† et 378* L, Contre lavage, Dissection et lavage du filtre, (Tween 80 0.1%) Centrifugation et lavage du culot	Sonication Flottation sur une solution de sucrose-phénol	Immunofluorescence directe et indirecte sur filtre	29 à 58%	-	Rose *et al.*, 1991
Eaux de distribution* Eaux usées : effluents secondaires traités par boues activées†	Tamisage sur 0.315 et 0.160 mm **Filtre cartouche** polypropylène 1 µm Volume filtré : 378 L, Contre lavage Dissection et lavage du filtre (Tween 80 0.1%) Centrifugation et lavage du culot	Sonication Flottation sur solution de Sheather	Immunofluorescence directe sur lame	44%* ($10^{6\#}$) 29%* ($10^{3\#}$) 14.5%* ($10^{2\#}$) 9%† ($2.10^{3\#}$)	La taille de l'inoculum de départ influe sur le rendement de la méthode Récupération des oocystes sur le filtre ≥ 80%	Musial *et al.*, 1987
Eaux usées	**Filtre cartouche**, polypropylène 1 µm Volume filtré : 125 L, Contre lavage Dissection et lavage du filtre (Tween 80 0.1%) Centrifugation et lavage du culot	Séparation sur Formol éther technique de Ritchie	Immunofluorescence directe sur lame	17.5%($10^{5\#}$)	Technique longue et fastidieuse Rendements d'élution faibles Récupération des oocystes sur le filtre ≈ 75%	Drozd *et al.*, 1992
Eaux de rivières	Préfiltration membrane 5µm **Filtration membrane** polycarbonate Ø 293 mm, 1µm Volume filtré : 20 L, Elution - agitation (eau distillée), Centrifugation	Flottation sur citrate de potassium (40%)	Immunofluorescence indirecte sur filtre	5 à 20 % seuil de détection: 0.5 oocystes / l	Lecture longue, nécessité d'augmenter le volume de l'échantillon et le rendement de la méthode pour améliorer le seuil de détection	Ongerth et Stibbs, 1987
Eaux de ditribution supplémentées en sédiment	**Filtration membrane** copolymère acrylique,Ø 142 mm, 1.2µm , sous pression négative Volume filtré : 10 L Lavage filtre (Tween 80 1%)	Flottation sur une solution de citrate de tri -potassium	Immunofluorescence indirecte sur lame	25.5 % (19.9 à 36.6 %) ($2.10^{2\#}$)	Rendements intéressants, recommandée pour l'analyse de grands volumes d'eaux potables faiblement chargée.	Dawson *et al.*, 1993
Eaux de distribution	**Filtre plissé multicouche** polypropyléne 5 µm, Contre lavage Volume filtré : 100 L Séparation et lavage des filtres (Tween 80 0.1%), Centrifugation	Flottation ou non sur solution de Sheather	Immunofluorescence	< 10% (0.4 à 5.5 %) ($10^{7\#}$)	Procédure d'élution responsable des faibles rendements	Whitmore et Carrington, 1993
Eaux de distribution	**Filtre en fibres de verre** 1 et 3 µm Volume filtré : 100 L Contre lavage, Centrifugation	Flottation ou non sur solution de Sheather	Immunofluorescence	< 10% (0.5 à 6.5%) ($10^{7\#}$)	Dissection et lavage du filtre impossible du fait de la désintégration du filtre	Whitmore et Carrington, 1993
Eaux de distribution* Eaux de rivière†	**Filtre cartouche, microfibre de verre** 2 µm, Contre lavage Volume filtré : 10 L Centrifugation	-	Immunofluorescence	< 10% (6.4 à 12.3%*) (2.6 à 8.2%†) ($10^{7\#}$)	Problème de conservation de l'intégrité pendant lavage	Whitmore et Carrington, 1993
Eau désionisée* Eaux de ditribution†	**Filtration tangentielle** membrane minérale 0.2 µm Volume filtré : 10* à100† L Centrifugation	-	Microscopie contraste de phase (DIC Normaski)	73 à 86 % * 37 à 41 % † ($10^{7\#}$)	Bons résultats Système non transportable sur site de prélèvement	Whitmore et Carrington, 1993

 # Quantité d'oocystes inoculés à l'échantillon de départ.

Selon Ongerth et Stibbs, 1987, les rendements de récupération de cette technique varient de 5 à 20 % en eau de rivière. Cette méthode n'est donc pas non plus très performante.

La technique de filtration la plus récente envisagée par Dawson *et al.*, 1993, utilise également un filtre membrane (142 mm, porosité 1,2 µm, (Gelman versapor)), mais dans ce cas, le filtrat est aspiré à l'aide d'une pompe péristaltique, (0,5 l/min).

Cette méthode permet d'obtenir des rendements moyens de 25,5 % et peut être recommandée notamment pour les eaux potables qui demandent l'analyse de grands volumes du fait de la faible concentration en oocystes présente dans l'échantillon et qui ne présentent pas une charge assez importante pour provoquer un colmatage rapide du filtre.

Cette méthode est notamment recommandée par Vesey *et al.* (1994) qui considèrent cette technique modifiée de Ongerth et Stibbs (1987) comme moins laborieuse et tout à fait adaptée à ce type d'eau.

➤ *Les autres systèmes de filtration envisagés* : Face aux rendements assez limités développés par les deux types de filtration précédemment cités, Whitmore et Carrington, 1993, ont récemment testé un éventail de méthodes pouvant offrir une alternative pour la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau (Tableau N°23).

Parmi toutes ces méthodes seule la technique de filtration tangentielle permet de parvenir à des résultats intéressants avec des rendements atteignant des valeurs de 37 à 41 % pour des échantillons de 100 L d'eaux de distribution. La limitation des rendements à ces valeurs est due selon les auteurs au colmatage des membranes et à l'adhésion des oocystes dans la couche superficielle de débris formée à la surface de ces membranes.

L'adaptation de ces techniques à des eaux chargées pourrait être réalisée grâce à la mise en oeuvre de séquence de décolmatage par contre-lavage. Des investigations supplémentaires permettront de mieux évaluer l'opportunité de cette technique pour la détection de *Cryptosporidium* en routine sachant que le type de système utilisé bien que peu encombrant, nécessite, pour être employé sur le site de prélèvement des échantillons, une alimentation électrique pour son fonctionnement.

V.1.2. - Méthodes de floculation :

Les procédés de floculation ne connaissent un essor dans l'application aux techniques de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau que depuis 1993 avec les travaux de Vesey *et al.*

Leur technique implique une précipitation au carbonate de calcium. Les cristaux de carbonate de calcium prennent dans leurs mailles les particules de taille voisine de celle de *Cryptosporidium*. Cette technique de floculation est préférée par ces auteurs qui considèrent notamment que les techniques de filtration plus anciennes, de nature particulièrement abrasive

sont responsables de lésions à la surface des oocystes et provoqueraient ainsi une perte d'épitopes nécessaires à la bonne reconnaissance par les anticorps utilisés lors de la coloration des oocystes par immunofluorescence (Vesey *et al.*, 1994).

Plusieurs protocoles de floculation ont été testés et notamment ceux utilisant les réactifs les plus usités dans l'industrie de l'eau comme le chlorure ferrique ou le sulfate d'aluminium.

Différents protocoles testés par Vesey et Slade, 1993(a), sont regroupés dans le tableau N°24.

Tableau N°24 : Concentration de *Cryptosporidium* dans l'eau par différents types d'agents floculants selon Vesey *et al.*, 1993(a).

Agents floculants	Protocoles floculation	Ajustement pH floculation	Pourcentage d'oocystes floculés	Avantages Inconvénients
Extrait de boeuf	Extrait boeuf 30 % (p/v) additionné à l'eau analysée à 1 concentration finale de 3 %	pH 3.5 avec HCl 1 M	< 10 %	Rendements trop faibles non différents du témoin
Lait écrémé en poudre	Poudre de lait écrémé (OXOÏD) à une concentration finale de 0,5 % (p/v)	pH 4,5 avec HCl 1M	< 10 %	
Sulfate de fer ferrique	Précipité d'hydroxyde métallique formé par addition d'une solution 1 M de sels afin d'obtenir une solution finale de 0,01 M du métal	pH 9 avec NaOH 1 M	< 10 %	
Sulfate de fer ferreux			< 10 %	
Sulfate d'aluminium			59 %	Bons rendements mais interférence au niveau de la coloration par immunofluorescence (bruit de fond)
Carbonate de calcium	10 ml* de $CaCl_2$ 1 mM additionné à l'eau, mélangé avec 10 ml* de $NaHCO_3$ 1 M	pH 10 avec NaOH	64 %	Bons rendements, bonne coloration par immunofluorescence
	10 ml* $CaCl_2$ puis agitation et addition de 10 ml* de Na_2CO_3 1 M	Sans ajustement		Précipité moins dense et plus instable que pour l'autre protocole.
Témoin	Sédimentation sans adjuvant	-	< 10 %	-

* *Volumes déterminés pour une floculation réalisée sur un échantillon d'un litre d'eau.*

D'après les résultats rapportés dans le tableau N°24, le protocole utilisant la floculation au carbonate de calcium, par addition à l'échantillon d'eau analysé de $CaCl_2$ et Na_2CO_3 suivi d'un ajustement à pH 10, permet d'obtenir les meilleurs rendements de récupération des oocystes ainsi qu'une qualité et une stabilité du concentrat intéressantes. Le protocole complet

permet de dissoudre le floc récupéré après une sédimentation de 4 heures à température ambiante par addition d'acide sulfamique (10%). Le concentrat est ensuite lavé et centrifugé avant coloration par immunofluorescence.

Ce protocole est recommandé par Vesey *et al.* pour l'analyse de tous les types d'eaux, de par sa simplicité et sa robustesse. Les rendements de récupération de cette méthode, définis pour des échantillons de 10 litres d'eaux de rivière, de distribution ou encore d'eau désionisée (pour une contamination initiale de 608 oocystes / 10 L), varient de 68 à 79%.

Ainsi, d'après ces auteurs, même si cette technique de floculation ne permet l'analyse que de faibles volumes d'échantillons comparés à la filtration sur cartouche, (10 à 20 L au lieu de 100 à 1000 L voir plus), son efficacité permet de conserver un même degré de sensibilité de la méthode. Dans tous les cas, il apparaît néanmoins que la floculation n'est pas toujours la technique la plus appropriée. Ainsi la détection de *Cryptosporidium*, par exemple dans des eaux potables filtrées présentant un très faible taux de contamination par *Cryptosporidium* , nécessite l'analyse d'échantillons de volumes trop importants (≈ 1000 L) pour être concentrés par floculation.

Bien que les travaux de Vesey *et al.* aient apporté de nombreuses informations sur la floculation adaptée à la recherche de *Cryptosporidium* dans l'eau, il faut remarquer que peu d'autres auteurs ont publié dans ce domaine.

Ainsi, une seule autre étude, réalisée par Wiandt, 1994, sur *Giardia* en eaux usées, a été rapportée. Ces travaux, focalisés sur la coagulation par utilisation de sulfate d'aluminium, ont montré que bien que la composition de l'eau et la charge en kystes influent sur les résultats, la coagulation se révèle une technique efficace.

Campbell *et al.*, 1994 se sont également intéressés aux techniques de coagulation préconisées par Vesey *et al.* mais ceci dans une optique différente. En effet, la détection du risque de contamination par *Cryptosporidium* passe non seulement par la détermination de la quantité d'oocystes présente dans les eaux mais également par l'évaluation du degré d'infectivité des parasites détectés et donc l'évaluation de leur viabilité. Les nouvelles techniques de détection élaborées doivent donc permettre de pouvoir évaluer ce paramètre. Malheureusement, Campbell *et al.*, 1994 ont montré que cette technique affectait la viabilité des oocystes isolés.

En effet, bien que très résistants aux stress environnementaux, les oocystes de *Cryptosporidium* sont sensibles aux valeurs extrêmes de pH. Or le protocole de coagulation de Vesey *et al.* incluant une exposition de 4 heures à pH 10 de la suspension d'oocystes, il est possible qu'une proportion d'oocystes ne puisse survivre à ce traitement. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que parmi les 74,8 % d'oocystes récupérés après le protocole de floculation, seuls 46,5 % des oocystes demeuraient viables par rapport à 75,5 % si seule une centrifugation était réalisée.

L'inadéquation du protocole de floculation pour la détermination de la viabilité des oocystes isolés ne permet pas pour autant d'exclure cette technique des méthodes préconisées pour la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau en routine car pour l'instant aucune technique disponible ne permet de contrôler les paramètres présence et viabilité simultanément.

V.2. - METHODES DE PURIFICATION :

Les techniques de concentration décrites au paragraphe précédent et surtout celles concernant la concentration de très grands volumes d'eaux comme certaines méthodes de filtration permettent de rassembler les oocystes présents dans l'eau mais également tous les débris de dimension supérieure ou égale à la porosité des filtres.

L'identification de *Cryptosporidium* parmi ces nombreux débris gênants se révèle dans la plupart des cas impossible et une étape de purification des oocystes apparaît indispensable.

La séparation des oocystes des débris se décompose en deux phases :

- la dissociation des oocystes des agrégats de sédiments ;
- l'isolement des oocystes des particules de sédiments.

➤ *Dissociation des agrégats* : La sonication est une technique de séparation quelquefois utilisée pour séparer mécaniquement les oocystes de ces agrégats (Musial *et al.*, 1987 ; Rose *et al.*, 1991).

L'utilisation de détergents peut également permettre non seulement d'éluer les oocystes du support de filtration utilisé pour la concentration (fibres de cartouche ou membrane) mais aussi lors des lavages de séparer les sédiments des oocystes.

Ainsi Musial *et al.*, 1987, ont émis l'hypothèse que l'utilisation de Tween 80 permettait de rompre les interactions hydrophobes intervenant notamment dans l'adhésion des oocystes aux filtres en polypropylène mais également dans l'adhésion avec les particules de sédiments.

L'utilisation de Sodium dodecyl sulfate (SDS) a également été préconisée par ces auteurs afin de neutraliser les charges éventuelles interagissant dans les interactions électrostatiques mises en jeu dans les phénomènes d'agrégation.

➤ *Isolement des oocystes des particules de sédiment* : Les méthodes de purification les plus utilisées sont des techniques de séparation chimique basées soient sur la différence de densité des débris et des oocystes mais également sur la différence de solubilité entre deux phases distinctes.

La plupart de ces techniques dérivent des méthodes de purification utilisées en coprologie médicale.

Le tableau N°25 regroupe quelques exemples de techniques utilisées aussi bien pour le diagnostic coprologique que pour la détection de *Cryptosporidium* dans les concentrats obtenus à partir d'échantillons d'eaux.

Tableau N°25 : Techniques de purification utilisées classiquement en coprologie médicale et adaptées à la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau.

	Réactifs	Méthode	Localisation des oocystes	Remarques	Références
Techniques Diphasiques	Formol Diethyl éther	Aliquot de selles + 50 - 80 ml eau formolée 10% + égal volume diéthyl éther. Agitation 30 sec Centrifugation 400g-5min	Oocystes récupérés dans le culot. Surnageant éliminé	Technique utilisée seule sans couplage à une autre étape	Ritchie et al, 1948
	Formol Ethyl acétate (FEA)	4 ml selles + 6ml formol 10% + 3 ml éthyl acétate Agitation 30 sec Centrifugation 500g-5min	Oocystes retrouvés dans les sédiments. Matières graisseuses et mucus concentrés dans la phase éthyl acétate.	Technique couplée à une flottation sur NaCl.	Weber *et al.*, 1992
Techniques de Flottation	Chlorure de sodium saturé	Dépôt 5 ml suspension aqueuse d'oocystes sur 5 ml solution de NaCl (d : 1.20) Centrifugation 500g-10min	Oocystes récupérés à l'interface des 2 phases NaCl et eau.	Technique précédée généralement d'une séparation sur FEA	Weber *et al.*, 1992
	Solution de saccharose - phénol de Sheather (500g saccharose + 9.7 ml phénol (1.29 g/ml), qsp 320 ml Eau désionisée)	Dépôt de 5 ml de suspension d'oocystes sur 10 ml de solution de Sheather. (Agitation ou non selon les protocoles) Centrifugation 1200g - 10 min	Oocystes récupérés à la surface du mélange ou à l'interface entre solution de Sheather et eau.	Technique très souvent utilisée sans adjonction d'étape préliminaire.	Sheather, 1923. Madore et al, 1987.
	Citrate de potassium 40%.	Dépôt d'un aliquot de selles sur une solution de citrate de potassium (d : 1.195) Centrifugation 650g - 1 min	Oocystes récupérés à l'interface entre la solution de citrate de potassium et eau	Technique utilisée couplée ou non à une étape préliminaire.	Ongerth et Stibbs, 1987.
	Gradient de saccharose discontinu	Dépôt d'un aliquot de selles sur un gradient de saccharose préformé par dépôt successif de trois couches de solution de densité respectives (haut en bas) 1.02, 1.09 et1.18. Centrifugation 1000g-5min	Oocystes récupérés dans la couche médiane du gradient (d : 1.09).	Technique utilisée couplée ou non à une étape préliminaire.	Woodmansee 1987. Smith *et al.*, 1989(c).

D'après le tableau N°25, il apparaît qu'un éventail de techniques assez important est disponible. Il faut remarquer que bien souvent afin d'obtenir une qualité de pureté optimum plusieurs de ces techniques chimiques peuvent être couplées et généralement associées à une étape préliminaire permettant de dissocier les agrégats gênants.

Les techniques de purification chimique les plus usitées à l'heure actuelle pour le traitement des concentrats sont les techniques de flottation sur solution de Sheather ou citrate de potassium (tableau N°23). Ces techniques comme toutes les techniques de flottation sont basées sur la différence de densité entre les oocystes, d : 1.05, et la densité de la solution de flottation utilisée > 1.05.

V.3. - METHODES D'IDENTIFICATION :

Quatre grands types de méthodes d'identification sont actuellement développés :

- La coloration des oocystes avant identification au microscope : les techniques de coloration simple et de coloration par immunofluorescence font partie de ces méthodes.
- Les techniques ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).
- Les techniques de cytométrie de flux permettant la reconnaissance des oocystes selon leur forme et leur aspect après coloration par immunofluorescence.
- Les techniques de détection par biologie moléculaire utilisant la PCR (Polymerase Chain Reaction) et permettant de détecter la présence d'ADN de *Cryptosporidium*.

V.3.1. - Méthodes de coloration :

Ces méthodes dérivent encore des techniques utilisées en coprologie médicale.

Comme le montre le tableau N° 26, regroupant la majorité des techniques développées pour la détection de *Cryptosporidium* dans les selles et dans l'eau, un éventail assez large de méthodes de coloration est proposé et deux grandes catégories de procédés peuvent être différenciées :

- les colorations simples
- les méthodes de coloration par immunofluorescence

➢ Les colorations simples :

Ce type de coloration regroupe les méthodes les plus anciennes et encore souvent utilisées en coprologie médicale pour leur faible coût et leur parfaite adaptabilité pour une analyse qualitative des échantillons.

Tableau N°26 : Caractéristiques et Avantages / inconvénients des différentes techniques de coloration mises au point pour l'identification de *Cryptosporidium* dans l'eau et dans les selles.

COLORATION	COMMENTAIRES	REFERENCES
Coloration de Giemsa	Oocystes facilement confondus avec les levures. Lecture délicate, peu de contraste entre le parasite et les autres particules fécales.	Janoff et Reller 1987. Tzipori *et al.*, 1980.
Coloration de Ziehl-Neelsen (ZN) modifiée par Henriksen	Réalisation simple et rapide, faible coût, conservation des préparations. Bon contraste entre cryptosporidies et levures. Oocystes colorés en rouge ou rose sur fond vert, différentiation vacuole claire et corps résiduel en périphérie. Risque de confusion avec *Isospora belli* ou autres coccidies également colorés en rouges. Lecture aisée et technique très fiable pour les matières fécales. Lecture délicate à partir de prélèvements d'eaux usées.	Henriksen et Pohlenz, 1981. Dumon *et al.*, 1990. Bonnin et Camerlynck, 1989.
Coloration de Heine	Réalisation simple, très rapide, peu coûteuse. Observation de la réfringence mais lecture rapide nécessaire car disparition de cette réfringence après 15 min. Oocystes incolores ou réfringents sur fond rouge, distinction corps résiduel interne. Levures colorées en rouge mais risque de confusion avec des microbulles d'air réfringentes. Inadaptée aux eaux usées. Microscope à contraste de phase.	Heine,1982
Coloration Baxby-Blundell. Safranine bleu de méthylène	Réalisation délicate, rapide et conservation des préparations. Oocystes colorés en orange-rose, sporozoïtes plus foncés. Risque de confusion avec d'autres éléments prenant la même teinte.	Baxby *et al.*, 1984
Coloration à l'auramine-phénol	Réalisation simple. Oocystes caractérisés par une fluorescence jaune vive sur fond rouge foncé. Fluorescence non spécifique importante avec des eaux usées. Microscope à fluorescence.	Casemore *et al.*, 1985
Immunofluorescence directe ou indirecte	Réalisation simple mais assez coûteuse. Oocystes caractérisés par une fluorescence vert-pomme, marquée sur le contour. Risque de confusion avec certaines algues autofluorescentes Lecture aisée pour les eaux et les matières fécales. Réduction de la fluorescence avec des eaux à forte charge organique ou floculées par l'hydroxyde d'aluminium. Microscope à épifluorescence.	Smith *et al.*, 1989 (c) Weber *et al.*, 1991

Le problème majeur relatif à la plupart de ces techniques est la coloration aspécifique des oocystes et les risques de confusions avec d'autres organismes de même taille que *Cryptosporidium* comme certaines levures ou spores de champignons par exemple (tableau N°26).

La technique de Ziehl - Neelsen modifiée est la méthode la plus souvent employée pour l'identification de *Cryptosporidium* dans les échantillons d'eaux concentrés, hormis bien sûr la coloration par immunofluorescence.

De nombreuse études ont permis d'évaluer les performances de cette technique comparée à d'autres modes de coloration simple ou encore aux techniques d'immunofluorescence. Des résultats très divergents ont été rapportés, mais dans l'ensemble cette technique apparaît comme la plus fiable parmi les techniques de coloration simple et permet une meilleure discrimination des oocystes (Smith *et al.*, 1989(c)), par contre l'immunofluoresence est souvent préférée pour l'examen d'échantillons d'eaux concentrés notamment de par sa réalisation plus rapide et une lecture plus aisée (Beauvais *et al.*, 1989 ; Mtambo *et al.*, 1992).

➵ La coloration par immunofluorescence :

Deux techniques de coloration par immunofluorescence ont été mises au point pour la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau :

➤ L'immunofluorescence directe : Cette technique permet l'identification de *Cryptosporidium* grâce à la fixation immunospécifique d'anticorps anti-*Cryptosporidium* marqués à l'isocyanate de fluoresceine, aux antigènes de surface de *Cryptosporidium*. Les oocystes marqués apparaissent comme des éléments arrondis caractérisés par une fluorescence vert-pomme lors de l'observation au microscope à épifluorescence. Cette technique s'avère assez coûteuse de par la nécessité de production d'anticorps spécifiques anti-*Cryptosporidium* marqués.

➤ L'immunofluorescence indirecte : Cette technique fonctionne sur le même principe que la technique précédente mais se déroule en deux étapes : tout d'abord la fixation d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux anti-*Cryptosporidium* de lapin ou de souris (IgG, IgM,..) sur les oocystes puis une incubation de ces oocystes en présence d'anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris (IgG ou IgM) marqués à l'isocyanate de fluorescéine. L'avantage de cette technique est l'utilisation d'anticorps marqués non spécifiques beaucoup moins chers, par contre le procédé en deux étapes est un peu plus long que la méthode directe mais toujours moins long et plus fiable que les techniques de coloration classiques.

Le support utilisé pour ces deux techniques est identique et il est constitué soit d'une lame à puits, soit d'un filtre membrane habituellement en acétate de cellulose.

L'utilisation de support membranaire pour l'analyse d'échantillons d'eau contaminée est

souvent préférée car elle permet l'examen de plus grandes fractions de concentrat et évite la perte de matériel souvent signalée lors des lavages dans le cas de dépôt sur lame.

Dans le cadre du développement des techniques de coloration par immunofluorescence, deux types d'anticorps anti-*Cryptosporidium* ont été testés : soit des anticorps polyclonaux soit des anticorps monoclonaux plus spécifiques de la membrane des oocystes.

➤ L'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-*Cryptosporidium* permet d'obtenir une fluorescence à la surface et occasionnellement au niveau de la structure interne des oocystes. Cependant une fluorescence du même type est également observée au niveau de différents oocystes de *Eimeria sp.* ou *Caryospora sp.* (Stibbs et Ongerth, 1986 ; Ortega-Mora *et al.*, 1992).

La non spécificité relative à la présence d'épitopes communs à la surface de ces différents types de microorganismes et l'utilisation d'anticorps polyclonaux capables de fixation sur un éventail de sites cibles assez large, sont responsables de ce manque de spécificité dans le marquage des oocystes.

➤ Le développement d'anticorps monoclonaux, plus spécifiquement dirigés contre des antigènes structuraux de la paroi des oocystes, a permis d'envisager l'obtention d'un marquage plus spécifique à *Cryptosporidium.*

Rose *et al.*, 1989, ont testé une série de trois anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium* dirigés respectivement contre trois antigènes spécifiques de la paroi des oocystes (Tableau N°27).

Tableau N°27 : Caractéristiques de trois anticorps monoclonaux utilisés pour la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau par immunofluorescence (Rose *et al.*, 1989).

Dénomination	Spécificité	Classe d'immunoglobuline	Type de fluorescence	Type d'anticorps	Réactivité sur		Références
					Cparvum	*Cbaileyi*	
C1B3	C. *parvum*	Ig G	Directe	Monoclonal	+	+	Sterling et Arrowood, 1986.
OW3	C. *parvum*	Ig M	Indirecte	Monoclonal	+	-	Sterling / Meridian diagnostic / USA
N	C. *parvum*	Ig G	Directe	Monoclonal	+	+	Northumbria Biochemical / UK

Les trois anticorps testés sur des échantillons d'eaux concentrés ont permis d'obtenir une fluorescence au niveau de la paroi des oocystes et l'observation distincte de la suture longitudinale pour 40 à 70% des oocystes détectés.

Un des problèmes rencontrés lors de la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau est la présence d'oocystes de diverses origines, humaines ou animales, qui ne sont pas discriminés lors de l'identification par immunofluorescence, du fait de la présence d'épitopes communs aux diverses espèces de *Cryptosporidium* à la surface des oocystes.

En effet l'espèce *C. parvum* est reconnue comme facteur de transmission de la cryptosporidiose chez l'homme et il est important que les anticorps utilisés lors des techniques d'immunofluorescence permettent de discriminer les oocystes de cette espèce précise sans démontrer une réactivité croisée avec d'autres espèces qui conduirait à la surestimation du nombre de parasites potentiellement infectieux pour l'homme dans l'échantillon analysé.

La réactivité des trois anticorps testés par Rose *et al.*, a été évaluée vis-à-vis de l'espèce *C. parvum* et *C. baileyi*. L'anticorps OW3 est spécifique de *C.parvum* et non de *C. baileyi* mais Darlington et Blackburn, 1988, ont montré une réactivité de cet anticorps vis-à-vis de *C. meleagridis*. Les anticorps C1B3 et N sont encore moins spécifiques avec une réactivité croisée démontrée vis-à-vis de *C. parvum* et *C. baileyi* (tableau N°26). De plus il a été remarqué que l'anticorps C1B3 réagissait avec des levures (Sterling et Arrowood, 1986) qui de par leur taille et leur aspect peuvent apparaître comme de faux positifs par rapport à *C. parvum.*

La présence de nombreuses algues, pollens, ... est relevée très communément dans les échantillons d'eaux soumis à analyse et il a été remarqué que ce type de microorganismes pouvait interférer avec la détection de l'organisme cible lors de l'utilisation des techniques d'immunofluorescence.

Rodgers *et al.*, 1995, ont réalisé une étude visant à déterminer les espèces d'algues pouvant interférer lors de l'identification de *Cryptosporidium* dans l'eau par immunofluorescence. Le kit de détection, par immunofluorescence indirecte, utilisé au cours de cette étude utilise des anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium* (IgM) de souris spécifiques d'antigènes de la paroi des oocystes. Parmi 45 espèces d'algues testées, 24 ont démontré la présence d'une fluorescence verte non spécifique lors de l'examen au microscope à épifluorescence. La plupart de ces algues étaient caractérisées par une fluorescence verte diffuse à l'exception d'une diatomée de l'espèce *Navicula minima* caractérisée par une forme et une taille voisine des oocystes de *Cryptosporidium* et démontrant une fluorescence vert pomme intense après coloration par immunofluorescence. Les auteurs ont démontré que les anticorps secondaires marqués (IgG anti-souris de chèvre marqué à l'isocyanate de fluoresceine) utilisés au cours du protocole d'immunofluorescence indirecte se fixaient spécifiquement sur des composants de cette algue. La saturation des sites responsables de cet artefact par l'application de sérum de chèvre sur l'échantillon avant l'utilisation du kit, a permis de supprimer la fluorescence de ces algues. Tighe, 1995 a ainsi démontré que l'application de sérum de chèvre permettait de bloquer la fixation aspécifique des anticorps utilisés lors des techniques d'immunofluorescence sur 95 à 98 % des organismes pouvant interférer lors de la détection de *Cryptosporidium* dans des échantillons d'eaux de surface.

V.3.2. - Techniques ELISA :

Ces techniques représentent une alternative aux techniques classiques de détection par immunofluorescence ne nécessitant pas de lecture au microscope.

De nombreuses études ont permis récemment de développer et d'évaluer les performances de cette technique utilisée principalement pour l'analyse qualitative en coprologie.(Robert *et al.*, 1990 ; Siddons *et al.*, 1992 ; Newman *et al.*, 1993(b) ; Rosenblatt et Sloan, 1993).

Cette technique dérive des procédés de détection par immunofluorescence indirecte. En effet elle est constituée de deux étapes mettant en jeu respectivement la fixation d'un anticorps primaire anti-*Cryptosporidium* puis d'un anticorps secondaire marqué, mais cette fois à la différence des méthodes d'immunofluorescence classiques, non pas à l'aide d'un agent fluorescent comme la fluorescéine mais à l'aide d'une enzyme du type peroxydase capable de dégrader un substrat spécifique en un sous produit coloré.

La détection des oocystes présents dans l'échantillon testé sera alors réalisée non pas par observation au microscope mais par détermination de la densité optique de l'échantillon reflétant l'activité de l'enzyme spécifiquement adsorbée aux oocystes.

Les inconvénients majeurs corrélés à l'utilisation de cette méthode sont tout d'abord ceux relatifs à la spécificité de l'anticorps primaire utilisé, de la même façon que pour les techniques classiques d'immunofluorescence (IF) (§ V.3.1.), mais également une sensibilité moins importante que pour ces techniques d'IF (93 à 94 %) (Newman *et al.*, 1993(b) ; Rosenblatt et Sloan, 1993).

Par contre si le temps de réalisation de la technique est un peu plus long, 135 min, que celui nécessaire pour l'immunofluorescence directe, 45 min, l'identification elle même est beaucoup plus rapide et ne nécessite pas l'intervention de personnel spécialisé recommandée pour les lectures au microscope.

Cette technique globalement plus simple que les techniques d'immunofluorescence classique offre une opportunité certaine pour l'analyse coprologique (recherche d'oocystes dans les selles), mais bien que quelques essais concluants aient été menés sur des échantillons environnementaux (Siddons *et al.*, 1992), elle ne peut être pour l'instant envisagée dans le cadre de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau du fait de son manque de sensibilité mais également de par les indications uniquement qualitatives qu'elle apporte sur la teneur en oocystes dans l'échantillon analysé (uniquement un ordre de grandeur et non une valeur précise déterminée).

V.3.3. - La cytométrie de flux :

La technique de cytométrie de flux a été développée notamment par Vesey *et al.*, depuis 1991, pour l'identification de *Cryptosporidium* dans les échantillons d'eaux concentrés.

Cette technique permet en association avec une coloration par immunofluorescence de discriminer les oocystes de *Cryptosporidium*, présents dans les échantillons, des débris gênants.

L'appareillage utilisé est constitué de deux détecteurs de dispersion de la lumière, donnant des indications respectivement sur la taille mais également sur la surface et les caractéristiques internes des particules, et de 4 détecteurs de fluorescence.

Un calibrage de l'appareil permet de sélectionner et de trier les particules correspondant à la morphologie, à la taille et également à la fluorescence spécifique des oocystes colorés par immunofluorescence.

Les premiers résultats obtenus n'ont pas permis de valider cette technique pour le dénombrement des oocystes sans une confirmation par examen au microscope des particules sélectionnées. En effet la discrimination obtenue par cytométrie de flux ne permet pas de distinguer d'une manière assez fiable les oocystes de certaines algues et débris de même aspect (Vesey *et al.*, 1991).

Par contre cette méthode de sélection qu'est la cytométrie de flux permet de récupérer en sortie de l'appareil une suspension de particules prétriées qui peut être observée au microscope à épifluorescence. Ainsi le couplage de la cytométrie de flux à un examen au microscope à épifluorescence a permis de faciliter les lectures, habituellement délicates du fait de la présence de nombreux débris gênants ici éliminés, et de rendre la détection beaucoup plus sensible, un volume d'échantillon beaucoup plus important pouvant être analysé. La durée de l'observation est également beaucoup moins importante du fait de la limpidité de l'échantillon analysé.

Le seul inconvénient relatif à l'utilisation de cette méthode de sélection est le coût très important de l'appareillage (Vesey *et al.*, 1993(b), 1994 ; Campbell *et al.*, 1993).

V.3.4. - La biologie moléculaire : PCR :

Récemment des méthodes génétiques basées sur la détection d'acide nucléique de *Cryptosporidium*, par hybridation et amplification (PCR), ont été développées (Laxer *et al.*, 1991 ; Johnson *et al.*, 1993 ; Webster *et al.*, 1993).

Johnson *et al.*, 1995 ont développé un protocole de PCR pour la détection rapide de *Cryptosporidium* dans l'eau par amplification d'un fragment de 435 paires de bases d'ADN codant pour la sous unité 18 s du RNA ribosomique des oocystes.

La méthode utilisée comporte un prétraitement des oocystes par congélation-décongélation et une étape de détection par hybridation avec une sonde chimiluminescente.

Le protocole défini au cours de cette étude a démontré une excellente spécificité, reproductibilité et sensibilité. Ainsi il est apparu que la sensibilité de la PCR variait de 1 à 200 oocystes dans des échantillons purifiés, suivant la source et l'âge de l'échantillon, mais il faut remarquer que cette sensibilité était réduite de 100 à 1000 fois lors d'analyse d'échantillons d'eaux contaminés. Cette perte de sensibilité serait due à l'activité inhibitrice de certains

composants des concentrats d'eaux analysés, sur la fixation du primer et sur l'activité enzymatique mises en jeu lors de la PCR (Webster *et al.*, 1993 ; Johnson *et al.*, 1995).

Une étape supplémentaire permettant une sélection des oocystes, par rapport aux débris, par cytométrie de flux ou immunocapture a permis de résoudre ce problème et de rétablir une excellente sensibilité de la méthode lors de l'analyse d'échantillons environnementaux.

La sonde génomique utilisée au cours de l'étude de Johnson *et al.*, est commune à quatre espèces de *Cryptosporidium* (*C. parvum*, *C. muris*, *C. baileyi*, *C. wrairi*) et ne permet donc pas de distinguer *C. parvum* des autres espèces de *Cryptosporidium* présentes.

Il est cependant possible en utilisant une sonde plus spécifique correspondant à un fragment d'ADN caractéristique d'une espèce donnée d'identifier une espèce particulière de *Cryptosporidium* et notamment *C. parvum* qui est responsable de la transmission de la maladie chez l'homme (Smith H.V., 1995). Les différentes espèces de *Cryptosporidium* présentes dans un échantillon peuvent également être discriminées grâce à l'utilisation de la PCR couplée à l'action d'endonucléases de restriction possédant des sites spécifiques de coupure pour chaque espèce. Ainsi Awad-El-Katiem *et al.*, 1994, ont obtenu un profil de restriction typique pour *C. parvum* grâce à l'utilisation de l'endonucléase de restriction *Mae* I : *Cryptosporidium* possédant un seul site de restriction de ce type à la différence de *C. muris* et *C. baileyi* qui en possèdent deux.

Globalement cette technique de PCR offre une opportunité très intéressante pour l'identification de *Cryptosporidium* dans les eaux de par sa sensibilité et sa spécificité, mais également parce qu'elle ne nécessite pas d'examen microscopique habituellement long et fastidieux.

Filkorn *et al.*, 1994, ont même envisagé d'utiliser cette technique couplée à un protocole de dékystement pour accéder à une technique de détection de la viabilité des oocystes. Ces travaux apparaissent comme très prometteurs mais des investigations plus poussées sont nécessaires pour confirmer les premiers résultats et améliorer notamment la sensibilité et la reproductibilité de cette méthode.

V.4. - VIABILITE :

La détection de la viabilité des oocystes isolés à partir d'échantillons d'eaux est un facteur très important pour évaluer le risque de contamination représenté.

Ces techniques ont été très développées dans le cadre de l'évaluation de la résistance de *Cryptosporidium* vis-à-vis de différents facteurs chimiques, notamment dans le cadre de l'évaluation de l'impact des procédés de désinfection, mais également vis-à-vis de facteurs environnementaux plus divers afin d'estimer la survie et le comportement des oocystes dans l'environnement. Le développement de ces techniques en routine n'est pour l'instant malheureusement pas très développé du fait de l'inadéquation des protocoles actuels pour la

détection de la viabilité sur les très faibles quantités d'oocystes retrouvées habituellement lors de l'analyse d'échantillons environnementaux mais également de par l'inadéquation de certaines techniques de détection qui altèrent bien souvent le potentiel infectieux des oocystes détectés.

Les différents protocoles jusqu'à présent développés sont :

- Les essais sur l'animal : permettant de déterminer le pouvoir infectant des oocystes inoculés *in vivo*.
- Le développement sur culture cellulaire : permettant d'évaluer le pouvoir infectant des oocystes inoculés *in vitro*.
- Les colorants fluorogéniques et le dékystement : permettant de tester l'intégrité biologique et structurale des oocystes.

V.4.1. - Le pouvoir infectant chez l'animal :

Le développement du modèle animal pour tester le pouvoir infectant des oocystes de *Cryptosporidium* a été mis en oeuvre pour pallier à de nombreux objectifs comme la détermination de la Dose minimale infectante (DMI), la mise au point d'essais thérapeutiques pour le traitement de la maladie, la détermination du cycle de vie et de la biologie du parasite et enfin la détermination de la viabilité des oocystes.

De nombreux travaux ont donc permis de définir plusieurs modèles animaux permettant de mettre en évidence le développement *in vivo* de *Cryptosporidium* (Tableau N°28).

Tableau N°28 : Induction expérimentale de l'infection et de la maladie par *Cryptosporidium* chez différents modèles animaux.

Modèle Animal	Références
Volailles (poulets, dindes, ...)	Tsai *et al.*, 1983 ; Itakura *et al.*, 1985 ; Goodwin et Brown, 1994 ; Naciri *et al.*, 1994.
Porc et Cobaye	Kennedy *et al.*, 1977 ; Tzipori *et al.*, 1981(a) ; Moon et Bemrick, 1981 ; Heine *et al.*, 1985 ; Angus *et al.*, 1985 ; Chrisp *et al.*, 1990.
Souris	Current et Reese, 1986 ; Harp *et al.*, 1992 ; Rasmussen et Healey, 1992 ; Kwa *et al.*, 1993 ; Finch *et al.*, 1993
Rats	Lemeteil *et al.*, 1993 ; Rasmussen *et al.*, 1993.
Primates	Miller *et al.*, 1990
Lapins	Peeters *et al.*, 1986
Moutons	Tzipori *et al.*, 1981(b) ; Anderson, 1982 ; Blewett *et al.*, 1993.
Chèvres	Naciri *et al.*, 1984
Veaux	Moon et Bemrick, 1981 ; Tzipori *et al.*, 1983 ; Fayer *et al.*, 1985 ; Pozio *et al.*, 1992 ; Xiao et Herd, 1994.

Les rats et les souris correspondent au modèle le plus accessible pour l'expérimentation au laboratoire.

De nombreuses études cliniques ont permis de mettre en évidence une prédisposition plus importante à l'infection par *Cryptosporidium* des sujets immunodéprimés et des nouveaux nés par rapport aux sujets immunocompétents. Les modèles les plus développés pour le développement *in vivo* du parasite ont donc utilisé des souriceaux nouveaux nés immunodéficients.

Les doses infectantes à 50% (ID 50 : doses nécessaires pour infecter 50% de la population) pour ce type de modèle ont été évaluées à : 60 oocystes chez des souriceaux BALB/c (Korich *et al.*, 1990), entre 100 et 500 oocystes pour des souriceaux Swiss-Webster (Ernest *et al.*, 1986) et 79 oocystes chez des souriceaux CD-1 (Finch *et al.*, 1993(a)). Les souriceaux BALB/c et CD1 ont donc servi de modèle pour la plupart des investigations relatives à la mise au point de techniques de détection de la viabilité des oocystes (Kwa *et al.*, 1993 ; Finch *et al.*, 1993(a)).

Les protocoles utilisés, pour la détermination de la viabilité des oocystes par infectivité chez l'animal, consistent à purifier la suspension d'oocystes à tester par les techniques classiques (Flottation sur saccharose, Sheather, ...) puis à inoculer une quantité prédéfinie d'oocystes (Supérieure ou égale à la Dose minimale infectante prédéterminée pour le modèle animal utilisé) grâce à une sonde gastrique et enfin à récupérer les fèces animaux chaque jour sur une période prédéfinie suivant la cinétique d'excrétion du modèle choisi. Ainsi Kwa *et al.*, 1993, ont relevé des périodes de latence de l'excrétion allant de 32 à 88 jours suivant la quantité d'oocystes initialement inoculée soit respectivement pour un inoculum de 1000 à 1 oocystes.

Le développement des oocystes peut être également non pas détecté grâce à l'examen des selles produites par l'animal inoculé mais par examen direct ou indirect de l'intestin des souriceaux. L'avantage de cette technique est la réduction de la période d'incubation nécessaire pour obtenir les résultats.

Ainsi Finch *et al.*, 1993, travaillant sur un modèle de souriceaux CD-1, sacrifient les animaux 7 jours après inoculation des oocystes ; les intestins sont alors récupérés et après purification (broyage, flottation sur Sheather et lavages) les oocystes sont dénombrés au microscope. Fayer, 1995, utilise également une technique de récupération de l'intestin sur des souriceaux BALB/c contaminés après 96 h d'incubation , mais par contre les oocystes ne sont pas extraits des organes prélevés mais après coloration de sections d'intestins l'examen direct des cellules épithéliales permet de déterminer la présence d'un développement ou non du parasite.

L'ensemble de ces protocoles a été très utilisé pour la détermination de la résistance du parasite à certains facteurs physico-chimiques, mais il faut remarquer que l'utilisation de

l'expérimentation animale implique un investissement assez coûteux et difficilement envisageable pour des diagnostics de viabilité en routine. De plus, en l'absence de données permettant de corréler la réponse obtenue chez l'homme et chez l'animal, les résultats obtenus ne permettent pas de prédire exactement les risques encourus pour l'homme lors d'une exposition à des oocystes ayant donné une réponse chez le modèle animal (Finch *et al.*, 1993).

V.4.2. - Le développement sur culture cellulaire :

Le développement de *Cryptosporidium* sur culture cellulaire a été prôné récemment dans le cadre d'essais thérapeutiques et de travaux de recherche sur la biologie du parasite. L'utilisation de ce type de modèle *in vitro* a également été envisagée pour tester la viabilité des oocystes de par l'investissement beaucoup moins important que nécessitait ce type de méthode face à l'expérimentation animale.

Les protocoles d'expérimentation se déroulent en deux étapes importantes :
- tout d'abord le dékystement *in vitro* des oocystes (voir § V.4.3.) et la récupération des sporozoïtes ;
- ensuite l'ensemencement d'une lignée cellulaire choisie en culture *in vitro* par ces sporozoïtes.

Le développement de *Cryptosporidium* in vitro a été étudié sur différents types de modèle cellulaire :

• Cellules humaines foetales de poumons (HFL) • Cellules de rein de poulet (PCK) • Cellules de rein de porc (PK10)	Current et Haynes 1984
• Primo cultures d'hépatocytes humains ou de rats	Datry *et al.*, 1989
• Lignée cellulaire issue de cancer colique humain CACO2	Buraud *et al.*, 1991
• Cellules de rein de chien Madin-Darby (MDCK)	Flanigan *et al.*, 1991
• Cellules épithéliales d'intestin humain (HT 29)	Aij *et al.*, 1991

Les travaux de recherche conduits sur les thérapeutiques anti-*Cryptosporidium* et sur la biologie du parasite ont amené à développer des modèles d'infection *in vitro* se rapprochant le plus possible des conditions de développement *in vivo* du parasite. Or, le développement de *Cryptosporidium in vivo* est généralement localisé dans les cellules épithéliales de l'intestin de nombreux animaux et de l'homme bien que plusieurs cas d'infections respiratoires et biliaires à

Cryptosporidium montrent que ce protozoaire n'est pas toujours confiné au tractus digestif.

Toutes les cellules expérimentées acquièrent en culture une différenciation de type entérocytaire (caractéristique de l'intestin) ou tout au moins une bordure en brosse (présence de microvillosités, cf. figure N°54) et parmi les plus décrites notamment les lignées cellulaires d'adénocarcinomes humaines CACO2 (Datry *et al.*, 1989 ; Buraud *et al.*, 1991), les lignées clonées d'adénocarcinome de colon humain HT29, 74 (Aij *et al.*, 1991 ; Flanigan *et al.*, 1991), les lignées cellulaires de rein de chien Madin-Darby MDCK (Gut *et al.*, 1991 ; Rosales *et al.*, 1993) et plus anciennement les cellules foetales de poumons humains HFL (Current et Haynes, 1984).

Ces trois lignées sont caractérisées par leur polarisation et leur bordure en brosse conférant aux cellules les propriétés caractéristiques des microvillosités des cellules entérocytaires particulièrement importantes lors de l'invasion et le développement de *Cryptosporidium in vivo* (voir cycle de développement § I.2.2.).

Généralement, si la propagation et la multiplication de *C. parvum* à long-terme n'ont pu être observées, le développement intracellulaire de *Cryptosporidium* a pu être mis en évidence en microscopie électronique. Par contre, les stades asexués et sexués ont pu être décelés sur cellules MDCK, HFL et CACO2, mais non sur cellules HT 29,74.

Dans tous les cas, il a également été obtenu le développement complet de *Cryptosporidium* mais avec production d'un nombre d'oocystes infectieux entiers en fin de cycle plutôt faible. Il faut également remarquer que les oocystes obtenus en fin de cycle possédaient tous une paroi épaisse ("thick walled oocysts") caractéristique des oocystes résistants dans l'environnement et qu'aucun oocyste responsable du cycle d'autoinfestation ("thin walled oocysts") n'a pu être détecté. Aucun cycle de développement exactement identique a celui observé *in vivo* n'a donc pu être obtenu (cf. §I.2.3., figure N°2).

Il est à souligner, que les premiers oocystes matures ont été obtenus en général, 72 heures après infection, avec un pic d'excrétion d'oocystes infectieux après 5 à 7 jours de développement. De plus la viabilité des oocystes a été testée et validée *in vivo* sur souris (Current et Haynes, 1984) et sur culture cellulaire (obtention de nouveaux cycles) (Datry *et al.*, 1989).

Malheureusement les rendements et la sensibilité assez faibles de cette technique *in vitro* n'ont pas permis pour l'instant d'aboutir à un modèle permettant de tester la viabilité des oocystes d'une façon performante.

V.4.3. - Les colorants fluorogéniques et le dékystement :

Ces deux méthodes ne permettent pas de suivre le développement d'oocystes potentiellement infectieux mais d'évaluer la prédisposition biologique de ces oocystes à pouvoir

initier un cycle d'infection.

Elles permettent donc de vérifier l'intégrité des oocystes.

➤ ***Le dékystement :***

Le dékystement des oocystes est une des phases les plus importante du cycle de vie des oocystes. Il permet le relarguage, par ouverture de la suture longitudinale, des sporozoïtes infectieux qui vont envahir les cellules épithéliales de l'intestin et initier le développement intracellulaire du parasite.

Le dékystement des oocystes peut se produire naturellement à deux niveaux :

❑ Dans l'environnement : le dékystement est alors induit par des facteurs drastiques (mécaniquement ou chimiquement corrosifs) provoquant la rupture de l'oocyste et la perte du caractère infectieux en l'absence de cellules à envahir. Ce dékystement provoque alors la mort du parasite.

❑ *In vivo*, dans le tractus intestinal : le dékystement sera alors provoqué naturellement et aboutira à l'initiation du cycle d'infection.

Les travaux de recherche sur le dékystement de coccidies ont commencé dès les années 60 avec une étude sur *Eimeria spp.* (Jackson , 1962 ; Nyberg et Hammond, 1964).

Depuis cette date, de nombreuses études ont permis de développer les protocoles de dékystement des oocystes *in vitro* pour d'autres espèces et notamment *Giardia* et *Cryptosporidium*.

Les objectifs principaux de ces études étaient d'une part l'initiation du cycle de développement de *Cryptosporidium* pour la culture *in vitro* mais également le développement de techniques d'évaluation de la viabilité des oocystes.

En effet, il s'est avéré que les oocystes capables de s'excyster *in vitro*, dans les conditions requises pour l'initiation du cycle *in vivo*, peuvent être considérés comme potentiellement infectieux et donc viables.

De nombreuses études ont donc été menées afin de définir le protocole optimal pour obtenir *in vitro* les conditions réunies pour l'initiation du dékystement naturel du parasite *in vivo*.

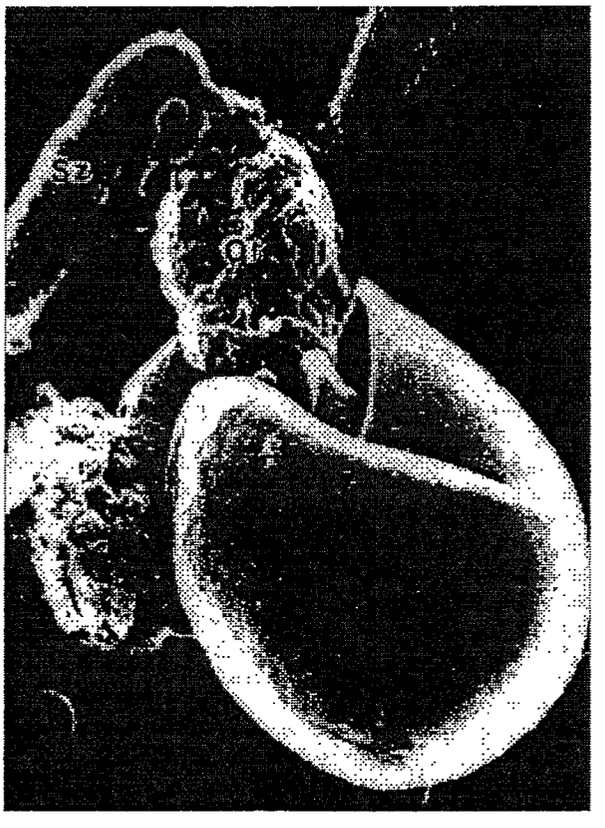
➵ *Développement des protocoles de dékystement in vitro :*

Les oocystes de nombreuses espèces de coccidies ont besoin pour être excystés de l'intervention *in vivo* de trypsine, sels biliaires (taurocholate de sodium) et de la température

corporelle de mammifères qui est voisine de 37°C (Speer et Reducker, 1985). Dans cette optique, beaucoup des travaux ont été réalisés en vue de déterminer les conditions exactes et optimales favorables au dékystement de *Cryptosporidium in vitro.*

De nombreux examens au microscope électronique de la structure des oocystes de *Cryptosporidium* ont permis de mettre en évidence le processus de dékystement et plus particulièrement la dissolution de la suture longitudinale de l'oocyste lors du dékystement permettant la libération des 4 sporozoïtes infectieux (Figure N° 17).

Figure N°17 : Dékystement d'un oocyste de *Cryptosporidium* (Reducker *et al.*, 1985(b))
(Sporozoïte excysté (Sz), résiduum de l'oocyste (Or) Microscopie électronique x 15 750)



Il est apparu que le processus de dékystement de *Cryptosporidium* est tel que, à température corporelle de mammifères (37°C), le taurocholate de sodium et la trypsine sont les facteurs majeurs stimulant le dékystement des oocystes *in vitro.* Il apparaît également que contrairement à ce que l'on peut observer chez *Eimeria* spp., une préincubation des oocystes de *Cryptosporidium parvum* dans une solution réductrice et sous atmosphère enrichie en 5% de CO_2 utilisée habituellement pour altérer la perméabilité de la paroi, n'est pas nécessaire (Current, 1987), (Speer et Reducker, 1985). Reducker *et al.*, en 1985, ont pourtant montré qu'un prétraitement des oocystes par l'hypochlorite de sodium altérait la perméabilité mais surtout la structure de la paroi des oocystes (§ IV.4., figure N°16).

D'après Robertson *et al.*,1993, il apparaît que le protocole de base nécessaire au dékystement doit impliquer un traitement par des sels biliaires sous une température de 37°C ce qui est d'ailleurs tout à fait en accord avec les recommandations rapportées habituellement dans la littérature (Reducker *et al.*, 1985, Fayer et Leek, 1984). Une étape de pré-incubation pourrait être néanmoins incorporée dans le protocole : ainsi, toujours selon Robertson *et al.* une préincubation de 1 heure dans une solution acidifiée d'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) est recommandée avec addition éventuelle de trypsine si un degré important de motilité des sporozoïtes est nécessaire, notamment si un développement du parasite sur culture cellulaire est envisagé. En effet, la motilité des sporozoïtes est un facteur important lors de l'infection de cellules en culture, car elle influe beaucoup sur la pénétration des sporozoïtes à l'intérieur des cellules.

Speer et Reducker (1985) ont d'ailleurs également préconisé l'emploi de fluide de dékystement contenant trypsine et taurocholate de sodium du fait de ses qualités relatives à la prolongation de l'intégrité structurale des sporozoïtes après dékystement.

Par ailleurs, ce mode de préincubation dans de la trypsine se montrerait plus proche des conditions réelles de dékystement *in vivo*, bien que l'utilisation substitutive d'hypochlorite de sodium serait plus rapide (5-10 minutes de contact dans la glace) et permettrait une stérilisation concomitante de la suspension sans pour autant affecter la viabilité des oocystes (Reducker *et al.*, 1985).

Par contre un prétraitement des oocystes par de la salive ne se révèle pas nécessaire pour le processus de dékystement et il semblerait même que des enzymes inhibiteurs présents dans la salive seraient capables de prévenir la dissolution de la paroi de l'oocyste et donc de réduire la perméabilité et le dékystement des oocystes (Fayer et Leek, 1984 ; Robertson *et al.*, 1993).

Pour obtenir un taux maximal de dékystement, Robertson *et al.*, 1993, ont montré qu'il est nécessaire de laisser agir 4 heures le protocole de base (sels biliaires) mais si l'objectif est l'obtention d'un nombre important de sporozoïtes infectieux, le processus de dékystement doit être stoppé au bout de 30 minutes.

Afin d'apprécier l'influence de certains paramètres sur le dékystement des oocystes de *Cryptosporidium parvum* , des études ont été réalisées sur les effets de la température, de la présence d'eau du robinet et de solution de désenkystements (trypsine + taurocholate de sodium), (Speer et Reducker, 1985).

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les sporozoïtes de *C. parvum* se libèrent des jeunes oocystes seulement en présence de fluide de désenkystement à 37°C et les vieux oocystes se détériorent de plus en plus avec l'âge et leur désenkystement est observé aussi bien en solution de trypsine + taurocholate de sodium qu'en présence d'eau du robinet à 22°C ou 37°C mais il est à remarquer que les sporozoïtes relargués en eau du robinet se désintégraient peu après leur sortie des oocystes.

En revanche, il faut remarquer que des oocystes d'âge intermédiaire (32 semaines) montrent une certaine diminution du taux de dékystement (pourcentage élevé d'oocystes non excystés à 37°C en présence de fluide de dékystement) (Reducker *et al.*, 1985(a) ; Speer et Reducker, 1985).

➸ *Evaluation de la viabilité à partir du dékystement des oocystes :*

Afin d'évaluer le degré de viabilité des oocystes, le pourcentage d'oocystes excystés ,représentant les oocystes potentiellement infectieux, est déterminé.

Un dénombrement des oocystes est réalisé sur un aliquot de la suspension avant et après la mise en oeuvre du protocole de dékystement. La proportion d'oocystes totalement excystés (fantômes), partiellement excystés et non excystés est déterminée à partir de l'examen au microscope (Normarski). Pour chaque dénombrement, 100 oocystes sont examinés.

Le pourcentage de dékystement est déterminé à partir de l'équation (a) :

$$\text{Equation (a) : } \%E = \frac{\textit{Nombre}\ \text{fantômes} + \text{Nombre oocystes partiellement excystés}}{\textit{Nombre}\ \text{total d' oocystes dénombrés}} \times 100$$

Le nombre d'oocystes totalement excystés (fantômes) utilisé dans cette équation correspond au nombre de fantômes post dékystement dont est soustrait le nombre de fantômes dénombrés dans la même suspension avant la mise en oeuvre du protocole de dékystement.

Le pourcentage de dékystement (% E) ainsi déterminé correspond au pourcentage d'oocystes viables dans l'échantillon examiné.

L'étape de prétraitement dans HBSS acidifié préconisée dans le protocole de dékystement mis au point par Robertson et al, 1993, a permis de mettre en évidence la présence d'oocystes potentiellement viables mais qui ne réagissaient pas au protocole de dékystement. L'étape de préincubation a permis de rendre ces oocystes, particulièrement résistants, compatibles au dékystement.

Il est important de souligner que les résultats obtenus grâce aux tests d'infectivité sur animal ont pu être corrélés à l'évaluation de la viabilité par dékystement *in vitro*.

Ainsi Blewett, 1988, a montré une corrélation entre le dékystement *in vitro* et l'infection de souris par un inoculum important d'oocystes de *Cryptosporidium*.(10^5 oocystes / souris)

Le dékystement *in vitro* offre donc une opportunité dans le cadre de l'évaluation de la viabilité des oocystes puisqu'il est adaptable à des suspensions d'oocystes très peu concentrées contrairement à l'expérimentation animale ; il peut donc être employé facilement pour l'examen d'échantillons d'eaux. Il ne nécessite pas non plus un investissement très coûteux. Mais par contre, l'examen au microscope des structures excystées et non excystées nécessite un personnel spécialement qualifié.

➤ *Les colorants fluorogéniques* :

Campbell et al, 1992, ont testés une série de 27 colorants fluorogéniques afin de déterminer si l'inclusion ou l'exclusion de ceux-ci pouvait être corrélée à la viabilité des oocystes pour l'instant décrite par dékystement *in vitro*.

Parmi ces colorants, l'utilisation simultanée de 4',6 diamino-2-phénylindole (DAPI) et d'iodure de propidium (PI) a permis d'obtenir des résultats intéressants.

➢ *Principe de la coloration :*

❑ Le DAPI est un colorant de l'ADN . Il permet lors de sa fixation sur l'ADN une augmentation de 20 fois sa fluorescence initiale.

Ce colorant est capable de passer au travers des membranes intactes ; il peut donc être incorporé à l'ADN de structures intègres.

Le DAPI permettra donc de caractériser les oocystes viables et plus particulièrement les sporozoïtes viables.

❑ Le PI est un colorant fluorogénique qui ne peut quant à lui passer la barrière membranaire lorsqu'elle est intacte.

Les oocystes et les sporozoïtes colorés par PI sont donc caractérisés par une membrane détruite ou altérée et sont donc considérés comme non viables. Il a été ainsi constaté que les sporozoïtes motiles n'incluaient jamais le PI.

Les oocystes détruits et ayant perdu leur contenu (fantômes d'oocystes) ne sont donc colorés ni par le DAPI, ni par le PI et sont considérés comme morts.

➢ *Protocole de coloration :*

Les suspensions d'oocystes soumises au test de viabilité par inclusion - exclusion du DAPI et du PI sont purifiées avant coloration par un protocole classique utilisant généralement une flottation sur sucrose suivie d'une série de lavages.

Un aliquot de cette suspension est ensuite incubé en présence de DAPI et de PI à 37°C pendant 2 h dans une solution de HBSS (Hanks balanced salt solution).

Les oocystes ainsi colorés sont ensuite lavés avant d'être observés au microscope à épifluorescence.

Le microscope est équipé d'un filtre U.V. (350 nm excitation - 450 nm émission) pour l'observation de la coloration par le DAPI et d'un filtre vert (500 nm excitation - 630 nm émission) pour le PI.

Le dénombrement des oocystes viables et non viables est obtenu par quantification de la proportion d'oocystes vides (fantômes), PI positif (PI^+), DAPI positif PI négatif ($DAPI^+$ PI^-), DAPI négatif PI négatif ($DAPI^-$ PI^-) parmi un nombre total de 100 oocystes observés (Tableau N°29).

Les oocystes vides sont mis en évidence par observation au microscope à contraste d'interférence différentiel (DIC Normaski).

Tableau N°29 : Corrélation de la viabilité et de la coloration par DAPI et PI des oocystes.

Type d'oocystes	Visualisation du contenu par microscope Normarski	Coloration	Inclusion de		Viabilité
			PI	DAPI	
Fantôme	non	aucune	non	non	mort
PI^+	oui	rouge sous filtre vert bleu sous filtre UV	oui	oui	mort
$DAPI^+$ PI^-	oui	bleu sous filtre UV	non	oui	viable
$DAPI^-$ PI^-	oui	aucune	non	non	viable après préincubation

Les oocystes ayant inclus PI (PI^+), sont caractérisés par une fluorescence rouge vive sous filtre vert, et l'intensité de cette fluorescence varie en certains points : avec une coloration plus intense correspondant à la localisation du noyau des sporozoïtes et une coloration plus diffuse au niveau de l'oocyste lui même.

Les oocystes ayant inclu uniquement le DAPI ($DAPI^+$ PI^-) ne sont pas colorés en rouge et présentent sous filtre U.V. une fluorescence distincte bleu ciel au niveau du noyau des sporozoïtes.

Les oocystes ne présentant aucune fluorescence spécifique sous filtre UV ou filtre vert et ne représentant pas une structure vide (fantôme) sont considérés comme $DAPI^-$ PI^-. Ces oocystes ont été caractérisés comme des oocystes non perméables au DAPI et non altérés. Une étape de préincubation dans du HBSS acidifié pendant 1 heure avant coloration a permis de rendre compatibles ces oocystes au passage du DAPI. Les oocystes tout d'abord non colorés laissent apparaître alors une fluorescence bleu spécifique au niveau des noyaux sous filtre UV et sont donc considérés comme $DAPI^+$ PI^- soit viables.

L'explication de ce phénomène a été donnée par Campbell et al, 1992. Il est apparu que la perméabilité de la paroi des oocystes variait selon les isolats. En effet il a été constaté que le degré de perméabilité était différent selon la capacité des oocystes à résister aux stress

environnementaux. L'imperméabilité de certains oocystes leur conférerait donc une certaine protection vis-à-vis de ces stress. Ainsi Robertson et al, 1992, ont montré que l'insertion de certains mucopolysaccharides (retrouvés dans les selles) dans la paroi des oocystes pourrait diminuer leur perméabilité. Ces composants pourraient conférer une meilleure résistance des oocystes aux stress environnementaux mais leur propriété serait facilement éliminée lors du processus digestif permettant le dékystement et le développement du cycle infectieux. L'étape de préincubation permettrait donc de s'approcher des conditions obtenues lors du processus digestif et rendrait donc les oocystes compatibles à la coloration par stimulation de leur perméabilité.

La technique utilisant l'inclusion - exclusion de DAPI et PI apparaît globalement comme une excellente technique, reproductible et facilement réalisable.

De plus, Campbell et al, 1992, ont pu établir une corrélation entre les tests d'évaluation de la viabilité par dékystement *in vitro* et par inclusion - exclusion de DAPI et PI avec un coefficient de corrélation de 0.997. Cette technique apparaît donc comme très fiable et présente l'avantage de permettre une observation au microscope beaucoup moins délicate que pour la technique de dékystement *in vitro*.

Matériels et Méthodes

MATERIELS ET METHODES

Les protocoles définis ici sont soit communs à plusieurs chapitres différents de l'étude expérimentale, soit représentent des protocoles généraux servant de base à l'étude méthodologique exploitée dans un chapitre propre.

I - CRYPTOSPORIDIUM :

I.1.- SOURCE DE PARASITES:

Les oocystes de *Cryptosporidium* ont été isolés à partir de selles de veaux contaminés.

Ces selles ont été fournies par le laboratoire du Dr Naciri de l'INRA de Tours.

Elles sont obtenues grâce à l'inoculation de *Cryptosporidium* à de jeunes veaux qui vont développer l'infection. Les selles ainsi récoltées sont en général liquides, ce qui témoigne bien de la symptomatologie de l'animal infecté.

Ces selles sont conservées en présence de 2.5 % de dichromate de potassium pendant plusieurs mois en chambre froide à 4°C.

Les oocystes récupérés à partir de ces selles sont de l'espèce *Cryptosporidium parvum* responsable de l'infection chez l'homme et le bétail.

I.2.- PURIFICATION DES OOCYSTES A PARTIR DE SELLES:

Les protocoles de purification décrits ici ont fait l'objet d'une étude méthodologique présentée dans le chapitre A.

Au cours de l'étude expérimentale les protocoles de purification employés utiliseront soit une séquence regroupant successivement la séparation sur formol éthyl acétate et la flottation sur chlorure de sodium (Figure N°18), soit une séquence regroupant ces deux étapes suivies d'une séparation finale sur gradient de saccharose (Figure N°19).

I.2.1.- Séparation sur formol - éthyl acétate (FEA):

Des échantillons de 4 ml de selles sont prélevés dans des tubes en polypropylène de 15 ml, 6 ml de formol à 10 % et 3 ml d'éthyl acétate (Rectapur) sont ajoutés dans chaque tube.

Les tubes sont ensuite agités 30 secondes à l'aide d'un vortex puis une centrifugation à 500 g pendant 5 minutes est réalisée.

Après centrifugation 3 phases distinctes sont obtenues (de haut en bas) : une phase contenant l'éthyl acétate et un "gâteau" de débris liposolubles, une phase contenant le formol, et une dernière phase contenant les sédiments hydrophiles regroupant les oocystes de *Cryptosporidium* (Figure N°18).

Les deux phases supérieures sont éliminées par aspiration. Le passage d'un écouvillon sur les parois du tube permet de les débarasser des débris subsistants.

Le culot est ensuite lavé par addition de 14 ml qsp d'eau désionisée et centrifugation à 500 g, 15 min.

I.2.2.- Flottation sur chlorure de sodium :

Le culot d'oocystes obtenu après l'étape de séparation sur formol - éthyl acétate est récupéré et remis en suspension dans 5 ml d'eau désionisée. Cette suspension est déposée délicatement sur une solution de chlorure de sodium saturé d'une densité de 1.20.

Une centrifugation à 700 g pendant 10 min est ensuite réalisée.

Trois phases distinctes sont obtenues (de haut en bas) : une phase constituée de la suspension aqueuse contenant les oocystes de *Cryptosporidium* et de petits débris d'une densité inférieure ou égale à 1.20, une phase constituée de la solution de NaCl et enfin le sédiment correspondant à la majorité des débris plus denses (Figure N°18).

Les oocystes de *Cryptosporidium* sont localisés plus particulièrement à l'interface entre la suspension aqueuse et la solution de NaCl.

La phase supérieure, l'interface et 0.5 à 1 ml de la partie supérieure de la solution de NaCl sont récupérés et lavés dans 14 ml qsp d'eau désionisée. Une centrifugation à 500 g pendant 15 min est ensuite réalisée. Le culot ensuite récupéré, subit ensuite un nouveau lavage dans les mêmes conditions afin de s'assurer de l'élimination de toutes traces de NaCl.

I.2.3.- Séparation sur gradient de saccharose :

Un gradient est préformé par dépôt dans des tubes à centrifuger de 15 ml, de 3 ml de saccharose de densité 1.30, puis délicatement du même volume successivement d'une solution de saccharose de densité 1.10 puis 1.04.

Le culot obtenu après l'étape de flottation est remis en suspension dans 1 ml qsp d'eau désionisée puis il est déposé délicatement à la surface du gradient.

Une centrifugation à 2500 g pendant 30 min est réalisée. Cinq phases distinctes sont alors obtenues (Figure N°19) : Une première phase de 4 ml contenant la solution de densité 1.04, une phase contenant la solution de saccharose de densité 1.10, un "gâteau" de débris de la

Figure N°18 : Protocole de purification associant successivement une séparation sur formol - éthyl acétate et une flottation sur chlorure de sodium.

fractions de 4 ml de selles
dans tubes 15 ml

↓

addition 6ml Formol 10%
+
3 ml Ethyl Acétate

↓

Agitation vortex 30 sec

↓ *centrifugation 500 g, 5min*

Récupération culot

↓

Lavage H_2O désionisée / centrifugation 500 g, 15 min

↓

Remise en suspension culot
dans 5 ml H_2O désionisée qsp

↓

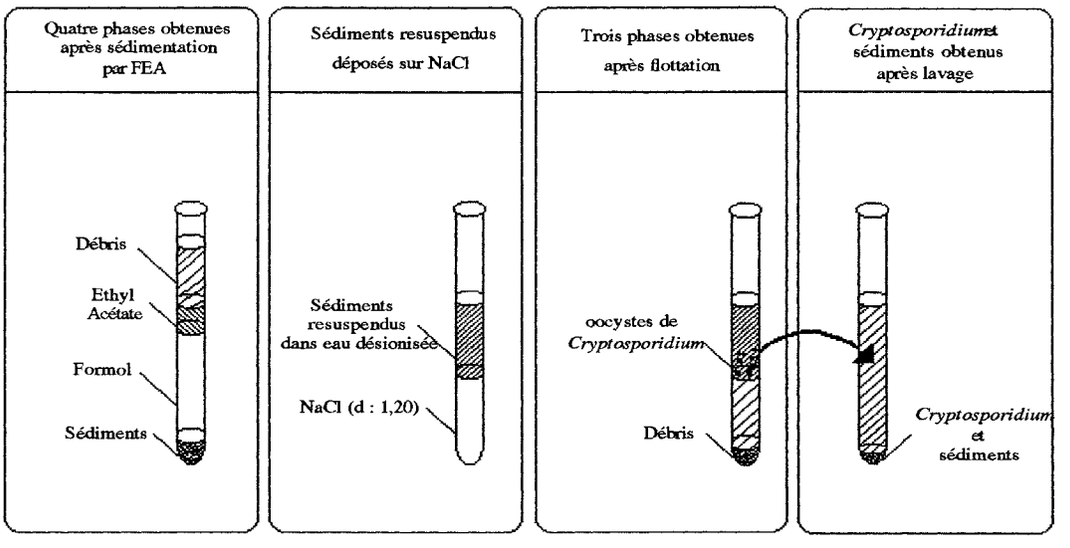
Dépôt de chaque suspension sur
5 ml de solution de NaCl saturé

↓ *centrifugation 700 g, 10min*

Récupération surnageant

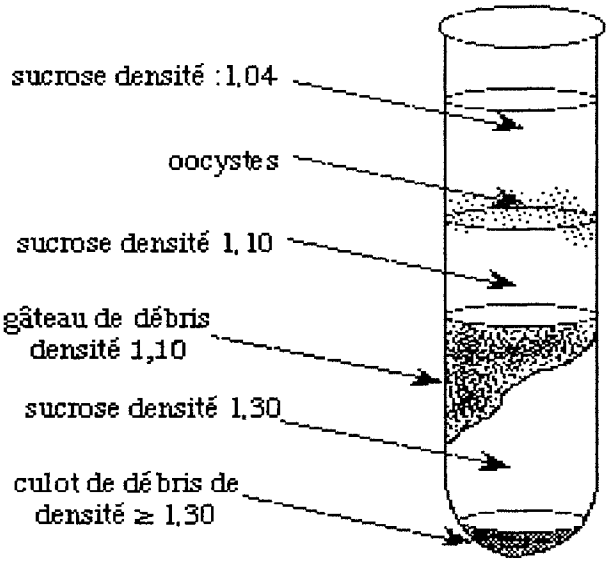
↓

(Lavage H_2O désionisée / centrifugation 500 g, 15 min) X 2



même densité, la phase contenant la solution de densité 1.30 et enfin le culot de débris, de densité la plus élevée, ayant sédimenté au fond du tube.

Figure N° 19 : Séparation des oocystes sur gradient de sucrose



Les oocystes de *Cryptosporidium* possédant une densité de 1.05 sont récupérés à l'interface des phases de densité 1.04 et 1.10. Ainsi les 6 ml supérieurs sont prélevés et lavés 2 fois dans 14 ml qsp d'eau désionisée par centrifugation à 500 g, 15 min, afin de se débarasser de toutes traces de saccharose.

I.3.- DENOMBREMENT:

Deux types de dénombrement seront utilisés au cours de ce travail :

- Dénombrement sur cellule de comptage sans coloration : utilisé pour la détermination des concentrations en oocystes dans les solutions purifiées à partir de selles.
- Dénombrement après coloration par immunofluorescence : utilisé pour la détermination des concentrations de suspension d'oocystes où la présence de débris risque de rendre difficile l'identification du parasite (Mise au point des protocoles de purification, détection de *Cryptosporidium* dans l'eau...).

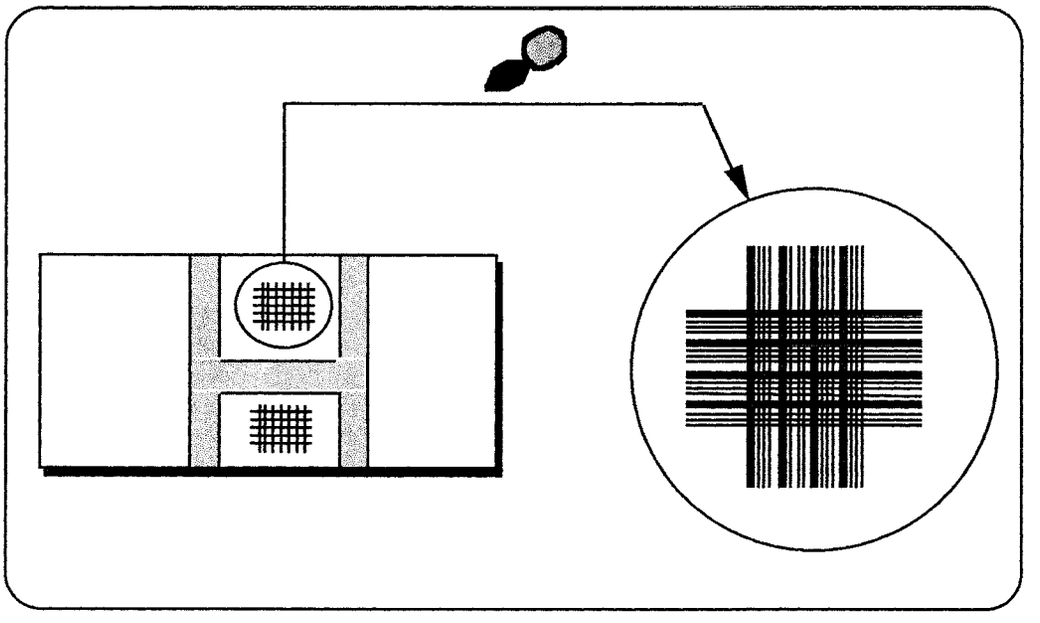
I.3.1.- Dénombrement classique sans coloration :

Au cours de ces dénombrements aucune coloration n'est utilisée pour identifier *Cryptosporidium* : la limpidité de la suspension et le degré de purification des oocystes sont

suffisants pour reconnaître les oocystes uniquement grâce à leur forme arrondie, leur taille (≈ 4 à 6 µm) et la présence plus ou moins visible de la suture longitudinale caractéristique des oocystes.

Le dénombrement et la détermination des concentrations dans la suspension sont réalisés grâce à l'utilisation d'une cellule de Thoma caractérisée par la prédéfinition d'une grille sur sa surface. Cette grille est subdivisée en 16 grands carreaux qui représentent chacun un volume de 0,004 µl. Ces 16 grands carreaux sont subdivisés en 16 petits carreaux (Figure N°20).

Figure N°20 : Cellule de Thoma double (deux grilles prédéfinies)
(profondeur : 0.1 mm ± 0.001 (Ref : Polylabo 99515))



Pour chaque lame, après dépôt d'une fraction aliquote de la suspension d'oocystes, une lecture est réalisée sur les deux grilles.

Les oocystes sont dénombrés dans les 16 grands carreaux de chaque grille ce qui représente un volume total d'échantillon analysé par grille de 0,064 µl.

La lecture est réalisée en microscope optique à un grossissement de 250 x.

I.3.2.- Dénombrement après coloration par immunofluorescence :

Au cours de cette étude deux types de coloration par immunofluorescence ont été utilisés :

- Dans la 1ère partie de l'étude (mise au point du protocole de purification, culture cellulaire) un kit de détection par immunofluorescence directe a été utilisé.
- Dans une seconde partie (détection par floculation, étude du pilote de microfiltration) un kit de détection par immunofluorescence indirecte a été utilisé.

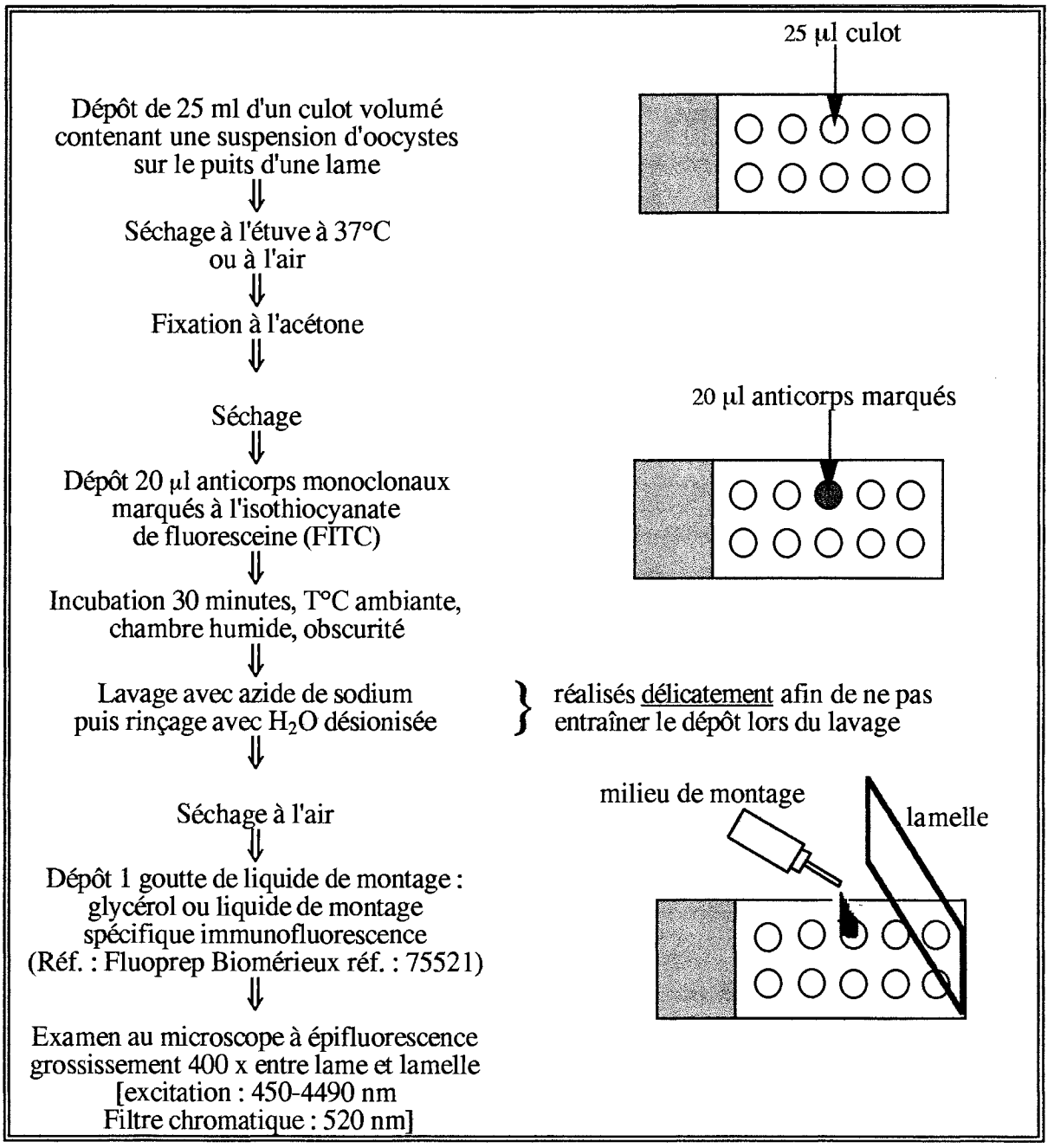
I.3.2.1.- Coloration par immunofluorescence directe :

Cette technique utilise des anticorps anti*Cryptosporidium* monoclonaux marqués directement à la fluorescéine (FITC) et spécifiques d'antigènes de surface de *Cryptosporidium.*

La coloration est réalisée en une seule étape grâce à l'utilisation de ces anticorps.

Le kit utilisé est commercialisé par EUROBIO sous la référence : *Cryptosporidium* "detect", Ref. : 909435. La lecture et la coloration seront réalisées sur un support constitué d'une lame multipuits (Réf. : Diagnostic Pasteur : 50569). Le détail du protocole est décrit dans la figure N°21.

Figure n°21 : Protocole de coloration par immunofluorescence directe



Les oocystes ainsi colorés se présentent comme des éléments arrondis ou ovalaires (de 4 à 6 µm) caractérisés par une fluorescence vert-pomme et quelque fois la mise en évidence bien nette de la suture longitudale caractéristique des oocystes. Deux à trois dépôts sont réalisés pour chaque culot dénombré. Le dénombrement est réalisé par comptage des oocystes sur la totalité du puits, sachant que le volume d'échantillon examiné sur chaque puits est de 25 µl.

En cas de lecture non immédiate des lames, celles-ci peuvent être stockées dans une feuille d'aluminium (à l'obscurité) en chambre froide à 4°C, afin d'éviter une perte de fluorescence.

I.3.2.2.- Coloration par immunofluorescence indirecte :

Cette technique est caractérisée par deux étapes distinctes :

- La première étape utilise des anticorps monoclonaux murins dirigés contre des composants antigéniques de surface des oocystes de *Cryptosporidium.*
- Dans une seconde étape une incubation de l'échantillon, avec des anticorps anti-immunoglobuline murine marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), est réalisée.

Le kit utilisé est commercialisé par BMD sous la référence : Hydrofluor ™ COMBO, Réf. : 70810 et le protocole est détaillé dans la figure N°22.

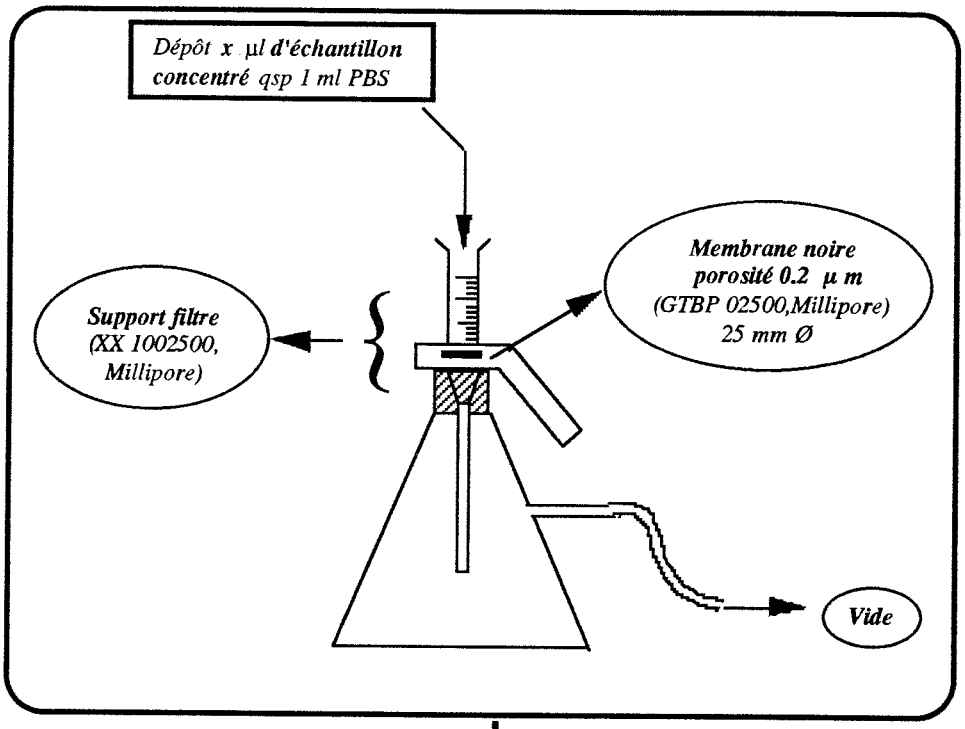
Le dépôt de l'échantillon et la coloration sont réalisés sur un filtre membrane en acétate de cellulose caractérisé par une porosité de 0,2 µm. Il faut préciser que le volume d'échantillon déposé peut varier de 20 µl à 1 ml selon la turbidité de l'aliquot à analyser. En effet, le volume du dépôt doit être modulé selon la présence plus ou moins importante de débris qui peuvent être responsables d'un colmatage de la membrane. De plus une membrane "trop chargée" risque de présenter des difficultés lors de la lecture au microscope : plusieurs épaisseurs de débris pouvant masquer dans ce cas certains oocystes qui ne pourront alors être comptabilisés ce qui pourrait remettre en cause la fiabilité du dénombrement.

Les lectures sont réalisées au microscope à épifluorescence à un grossissement x 250 ou x 400. Mais afin de limiter le temps nécessaire à la lecture d'une lame (2 à 3 heures en moyenne), il est conseillé de réaliser l'observation au grossissement x 250 et de contrôler en cas de doute à un grossissement x 400.

Les oocystes se présentent toujours comme des éléments arrondis ou ovalaires (de 4 à 6 µm) et sont caractérisés par une fluorescence vert-pomme. La suture longitudinale caratéristique des oocystes peut dans certain cas être remarquée bien distinctement et confirmer l'identification (photographie N°1). Globalement un aspect identique des oocystes est obtenu que soit utilisée la technique d'immunofluorescence directe ou indirecte.

Le balayage de la totalité du filtre est réalisé pour le dénombrement au microscope et la quantité d'oocystes présente est rapportée au volume de culot déposé sur le filtre.

Figure N°22 : Protocole d'identification des oocystes par immunofluorescence indirecte



Addition 10 ml PBS

Filtration lente

Ajout sur filtre du mélange

(**Anticorps primaires "anticryptosporidium"** 55 µl + PBS 495 µl)

30 min Incubation, T°C ambiante

Rinçage 15 ml PBS

Filtration lente

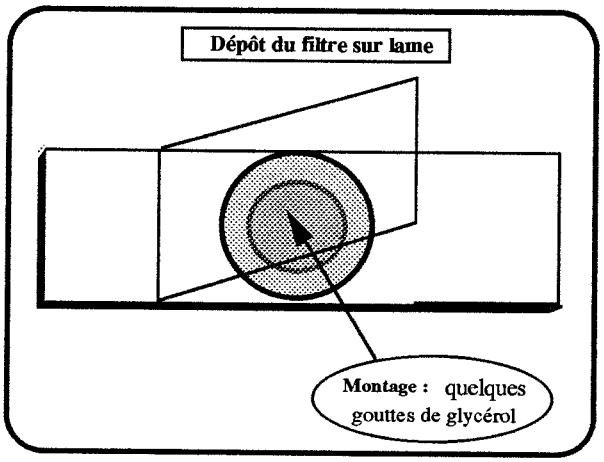
Ajout sur filtre du mélange

(**Anticorps marqués FITC** 55 µl + PBS 495 µl)

Incubation 30 min ,T°C Ambiante , Obscurité

Rinçage 15 ml PBS

Récupération filtre humide



Lecture microscope épifluorescence

(Excystation 450-490 nm ; Filtre chromatique : 520 nm)

II - ETUDE DE L'HYDROPHOBICITE ET DES PROPRIETES ELECTROSTATIQUES DE SURFACE DE CRYPTOSPORIDIUM:

II.1.- MESURE ET DÉTERMINATION DU POTENTIEL ZETA :

➢ *Principe de détermination :*

Le potentiel Zéta est déterminé par électrophorèse : mobilité de la particule dans un champ électrostatique.

A partir de l'équation de Henry il est possible de déterminer la valeur du potentiel Zéta :

Equation de Henry : $Ue = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot f(Kr)}{6 \pi \cdot \eta}$

avec Ue : mobilité électrophorétique

ε : constante diélectrique

ζ : potentiel Zéta électrocinétique

η : viscosité dynamique

K : paramètre de Debye Hückel

r : facteur géométrique dépendant de la taille de la particule

Dans le domaine de l'eau : f (Kr) = 1,5 ; donc $\zeta = 12{,}85$ Ue .

Par conséquent si l'on connaît la vitesse de migration électrophorétique de la particule (V en $m.s^{-1}$) et le gradient de potentiel imposé pour la migration (E en $V.m^{-1}$), nous pouvons déterminer Ue = V / E , et donc obtenir la valeur du potentiel Zéta dans les conditions utilisées.

➢ *Mesure de Potentiel zéta :*

Les mesures de potentiel zéta sont réalisées sur des suspensions de *Cryptosporidium* purifiés à température ambiante grâce à l'utilisation d'un Zétamètre (Lazer Zee Meter, Model 501, Pen Kem). Cet appareil permet de suivre la migration électrophorétique des particules au microscope sous un faisceau laser incident.

L'appareil est calibré grâce à des particules de titane dont le potentiel est connu.

Pour chaque échantillon injecté dans l'appareil, les mesures sont réalisées en dupliquat.

Une sonde permet de réaliser des mesures de température lors du passage de l'échantillon afin de corriger les mesures de potentiel zéta en fonction des variations de ce facteur. La valeur de potentiel zéta déterminée est donc corrigée par le facteur température suivant

la formule : $\zeta \text{ corrigé} = \zeta \times (1 - 0.02T)$

II.2.- DETERMINATION DE L'HYDROPHOBICITE DE SURFACE DES OOCYSTES :

➢ *Principe :*

Une des techniques les plus souvent utilisées pour évaluer l'hydrophobicité de microorganismes, est basée sur le degré d'adhérence des cellules sur un liquide hydrocarboné, comme l'octane ou l'héxadécane, après une brève période d'agitation (Rosenberg et al, 1980, 1986, 1991).

Ainsi la partition des oocystes de *Cryptosporidium* à l'interface octane - eau pourra être déterminée, afin d'apprécier la capacité des oocystes à établir des liaisons hydrophobes à leur surface.

➢ *Méthodologie :*

Le test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (test AMH) effectué selon le protocole décrit par Rosenberg et al., 1980, a été modifié afin d'adapter la technique à d'autres types de microorganismes tels que *Cryptosporidium* (voir Chapitre B).

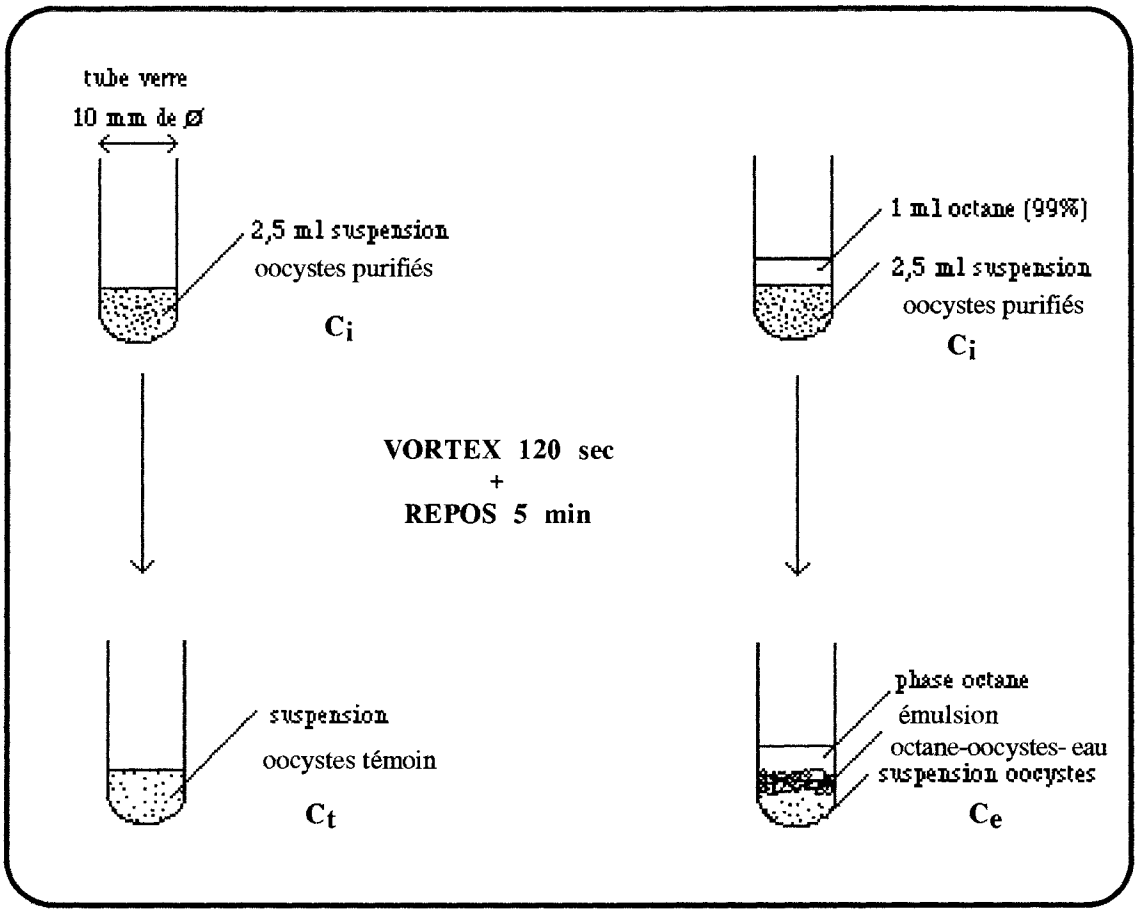
2,5 ml de suspension d'oocystes purifiés sont déposés dans un tube en verre, puis vortexés pendant 120 secondes. Ce tube représente le témoin. Un dénombrement des oocystes dans la suspension est réalisé avant et après agitation à l'aide d'une cellule de Thoma au microscope optique (grossissement 400X). Ces mesures permettent d'évaluer l'éventuelle adhésion des oocystes sur les parois du tube en verre ou les phénomènes d'autoagrégation des oocystes qui pourraient interférer au cours du test d'adhésion à l'octane.

En parallèle, 2,5 ml de la même suspension d'oocystes sont additionnés de 1 ml d'octane (99 %) et vortexés pendant 120 secondes. Après 5 minutes de repos, 3 phases distinctes sont observées :

* une phase supérieure composée d'octane
* une phase intermédiaire constituée de l'émulsion octane-oocystes-eau
* une phase inférieure renfermant la suspension aqueuse d'oocystes (Figure N°22).

Les oocystes sont dénombrés dans la phase aqueuse selon le même protocole que pour le témoin.

Figure N°22 : Protocole expérimental du Test AMH modifié



C i : Quantité d'oocystes dans la suspension initiale
C t : Quantité d'oocystes dans la suspension témoin) **après**
C e : Quantité d'oocystes dans la phase aqueuse de l'essai) **agitation**

➢ *Expression des résultats* :

Le pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane (oocystes accrochés aux gouttes d'octane dans l'émulsion par interactions hydrophobes) est calculé, à partir des valeurs de dénombrement obtenues après comptage des oocystes au microscope optique sur cellule de Thoma, suivant la formule :

$$\%A = \frac{Ct - Ce}{Ct} \times 100$$

avec % A = Pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane
Les quantités d'oocystes Ct, Ce et Ci présents dans les suspensions aqueuses représentent la somme des oocystes dénombrés au cours d'une série de 6 comptages successifs sur cellule de Thoma (Grille totale : 0.064 µl).

III - ETUDE DE LA VIABILITE DES OOCYSTES :

III.1.- DEVELOPPEMENT SUR CULTURE CELLULAIRE :

III.1.1.- Purification des oocystes :

Les oocystes sont purifiés à partir de deux échantillons de selles de veaux respectivement filtrés sur 250 µm et stockés à 4°C.

- le 1er échantillon a été stocké 12 mois en présence de 2,5 % de $K_2Cr_2O_7$
- Le 2ème échantillon, 3 mois sans adjonction d'aucun "conservateur".

Le protocole de purification utilisé se déroule en 3 étapes : sédimentation sur Formol-EthylAcétate (FEA), flottation sur chlorure de sodium et enfin une séparation sur gradient de saccharose (d = 1,3 ; 1,1 ; 1,04).

Le culot obtenu est alors lavé dans du PBS stérile pH = 7,2 et une deuxième séparation sur gradient sera réalisée si nécessaire en fonction d'une présence de débris plus ou moins importante.

III.1.2.- Dékystement des oocystes :

Les oocystes purifiés, lavés dans du PBS stérile, sont ensuite placés 12 heures à 4°C dans une solution de PBS pénicilline 1000 UI/ml, streptomycine 1 mg / ml, amphotéricine B 20 µg / ml, afin de décontaminer la suspension.

Un lavage est réalisé ensuite à deux reprises par du PBS stérile (pH 7,2), puis les oocystes sont exposés à 1,75% d'hypochlorite de sodium pendant 10 minutes dans un bain glace-eau. Une série de 4 lavages dans du PBS stérile glacé est immédiatement effectuée.

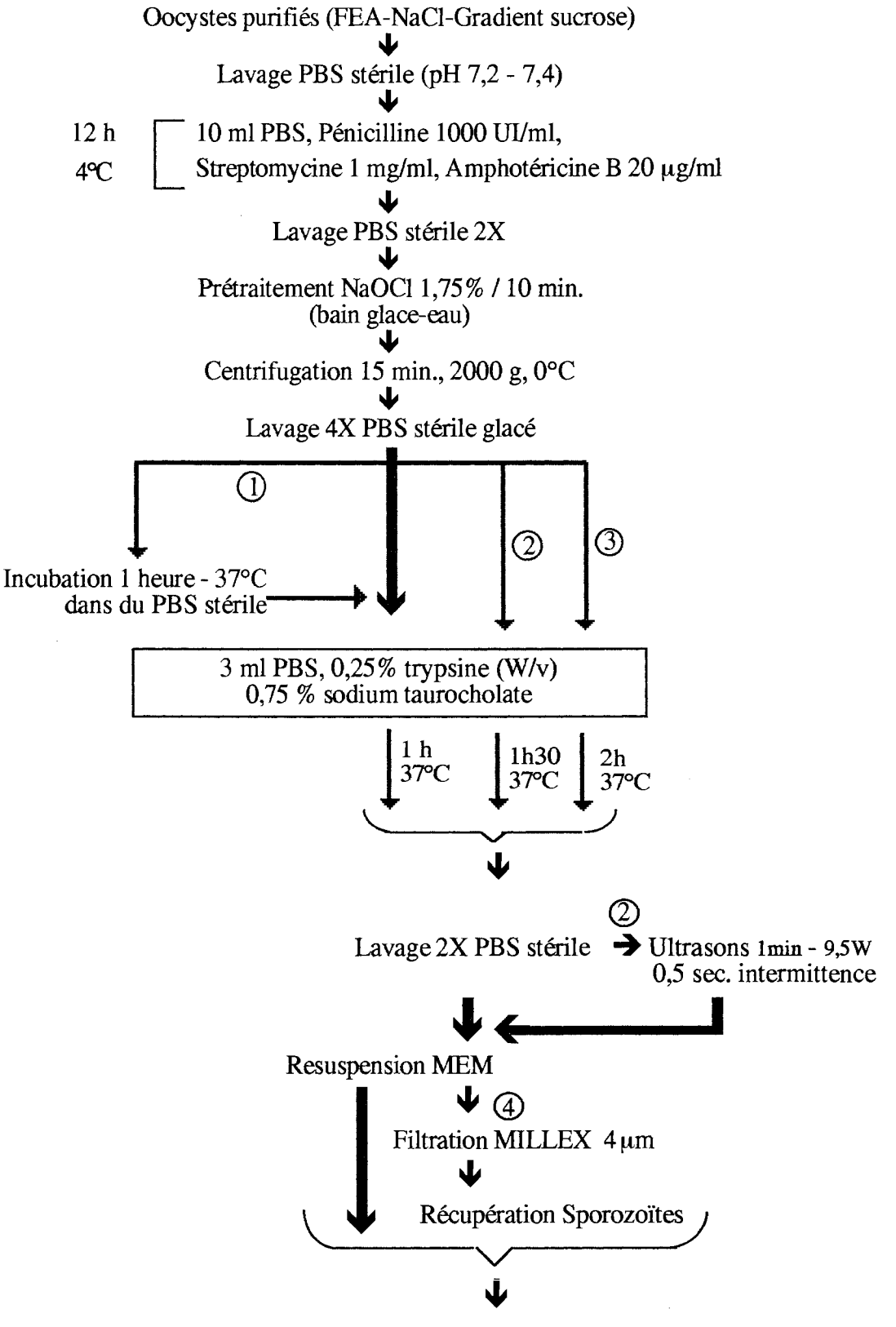
Le culot obtenu est remis en suspension dans une solution de PBS contenant 0,25% de trypsine (w/v) et 0,75% de taurocholate de sodium et placé 1 heure à 37°C.

Les solutions de PBS et PBS-trypsine-taurocholate de sodium ont été stérilisées par filtration sur filtre trépied (Millipore) ou cartouche (Sartorius) de 0,22 µm de porosité. Après incubation, deux lavages dans du PBS stérile sont de nouveau réalisés et le culot obtenu est repris dans du milieu de culture (MEM) (voir paragraphe III.1.3.).

Ce protocole de base sera modifié suivant diverses modalités afin d'obtenir un dékystement maximal des oocystes (Figure N°23)

Les oocystes une fois excystés sont soit directement inoculés sur le tapis cellulaire, soit traités par filtration afin de séparer les sporozoïtes infectieux des débris et "fantômes" d'oocystes présents.

Figure N° 23 : Différentes modalités de dékystement



III.1.3.- Cultures cellulaires :

Des subcultures de cellules de Cancer colique humain $CACO_2$ ont été effectuées à partir d'un stock de cellules (Nombre de passages = 86) fourni par le Service de Parasitologie du Professeur Gentilini (Hôpital de la Pitié Salpêtrière - PARIS).

Les milieux de croissance utilisés sont constitués de "Milieu Essentiel Minimum" (M.E.M.) de EAGLE additionnés de 2,2 g/l de $NaHCO_3$ et de rouge de Phénol à titre d'indicateur de pH.

Ces milieux sont stérilisés par filtration sur filtre Millipore de porosité 0,22 µm et stockés à 4°C.

Avant utilisation, le milieu de croissance MEM est supplémenté avec :

- 20 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté pour obtenir le milieu de croissance (MEM 20%).
- 5% de SVF pour le milieu de survie avant infection par *Cryptosporidium* (MEM 5%)
- 10% de SVF pour le milieu de survie après infection du tapis cellulaire par *Cryptosporidium.*

Les milieux sont de plus systématiquement complémentés, avant utilisation avec 1% de solution d'antibiotiques (0,01% streptomycine (Diamant) ; 10^4 millions d'unités de spécilline (Spécia) qsp 100 ml Eau Milli Q).

Le stock de cellules est conservé à -70°C dans des cryotubes contenant du MEM 20% additionné de 10% de cryoconservateur (Diméthyl-Sulfoxide).

Après décongélation rapide les cellules sont subcultivées sur flacons à fond plat (150 cm^2 - Nunc) avec du milieu MEM 20% à 37°C sous atmosphère enrichie en 5% de CO_2.

Après 3 subcultures (trypsination des cellules et remise en culture dans du MEM 20%), une série de microplaques - 6 puits (Falcon) est ensemencée à raison de 5.10^5 cellules par puits additionnées de 4 ml de MEM 20%. Le milieu de croissance est changé tous les jours jusqu'à obtention de tapis continu qui survient généralement au bout de 6 jours.

III.1.4.- Infection des cellules par Cryptosporidium :

La suspension de sporozoïtes ou d'oocystes excystés, préalablement dénombrés et incubés à 37°C dans 4 ml qsp de MEM 10%, est déposée sur les puits des microplaques contenant le tapis cellulaire $CACO_2$.

Les plaques sont ensuite déposées dans une étuve à 37°C sous atmosphère enrichie en 5 % de CO_2.

Le jour suivant l'inoculation, le tapis cellulaire est lavé vigoureusement avec 4 ml de MEM 10%. Ensuite, le milieu est changé tous les jours et le surnageant cellulaire est récupéré systématiquement dans des tubes stériles à partir du 2ème jour après inoculation.

Le 12ème jour après récupération du surnageant, le tapis cellulaire est détruit par trypsination (PBS 10% bicarbonate 14 g/L, trypsine 3 g/L, titriplex III (versène) 0,8 g/L).

Les cellules ainsi décrochées sont placées dans un tube stérile et additionnées de PBS stérile (qsp 14 ml). Une centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes est ensuite réalisée.

Le culot cellulaire est repris dans 5 ml de PBS stérile et ultrasoniqué, 1 minute dans un bain à ultrasons, afin d'éclater les cellules en vue de permettre la libération des oocystes non encore excrétés.

Toutes les suspensions d'oocystes récupérées sont centrifugées 15 minutes à 3000 RPM. Les oocystes sont détectés et dénombrés par coloration en immunofluorescence (Kit *Cryptosporidium* Detect- Eurobio) pour le mélange cellules / oocystes ultrasoniqués et sans coloration sur cellule de Thoma pour les suspensions récupérées après lavage des tapis cellulaires.

La figure n° 24 regroupe toutes les étapes du protocole expérimental.

III.2.- INCLUSION DES COLORANTS FLUOROGENIQUES :

III.2.1.- Purification des oocystes :

Les suspensions d'oocystes testées sont constituées soit de concentrats d'oocystes obtenus par floculation d'échantillons d'eaux contaminées, soit de suspension d'oocystes purifiées à partir de selles par sédimentation sur formol éthyl acétate et flottation sur NaCl.

Pour ces deux types d'échantillons les dernières étapes de lavages des culots ont été réalisées dans du PBS pH 7.2. Le culot final est remis en suspension dans une solution de HBSS (Hanks Balanced Salts Solution).

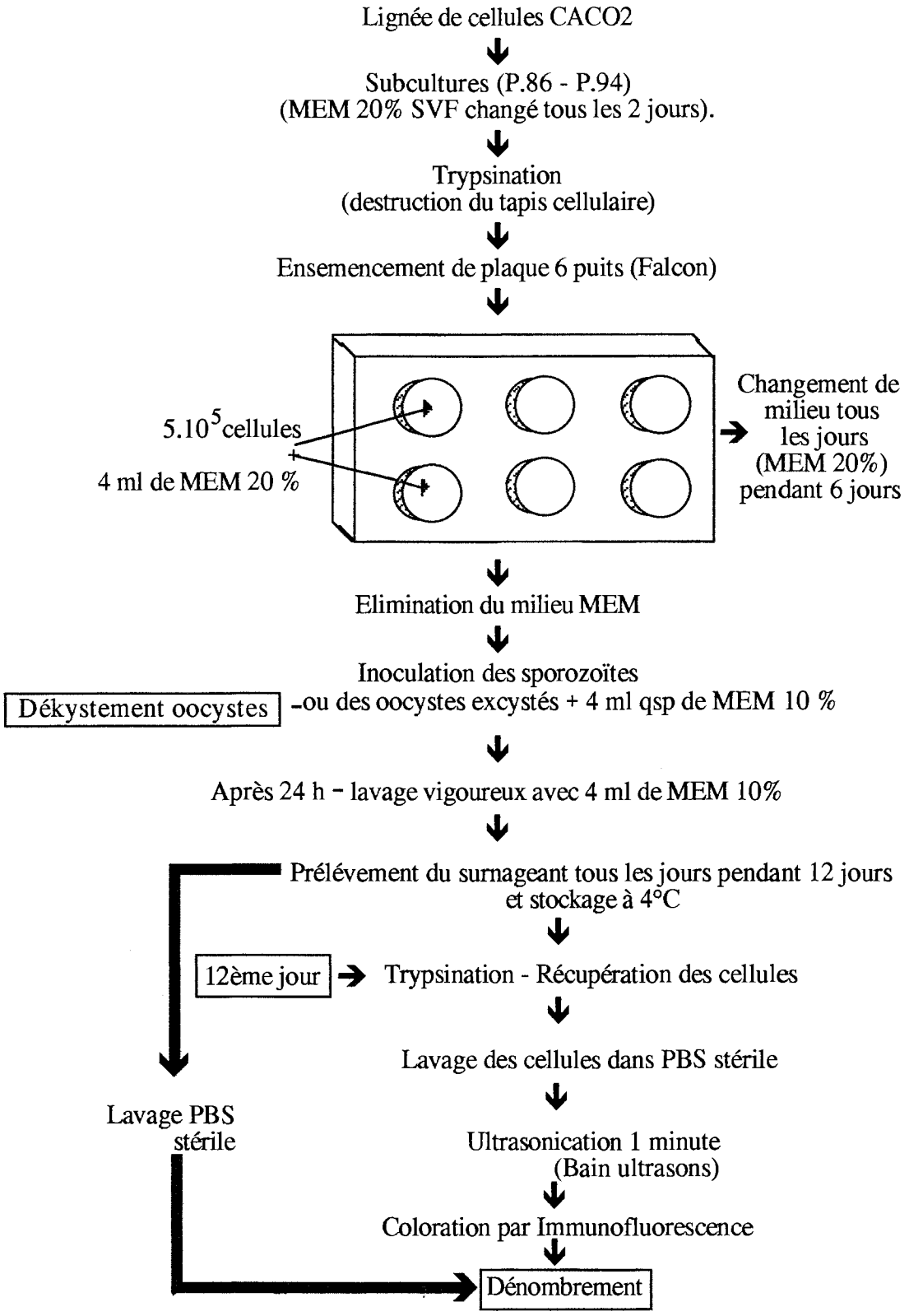
III.2.2.- Préincubation :

Deux protocoles principaux d'inclusion - exclusion des colorants fluorogéniques ont été testés : l'un avec et l'autre sans étape de préincubation dans une solution de HBSS acidifiée (Figure N°25).

L'étape de préincubation consiste à soumettre 100 µl de la suspension d'oocystes, pendant 1 heure à 37 °C, à un pH de 2.75 dans HBSS acidifié (20 ml HBSS pour 200 µl HCl 1M). Cette étape permet d'exacerber la perméabilité des oocystes et ainsi de faciliter l'inclusion du DAPI.

Les oocystes sont ensuite lavés 3 fois dans 2 ml de HBSS qsp par centrifugation 1500 g - 10 min. Le culot final est remis en suspension dans 100 µl de HBSS.

Figure N° 24 : Développement sur culture cellulaire : Protocole expérimental



III.2.3.- Incubation :

Des solutions stock de 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) et d'iodure de propidium (PI) sont préparées à raison de :

- DAPI : solution stock à 2 mg / ml de méthanol absolu ;
- PI : solution stock à 1 mg / ml de PBS, pH 7.2.

100 µl de la suspension d'oocystes dans HBSS, préincubée ou non, sont incubés pendant 2 heures à 37°C, après addition de 10 µl de chacune des solutions stock de DAPI et de PI.

Les suspensions d'oocystes sont ensuite lavées 2 fois dans HBSS avant d'être observées au microscope à épifluorescence.

III.2.4.- Dénombrement :

Le dénombrement des oocystes viables et non viables est réalisé sur cellule de Nageotte au microscope à épifluorescence équipé d'un filtre UV pour l'observation de l'inclusion du DAPI et d'un filtre vert pour l'inclusion du PI.

La proportion d'oocystes vides (fantômes), ayant inclus PI (PI^+), ayant inclus DAPI et non PI ($DAPI^+$ PI^-) et enfin n'ayant inclu ni DAPI ni PI ($DAPI^-$ PI^-), est déterminée par observation d'un total de 100 oocystes par échantillon.

La proportion d'oocystes viables est exprimée en pourcentage et obtenue par addition des oocystes identifiés comme $DAPI^+$ PI^- et $DAPI^-$ PI^- si aucune préincubation n'a été réalisée. Par contre si une préincubation préliminaire a été réalisée le pourcentage d'oocystes viables est représenté uniquement par le nombre d'oocystes identifiés comme $DAPI^+$ PI^-.

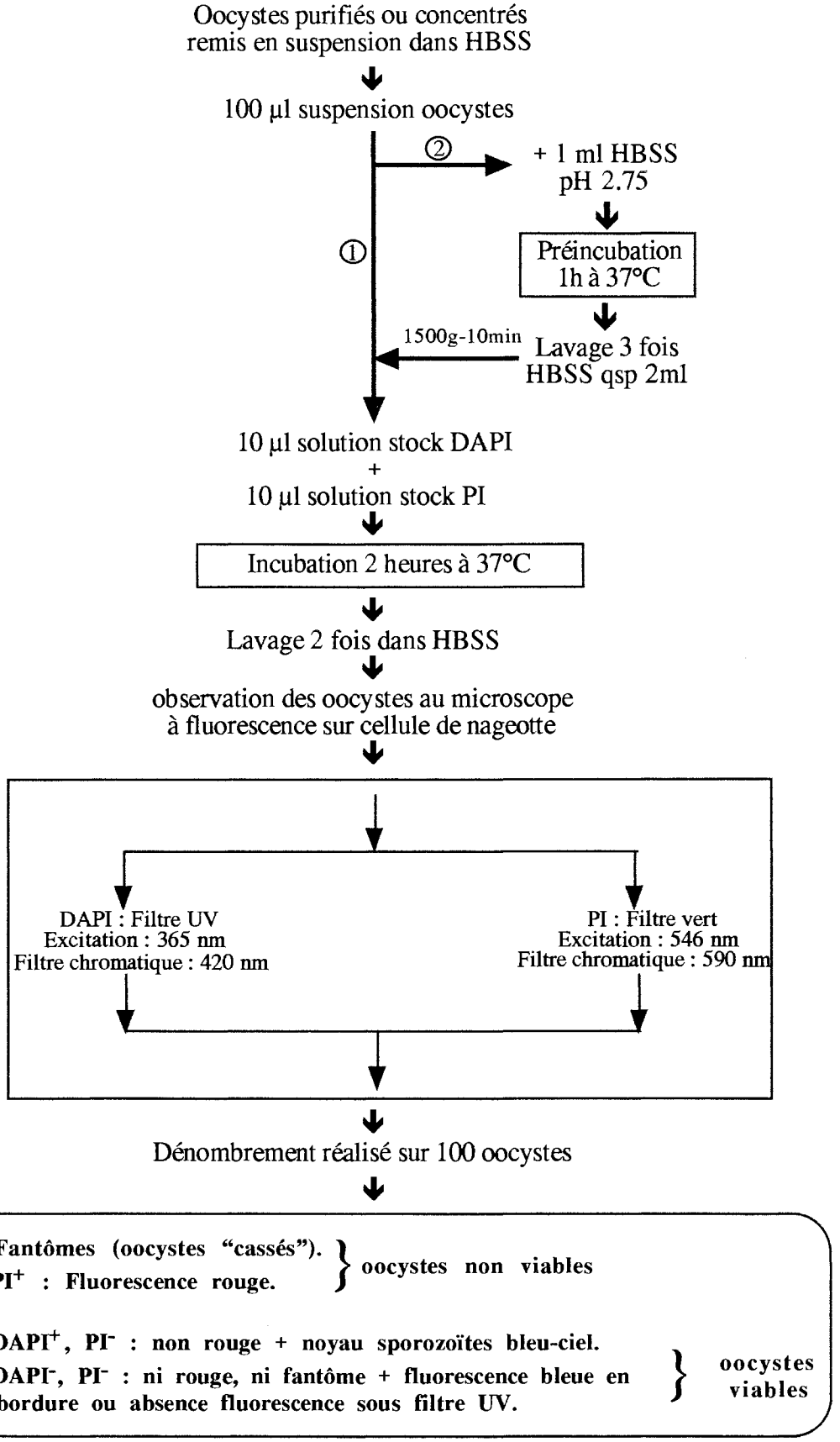
IV - DETECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU PAR FLOCULATION :

IV.1.- TYPES D'EAUX UTILISES :

Des échantillons de 10 à 20 litres d'eaux du robinet contaminés artificiellement (10^2 à 10^3 oocystes / L) ont été utilisés.

Les contaminations artificielles ont été réalisées à partir de suspensions d'oocystes d'origine fécale purifiées par séparation sur formol éthyl acétate et flottation sur NaCl.

Figure N°25 : Protocole d'évaluation de la viabilité des oocystes par inclusion-exclusion de DAPI et PI



IV.2.- PROTOCOLE DE BASE UTILISÉ POUR L'ETUDE METHODOLOGIQUE :

Dans l'objectif d'adapter la technique de floculation à la détection de *Cryptosporidium* en sortie du pilote de microfiltration, plusieurs protocoles ont été testés au cours de cette étude.

Parallèlement, des méthodologies ont été développées en vue d'une adaptation aux tests de viabilité après concentration des oocystes.

Le protocole mis au point par Vesey et al, 1993(a), a servi de base au cours de l'étude méthodologique et différentes modifications ont été testées en vue de l'optimiser (variation des volumes d'échantillons testés, de l'agent floculant utilisé,...) (chapitre D).

Ce protocole utilise un procédé de floculation au carbonate de calcium à partir de l'addition de $NaHCO_3$ et de $CaCl_2$ à l'échantillon d'eau analysé et ajustement à pH 10 (Figure N°26).

Figure N°26 : Protocole de floculation de base au carbonate de calcium.

(D'après Vesey et al, 1993(a))

10 l Eaux
+ 100 ml $CaCl_2$ 1 M

↓ *Agitation*

100 ml $NaHCO_3$ 1 M

↓ *Agitation*

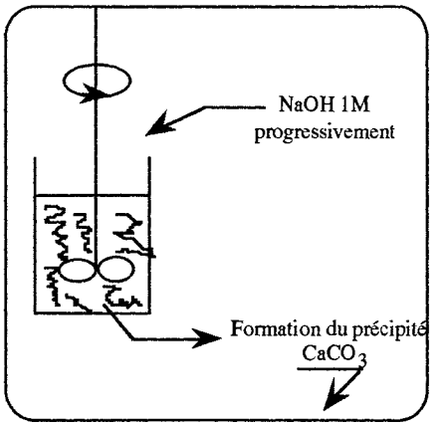
Ajustement à pH10
avec NaOH 1 M

↓ *Agitation* →

4 heures à température ambiante
(jusqu'à une nuit)

↓

Elimination surnageant
par aspiration



↓

Rinçage bidon
200 ml Tween 80 0.01 % ← Récupération culot dans
pots à centrifuger 300 ml

↓ ↗ ↓

Rinçage de nouveau ↗
100 ml Tween 80 0.01 % ↗ ↓ *Centrifugation 2500 g, 10 min*

Dissolution totalité culots
dans 200 ml Acide sulfamique 10% (p/v)

↓

Rinçage pots ← Transfert culots dissous
50ml Tween 80 0.01 % ↗ dans tubes 50 ml

↓ *1200 g, 10 min*

Lavages (eau désionisée)X1 et PBS qsp 50 ml) X2

↓

Culot volumé

↓

Coloration par immunofluorescence indirecte
et numération

IV.3.- PROTOCOLE FINAL UTILISE POUR LA DETECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU :

Ce protocole est le résultat de l'étude méthodologique d'optimisation des procédés de floculation. Il est utilisé pour la détection de *Cryptosporidium* dans les échantillons d'eaux testés au cours de l'étude du pilote de microfiltration (Figure N°27).

Au cours de ce protocole des échantillons de 20 litres d'eaux sont concentrés grâce à la formation d'un floc d'hydroxyde d'aluminium obtenu par addition de sulfate d'aluminium à une concentration finale de 1mM et ajustement à pH 6. Le maillage constitué grâce à la formation de ce floc permet d'englober les oocystes et de les entraîner lors d'une étape de sédimentation de 4 heures dans le fond du container.

Le précipité d'hydroxyde d'aluminium récupéré est ensuite dissous par addition d'acide sulfamique 10%. Les sels d'aluminium ainsi remis en solution sont éliminés après centrifugation et le culot obtenu regroupant les oocystes et matières en suspension concentrées est lavé 1 fois dans de l'eau désionisée puis 2 fois dans une solution de PBS pH 7.2. Le culot est ensuite volumé puis les oocystes sont colorés avant d'être dénombrés au microscope.

Figure N°27 : Protocole de floculation par addition de sulfate d'aluminium

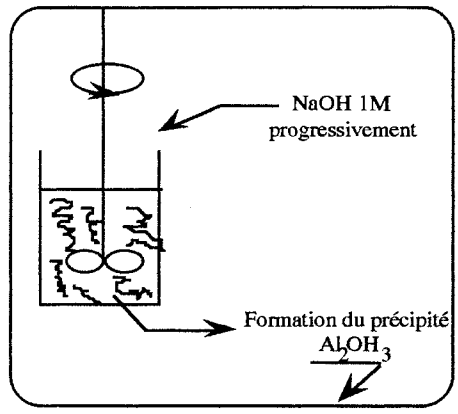
20 l Eaux contaminées
+ 11.66 g [$Al_2(SO_4)_3$, 12 H_2O]
(soit $Al_2(SO_4)_3$ 1 mM final)

↓

Ajustement à pH 6
avec NaOH 1 M

↓ *Agitation* →

4 heures à température ambiante



↓

Elimination du surnageant
par aspiration

↓

Rassemblement du culot
dans des pots à centrifuger de 300 ml → Rinçage du bidon avec 150 à 200 ml de Tween 80 0.01%

Centrifugation 10min, 1200 g ↓

Remise en suspension des culots et
rassemblement dans tubes à centrifuger de 50 ml

Centrifugation 10min, 1200 g ↓

Dissolution du culot dans
200 ml Acide sulfamique 10 %

Centrifugation 10min, 1200 g ↓

Lavages (eau désionisée) X1 et (PBS pH 7.2)X2

Centrifugation 10min, 1200 g ↓

Culot récupéré et volumé

↓

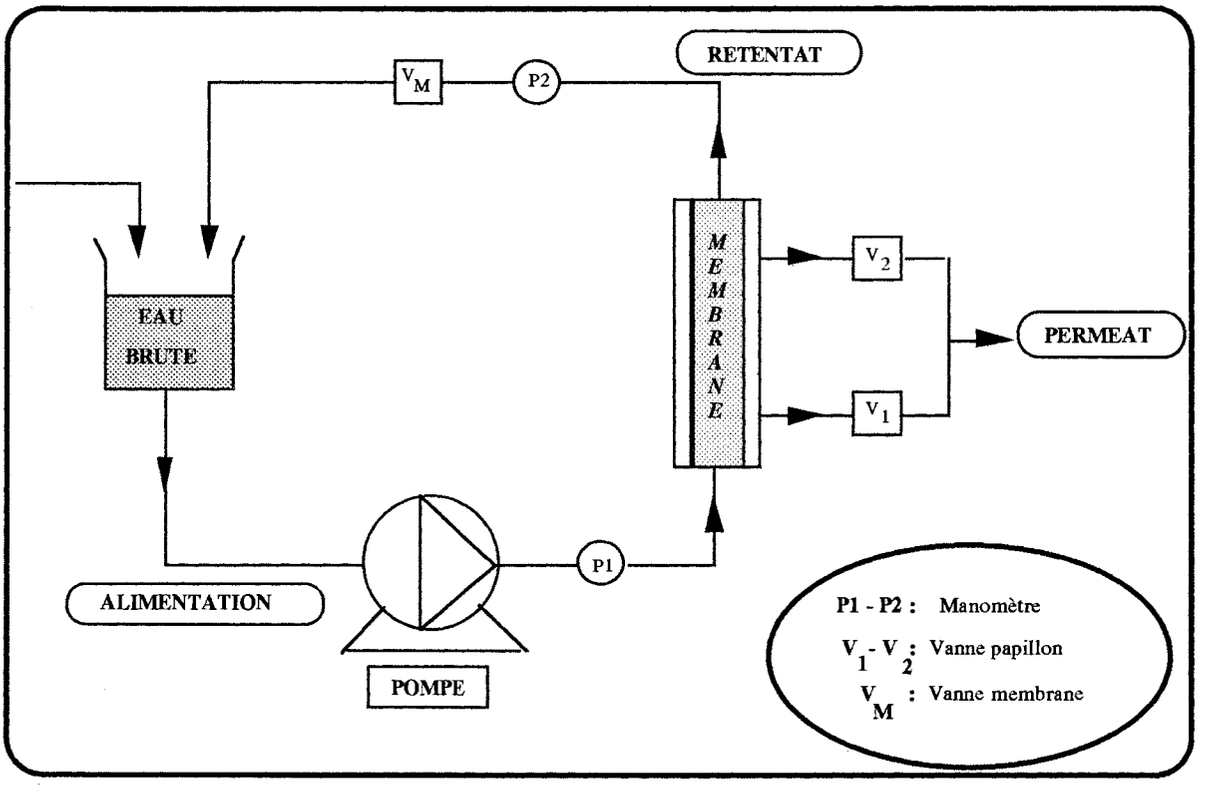
Coloration par immunofluorescence indirecte et numération.

V - ETUDE DU SYSTEME PILOTE DE MICROFILTRATION :

V.1.- DESCRIPTIF DU SYSTEME PILOTE UTILISE :

Le système de microfiltration choisi est constitué d'un élément filtrant tubulaire en céramique, alimenté en eau par l'intermédiaire d'une pompe à lobe à débit modulable (Figure N°28). Le système fonctionne en circuit fermé grâce à une boucle de recirculation. Un système de vannes en sortie rétentat et perméat permet de faire varier la pression exercée à l'intérieur du barreau à la surface de la membrane et ainsi d'optimiser entre autre le débit de filtration. Afin de contrôler les pressions en entrée et en sortie du système deux manomètres sont installés l'un en amont du système membranaire et l'autre en aval côté rétentat.

Figure N°28 : Schéma du système pilote utilisé



L'installation pilote (Réf : MSP 006 207 AR - Millipore) comprend selon le cahier des charges : - Une pompe à lobe (JOHNSON) à variateur mécanique débit 2m^3/h à 4 bars 1,5 KW

- Un carter Ceraflo, acier inoxydable, connexions alimentaires rétentat et perméat sanitaire (TC 11/2)
- 2 manomètres glycérinés à membrane 0-10 bars
- 2 vannes papillons en sortie perméat et 1 vanne à membrane en rétentat
- 1 cuve process en polyéthylène qualité alimentaire capacité 200 l.
- 1 élément Céraflo en céramique (alpha-alumine) surface 0,135 m^2, seuil de rétention : 0,2 µm, diamètre lumen : 2,7 mm. (Réf. : MSFN 00020 Millipore).

V.2.- TYPES D'EAUX UTILISES :

Pour toutes les expériences réalisées pour la mise au point et les réglages du pilote, les échantillons d'eaux filtrés au travers du système sont constitués d'eaux du robinet ou d'eaux de rivière non contaminées.

Des échantillons d'eaux de rivière ont été exclusivement utilisés pour les essais concernant l'étude de l'efficacité du système sur l'élimination de *Cryptosporidium*. Une partie de ces échantillons (2/3) ont été contaminés artificiellement par des oocystes de *Cryptosporidium*, purifiés à partir de selles, à raison de 10^5 oocystes / L en moyenne.

Les échantillons d'eaux de rivière d'un volume de 200 L ont été prélevés dans la Moselle à Messein (54). Ce site de prélèvement a été choisi car il correspond au point d'alimentation des stations de traitement de l'agglomération Nancéienne.

V.3.- CARACTERISATION DES ECHANTILLONS D'EAUX ANALYSES ET PROTOCOLE D'ETUDE DU SYSTEME PILOTE :

V.3.1.- Protocole général d'étude du système pilote :

3 séries d'expériences ont été menées successivement :

- une première série permettant d'évaluer l'efficacité du système de microfiltration sur l'élimination des oocystes dans des échantillons d'eaux de rivière fortement contaminés.
- une seconde série permettant d'évaluer l'efficacité du système dans les mêmes conditions mais également d'évaluer l'impact sur la viabilité des oocystes du traitement des concentrats par les eaux de lavages (solutions acides et basiques).
- et enfin une troisième série d'essais réalisée sur des échantillons non contaminés artificiellement.

Le protocole général de l'expérimentation est représenté par la figure N°29.

Au cours des différentes séries d'essais, des prélèvements d'échantillons sont réalisés au niveau de l'alimentation du système (eau brute), de la sortie filtrat et du concentrat final.

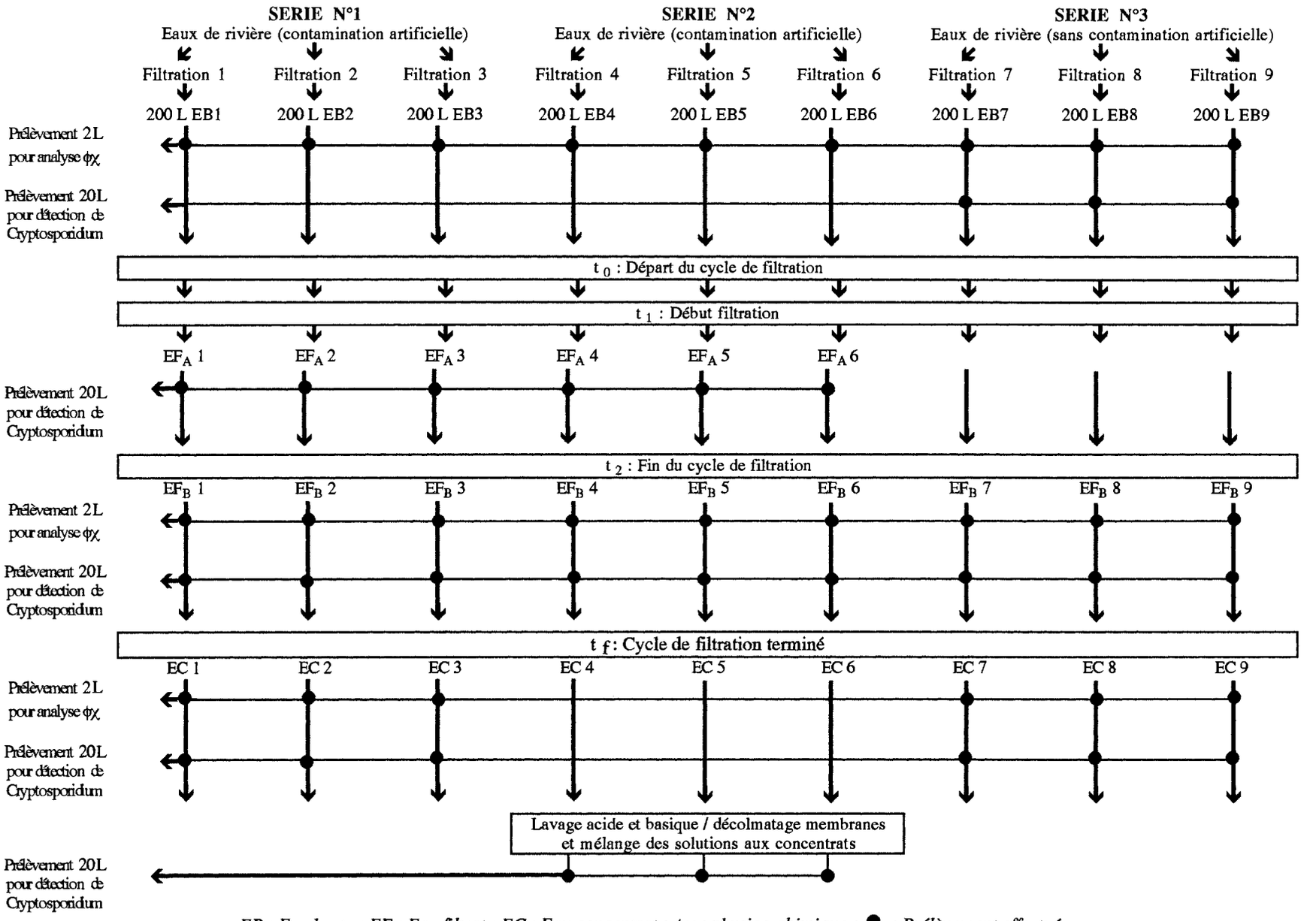
Les prélèvements de 2 L sont destinés aux analyses physico-chimiques et les prélèvement de 20 L à la recherche de *Cryptosporidium* (Figure N°29).

V.3.2.- Caractérisation des échantillons d'eaux analysés :

V.3.2.1.- Analyses physico-chimiques :

5 paramètres physico-chimiques ont été mesurés pour chaque prélèvement de 2 L réalisé au niveau de l'eau brute, du filtrat et du concentrat pour chaque essai de filtration.

Figure N°29 : Protocole général d'étude du pilote de microfiltration



EB : Eau brute ; EF : Eau filtrat ; EC : Eau concentrat ; φχ : physico-chimique ; ● : Prélèvement effectué.

➢ Des mesures de conductivité et de pH ont permis de caractériser le milieu environnant des oocystes et ainsi d'établir un lien entre le comportement et les caractéristiques de surface du parasite (établi pour des conditions précises de pH et de conductivité) pendant la filtration.

Les mesures de résistivité (ρ) ont été réalisées à l'aide d'un conductimètre E386, Metrohm AG. Ces valeurs de résistivité sont corrigées en fonction de la température de la solution suivant la formule : $\rho_{20°C} = \rho_\theta \times A$ et $A = \frac{1}{1 + 0.025 \times (\theta - 20)}$

avec $\rho_{20°C}$: résistivité équivalente à 20°C ; ρ_θ : résistivité mesurée à une température θ;

θ : mesure de température en °C et A : facteur de correction de température.

La conductivité équivalente à 20°C (C) est calculée pour chaque échantillon suivant la formule : C (en $mS.cm^{-1}$) = $10^3 / \rho$ (en $k\Omega.cm$).

➢ Des mesures de turbidité, carbone organique total (COT) et matière en suspension totale (MEST) ont été également réalisées pour chaque échantillon prélevé afin d'évaluer les performances du système de filtration sur la qualité physico-chimique de l'eau traitée.

Ces mesures ont été réalisées par le Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique de Vandoeuvre-les-Nancy selon les normes de contrôle sanitaire des eaux actuellement en vigueur.

V.3.2.2.- Analyse parasitologique : Recherche de Cryptosporidium

La technique de détection de *Cryptosporidium* employée comporte une étape de concentration par floculation au sulfate d'aluminium (§ IV.3.) et une étape d'identification par immunofluorescence indirecte (§ I.3.1.1.).

Pour les échantillons prélevés au niveau des concentrats de filtration, une étape supplémentaire de purification par séparation sur Formol éthyl acétate (§ I.2.1.) et flottation sur NaCl (§ I.2.2.) est réalisée après floculation.

Un test de viabilité par inclusion - exclusion de DAPI et PI (§ III.2.) a de plus été réalisé sur les échantillons de concentrats des 2 premières séries de filtration.

V.4.- NOTIONS D'HYDRAULIQUE UTILISEES DANS L'ETUDE DU PILOTE :

Au cours de l'étude du système pilote, une étape préliminaire d'optimisation des conditions hydrauliques du système est réalisée. Cette étape permet de fixer certains paramètres permettant d'obtenir un débit filtrat optimal allié à une rétention satisfaisante.

Il est important pour mieux définir ces paramètres de constituer un lexique des notions d'hydraulique utilisées au cours de l'étude du pilote :

➢ ***La pression transmembranaire (TMP)*** **:** exprime la pression moyenne à laquelle est soumise la membrane.

Elle est déterminée suivant la formule : $TMP = \frac{P_{entrée} + P_{rétentat}}{2} - P_{filtrat}$

avec $P_{entrée}$ et $P_{rétentat}$ mesurées à partir des manomètres situés respectivement en alimentation et en sortie rétentat du système pilote. Leurs valeurs peuvent être modifiées en faisant varier le débit de la pompe d'alimentation et l'ouverture de la vanne située en sortie rétentat du système.

P filtrat dans les conditions de fonctionnement du système est négligée puisque les vannes filtrat sont ouvertes totalement.

➢ ***Delta P (ΔP)*** **:** exprime la différence de pression entre l'entrée et la sortie rétentat du système soit $\Delta P = P_{entrée} - P_{rétentat}$.

➢ ***Perméabilité à l'eau*** **:** exprime le débit filtrat pour une eau "pure" (ici eau du robinet) exprimé en litre / heure / m^2 de surface pour une pression transmembranaire fixée (ici 2.1 bars) à une température fixée. La valeur de ce paramètre est déterminée pour une membrane neuve : perméabilité à l'eau initiale. Cette valeur servira de référence. Un moyen simple de vérifier l'efficacité d'un mode de nettoyage sera de mesurer la perméabilité à l'eau de la membrane après nettoyage et de la comparer à la valeur de référence prédéfinie.

Généralement, pour considérer que le nettoyage est efficace il faut :

- après la première utilisation, retrouver au moins 80% de cette valeur ;
- pour les utilisations suivantes, retrouver environ 95 % de la perméabilité après première utilisation.

V.5.- PROTOCOLE DE LAVAGE ET DE DECOLMATAGE DU SYSTEME :

➢ ***Le décolmatage :***

Le protocole de décolmatage du système se déroule en deux étapes principales : tout d'abord un lavage à la soude puis un lavage à l'acide nitrique (Figure N°30).

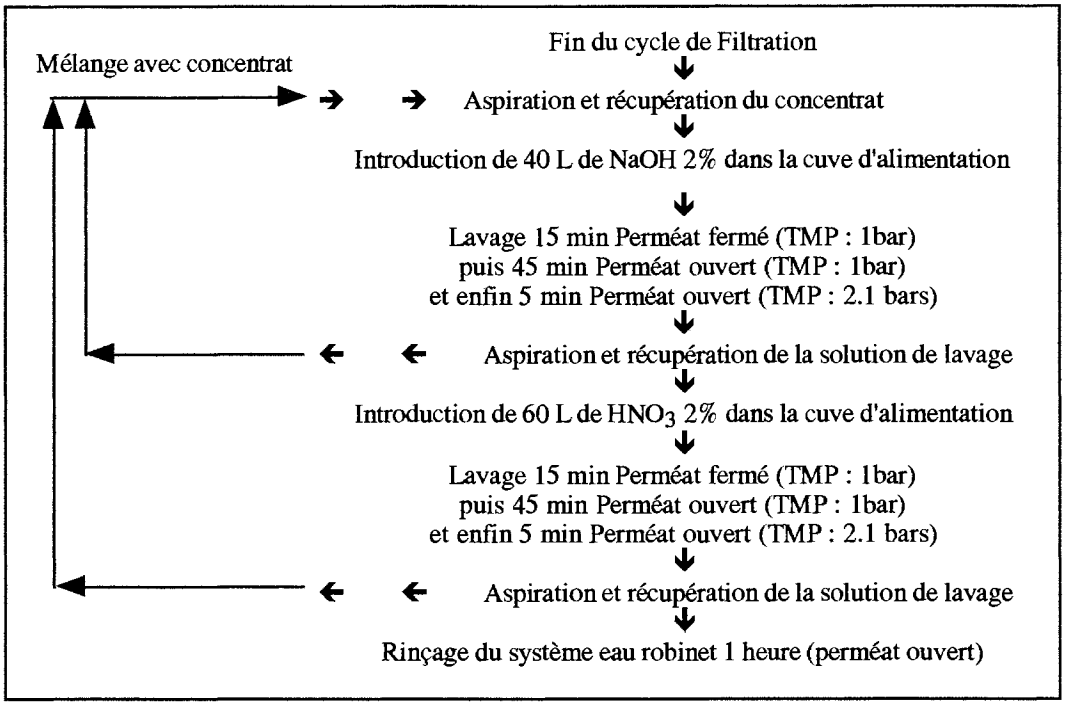
L'utilisation de NaOH (2%) permet d'éliminer les dépôts d'origine organique tandis que l'acide nitrique (2%) permet lui d'éliminer les dépôts d'origine minérale.

La circulation des solutions de lavage est réalisée dans un premier temps sans passage au travers de la membrane (Perméat fermé) ce qui permet de décolmater la surface de la membrane. Dans une deuxième temps la sortie perméat est ouverte pour permettre le passage de la solution de lavage à travers la membrane et ainsi éliminer le colmatage en profondeur.

Les volumes des solutions acides et basiques sont calculés afin d'obtenir la neutralisation du pH après récupération et mélange des solutions avant rejets.

Il faut également préciser qu'au cours des phases de décolmatage le pilote fonctionne en recirculation totale.

Figure N°30 : Protocole de décolmatage du système de microfiltration.



➢ ***La décontamination :***

Le système est décontaminé après chaque cycle de filtration par passage d'eau javellisée au travers du système (perméat ouvert) pendant 1 heure suivi d'un rinçage par filtration d'eau du robinet pendant la même durée.

Les bidons permettant de collecter les prélèvements de 20L réalisés au cours des cycle de filtration sont également décontaminés à l'hypochlorite de sodium mais également autoclavés pour éviter tout problème de surcontamination.

RESULTATS

Purification des oocystes

A - PURIFICATION DES OOCYSTES

Les oocystes de Cryptosporidium sont habituellement isolés à partir de selles contaminées. Ces échantillons, outre les oocystes, charrient de nombreux débris fécaux gênants constitués de microorganismes (Bactéries, ..), de fibres végétales, et de divers sous produits de digestion. Selon le procédé de purification des oocystes employé, différents degrés de pureté des suspensions peuvent être obtenus.

Ainsi selon le degré de purification souhaité, différentes méthodes d'isolement des oocystes ont été mises au point. La plupart de celles-ci avaient pour objectif de clarifier un échantillon pour faciliter l'identification des oocystes (diagnostic biologique, recherche de Cryptosporidium dans des échantillons environnementaux).

Au cours de notre étude, l'étape de purification avait non seulement cet objectif mais également celui d'obtenir des suspensions d'oocystes hautement purifiées afin de pouvoir accéder à des renseignements spécifiques relatifs aux caractéristiques intrinsèques des oocystes.

Une étude méthodologique a donc été réalisée afin de répondre à ces deux objectifs :

- la première partie de l'étude a permis d'évaluer les rendements de différentes techniques de purification en contamination artificielle pour de faibles concentrations en oocystes ;

- la seconde partie a permis de déterminer la technique la plus performante permettant la récupération de grande quantité d'oocystes alliée à un très haut degré de pureté des suspensions.

A.I. - PURIFICATION DES OOCYSTES A PARTIR D'ECHANTILLONS CONTAMINES ARTIFICIELLEMENT:

A.I.1. - MÉTHODES ET PROTOCOLES TESTES :

A.I.1.1. - Contamination artificielle :

Une suspension d'oocystes purifiés à partir de selles humaines par séparation sur formol éthyl acétate et flottation sur NaCl est préparée. La concentration en oocystes dans cette suspension aqueuse est déterminée. Des fractions aliquotes de cette suspension sont inoculées à des échantillons de selles humaines témoins exemptes initialement d'oocystes. Cet inoculum varie de 10^3 à 10^4 oocystes pour 4 ml de selles.

A.1.1.2.- Protocole général :

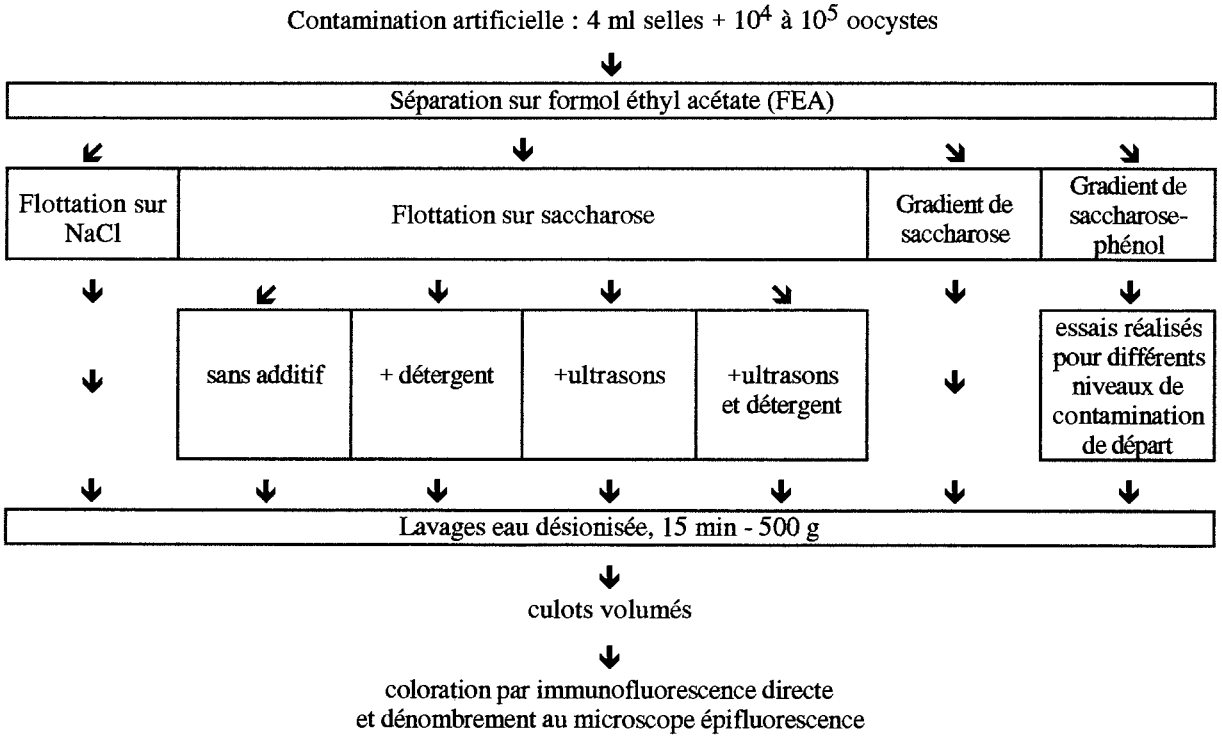
La technique de purification de Weber *et al.*, 1992 servira de base à cette étude.

Ce protocole est constitué de deux étapes principales tout d'abord une séparation sur formol- éthyl acétate (FEA) puis une flottation sur chlorure de sodium (décrit dans le § I.2. du chapitre matériels et méthodes).

Différentes variantes de cette technique ont été testées avec notamment une modification de la seconde étape de flottation sur NaCl remplacée soit par une flottation sur saccharose soit par une séparation sur gradient de saccharose simple ou sur gradient de phénol-saccharose (Figure N°31).

Un témoin de contamination a été réalisé afin de vérifier l'absence d'oocystes dans les échantillons de selles avant contamination artificielle. Deux échantillons non contaminés ont donc subi le protocole de purification par FEA et flottation sur NaCl.

Figure N°31 : Protocole général de purification testé pour des échantillons contaminés artificiellement.



La technique employant une flottation sur saccharose a fait l'objet d'investigations plus poussées permettant l'évaluation des performances de certains additifs comme l'utilisation de détergent ou d'ultrasons couplée à la méthode de purification (Figure N°31).

Différents niveaux de contamination artificielle ont été testés pour le protocole incluant une séparation sur gradient de saccharose-phénol afin de déterminer si les rendements de purification pouvaient varier selon la charge nominale en oocystes dans la suspension à purifier.

A.I.1.3.- Méthodes spécifiques utilisées :

➢ ***Flottation sur saccharose :***

La technique de flottation sur saccharose diffère très peu de celle sur chlorure de sodium, citée précédemment. En effet la seule modification, apportée dans la méthodologie, est l'utilisation d'une solution de flottation de saccharose de densité 1,18.

Néanmoins plusieurs autres variations dans le protocole sont intervenues par la suite. En effet afin d'optimiser les performances de cette méthode plusieurs additifs ont été rajoutés à la technique classique.

➢ ***Utilisation de détergent :***

L'utilisation de détergents, couplée à la méthode de purification, permet de par leurs propriétés chaotropiques et leur capacité à rompre les interactions hydrophobes, de séparer les oocystes des débris, présents dans les fèces, ou des sédiments, présents dans l'eau (Musial *et al.*, 1987).

Ainsi l'addition de détergent à la suspension d'oocystes avant purification sera testée. Pour cela, 0,2 ml de Tween 80 20% sont ajoutés dans l'échantillon de 4 ml de selles contaminées avant purification, puis agités au vortex pendant 30 sec.

➢ ***Utilisation des ultrasons :***

La sonication a été testée, car elle permettrait de séparer mécaniquement les oocystes "accrochés" aux débris présents dans la suspension, ce qui faciliterait leur purification. D'après Musial *et al.*, 1987, l'utilisation d'ultrasons couplée à l'addition de détergent permettrait de faciliter le taux de récupération des oocystes après purification.

De plus, l'utilisation des ultrasons serait susceptible de provoquer la dispersion des agrégats d'oocystes quelquefois observés (notamment pour des isolats obtenus à partir de selles humaines), ce qui pourrait permettre de diminuer les variations et l'incertitude observées lors des comptages.

Une sonication de 20 sec a donc été réalisée avant purification sur des échantillons de 4 ml de selles contaminées mais également sur des mélanges selles-détergent constitués de 4 ml de selles contaminées additionnées de 0.2 ml de Tween 80 20% .

➢ ***Gradient de saccharose :***

La technique utilisée est celle développée dans le chapitre matériels et méthodes § I.2.3., la seule modification apportée étant le dépôt sur gradient du culot lavé obtenu après séparation sur FEA.

➢ ***Gradient de saccharose-phénol :***

Cette technique utilise le même principe que pour la séparation sur gradient de saccharose simple : Les oocystes se répartissent dans une solution de gradient suivant leur densité. Le gradient est constitué de deux phases : une phase supérieure constituée de 3 ml d'une solution de saccharose-phénol à 10% (v/v de la solution stock) et une phase inférieure constituée d'une solution à 60%.

La solution stock de saccharose-phénol (solution de Sheather) est réalisée par dissolution de 250 g de saccharose et 3.25 g de phénol dans 160 ml d'eau désionisée qsp.

Le culot d'oocystes récupéré après séparation sur FEA est remis en suspension dans 1 ml qsp d'eau désionisée et déposé à la surface du gradient préformé. Après une centrifugation de 20 min à 2500 g, les oocystes localisés à l'interface entre les deux solutions de saccharose-phénol, sont récupérés par aspiration des 4 à 5 ml supérieurs du gradient. Deux lavages successifs dans de l'eau désionisée sont ensuite réalisés.

Cette technique a été recommandée notamment par Datry *et al.*, 1989 et Current et Haynes, 1984 pour la purification de *Cryptosporidium* à partir de selles avant développement sur culture cellulaire.

A.I.1.4.- Expression des résultats et calcul des rendements de purification :

Les colorations en immunofluorescence directe sont réalisées sur des fractions d'échantillons de 25 µl déposées dans des cupules de lame multipuits. Pour chaque essai une série de 2 à 3 cupules est réalisée. Le dénombrement est réalisé par observation de la totalité de chaque cupule au microscope à épifluorescence.

Les oocystes dénombrés dans chaque cupule sont additionnés et rapportés au volume total d'échantillons examiné : la concentration en oocystes dans l'échantillon est déterminée ainsi suivant la formule (a) :

Equation (a) :

$$C = \frac{\sum_{i=1}^{i=x} Ni}{Vt}$$

avec C : concentration en oocystes dans l'échantillon (oocystes /L),

Ni : nombre d'oocystes identifiés dans chaque i cupule (avec i variant de 1 à x=3),

et Vt : volume total des x cupules analysées (en L).

Après avoir déterminé la concentration en oocystes dans l'échantillon testé le nombre total d'oocystes récupérés après purification est déterminé grâce à la formule (b) :

Equation (b) $$Nc = C \times Vc$$

avec Nc : Nombre total d'oocystes récupérés dans le culot de purification,

C : concentration en oocystes dans le culot purifié et Vc : volume total du culot.

La contamination artificielle des échantillons est réalisée à partir d'une suspension d'oocystes de concentration déterminée à partir de l'équation (a). Un certain volume de cette suspension sera inoculé aux échantillons de selles. Le nombre d'oocystes inoculés au départ sera noté Ne.

Les rendements de purification pour chaque essai sont représentés par le pourcentage d'oocystes retrouvés dans le culot après purification par rapport aux oocystes initialement inoculés à l'échantillon traité. Ces valeurs sont calculées à partir de l'équation (c) :

Equation (c) : $$\%R = \frac{Nc}{Ne} \times 100$$

avec %R : pourcentage de récupération des oocystes après purification,

Nc : Nombre d'oocystes récupérés dans le culot de purification,

et Ne : nombre d'oocystes inoculés dans l'échantillon de départ.

A.I.2.- RESULTATS ET DISCUSSION :

A.I.2.1.- Comparaison des 4 protocoles de purification principaux testés :

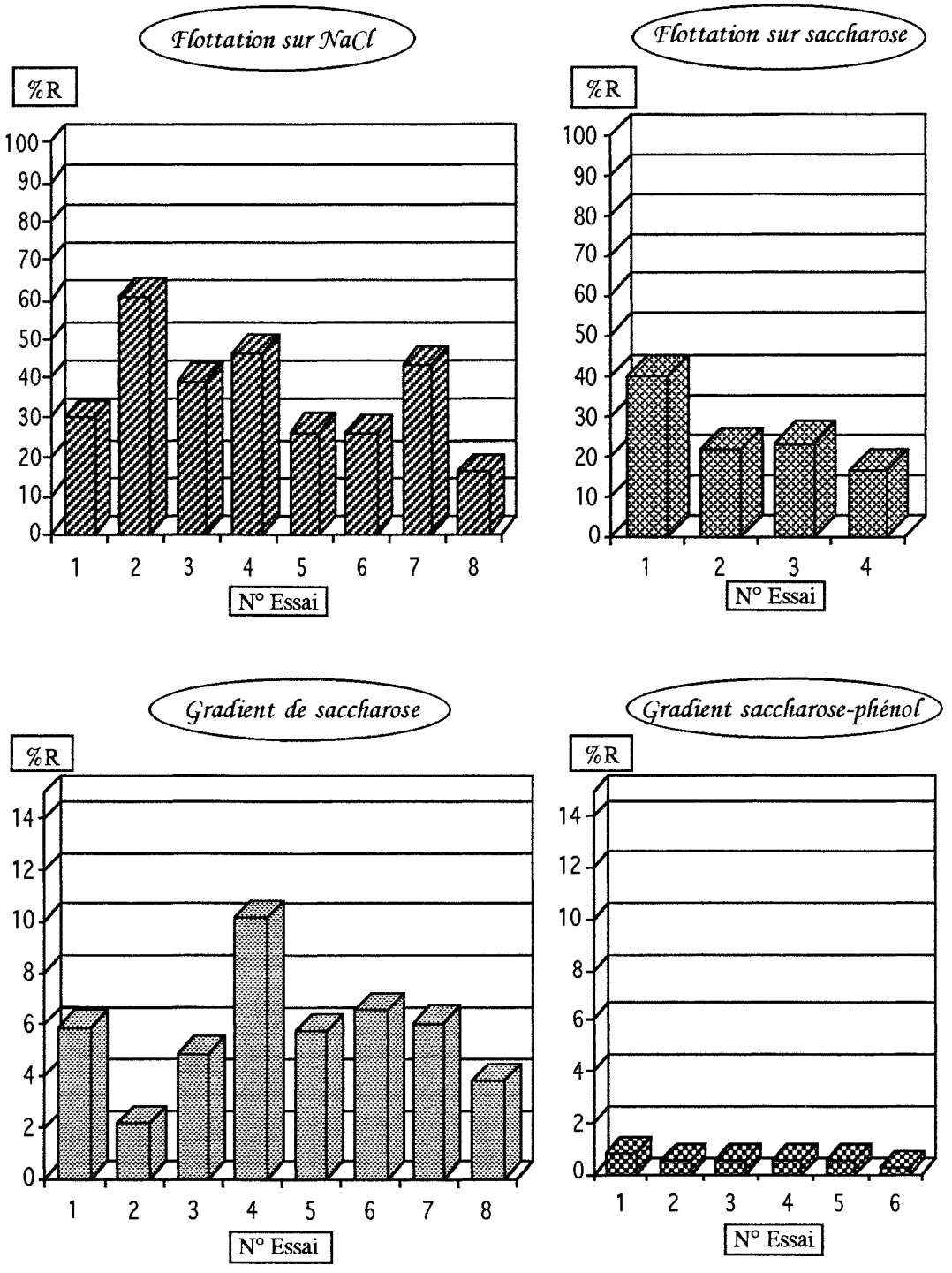
Les rendements de purification obtenus pour chaque essai réalisé au cours des 4 protocoles principaux testés, incluant la flottation sur NaCl, la flottation sur saccharose, la séparation sur gradient de saccharose simple et enfin le gradient de saccharose-phenol, sont regroupés dans la figure N°32 (détails des valeurs Annexe N°1 - tableau I).

Les deux témoins de contamination se sont révélés négatifs, ce qui indique que les oocystes détectés après purification proviennent donc bien uniquement de la contamination artificielle de départ.

Au vu des résultats représentés sur la figure N°32, il apparaît que bien qu'une grande variabilité soit décelable au sein d'une même série d'expériences, les deux premiers protocoles testés soit la flottation sur NaCl et sur saccharose, semblent présenter les meilleurs rendements de récupération.

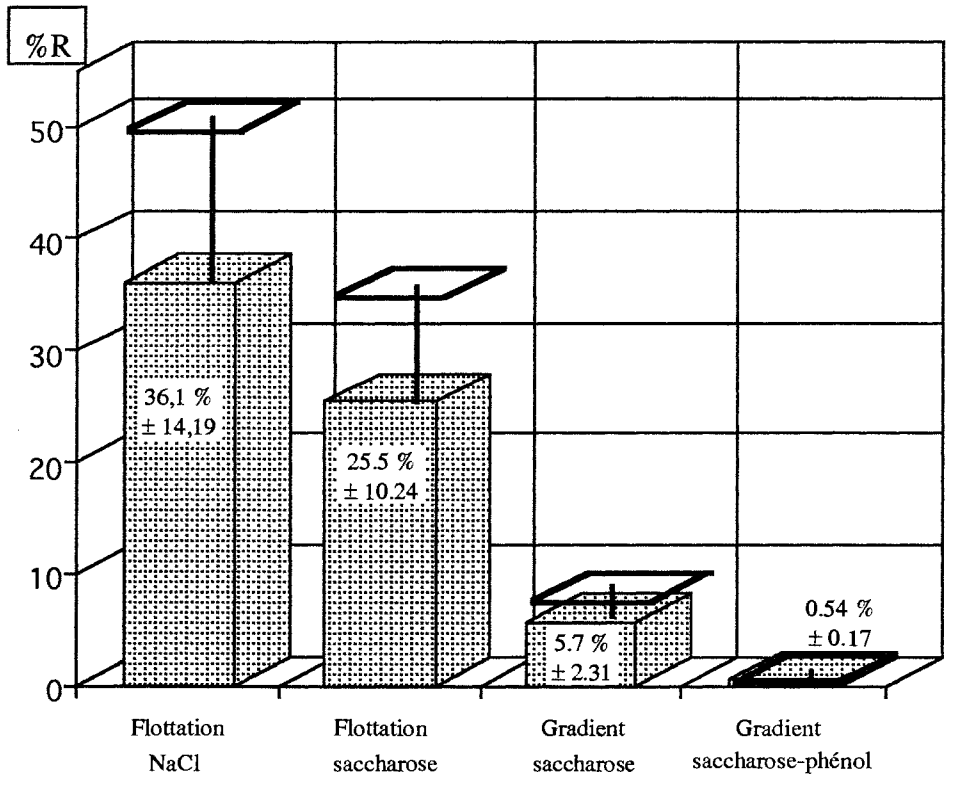
La figure N°33 permet de comparer les rendements moyens de chaque série d'essais réalisés selon les différents protocoles.

Figure N°32 : Pourcentage de récupération des oocystes pour chaque essai réalisé selon les 4 protocoles principaux testés.



D'après cette figure, une variation très importante du rendement de récupération des oocystes peut être remarqué selon le protocole de purification employé. Cette observation est confirmée après analyse de variance sur les rangs démontrant une différence significative au seuil de 5 % entre les 4 séries d'essais (p.c. = 0,0001).

Figure n°33 : Variation des pourcentages moyens de récupération obtenus selon le protocole de purification utilisé.



Il faut préciser que pour ces expériences les méthodes de comparaison statistiques utilisées se sont bornées à des tests non paramétriques, les populations concernées ne présentant pas de caractère Normal de par le nombre restreint d'échantillons testés.

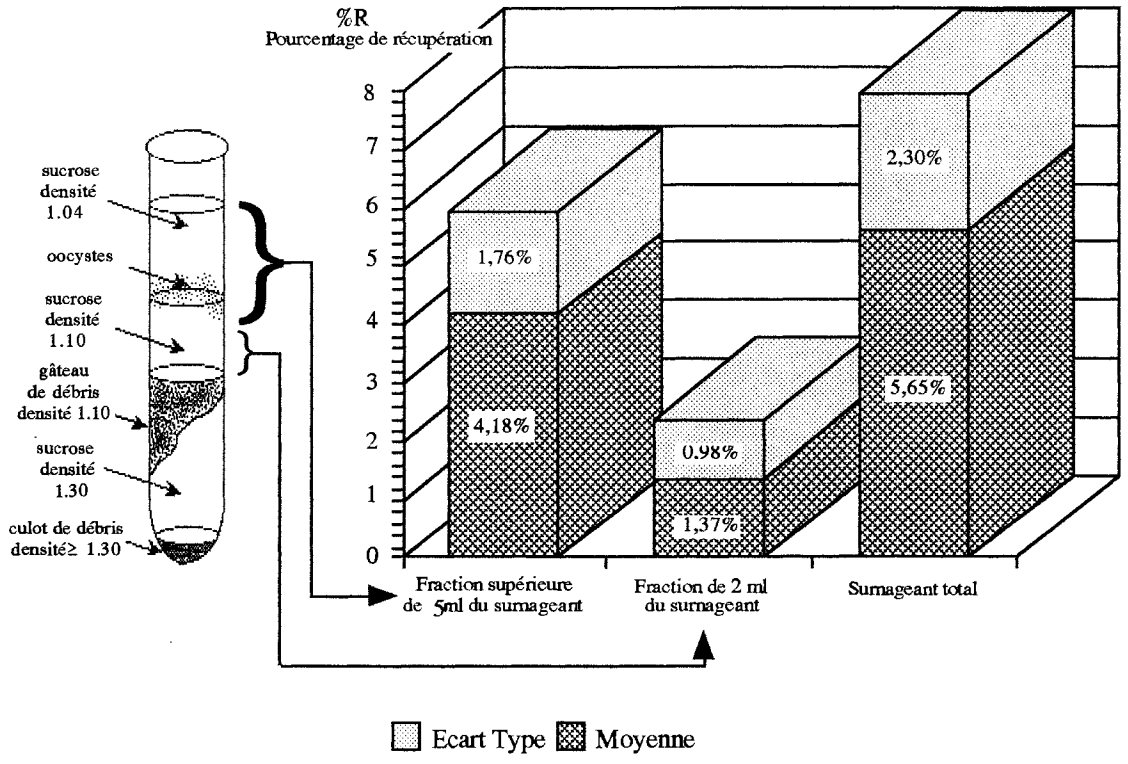
Il apparaît très nettement sur la figure N°33 que les protocoles incluant une étape de séparation sur gradient présentent les rendements de récupération les plus faibles, d'ailleurs une différence significative (au seuil de 5 %) avec les deux autres protocoles a été démontrée après comparaison entre les moyennes des séries deux à deux par un test PSLD de Fischer sur les rangs.

Une des hypothèses permettant de justifier les faibles rendements obtenus sur gradient, s'échelonnant de 0.54 à 5.7 % en moyenne, réside dans la migration des oocystes à l'intérieur du gradient : en effet les oocystes à l'intérieur des selles sont soumis à de nombreuses interactions qui provoquent la formation d'agrégats formés de débris et d'oocystes. Ces

agrégats de densité différente des oocystes isolés migrent différemment dans le gradient et ne sont donc pas récupérés à l'interface des phases supérieures mais plutôt dans les phases inférieures du gradient.

La répartition des oocystes à l'intérieur des premières phases du gradient de saccharose a été étudiée et témoigne de cette localisation dispersée (Figure N°34).

Figure N°34 : Répartition des oocystes dans les premières phases du gradient de saccharose.



Il apparaît effectivement sur la figure N°34 que des oocystes ont été décelés dans la phase saccharose de densité 1,10, reflétant la dispersion des oocystes à l'intérieur du gradient ce qui expliquerait pour une part le faible rendement de récupération obtenu pour ces techniques.

Ces deux éléments : dispersion des oocystes à l'intérieur du gradient et faible rendement de purification, laissent suggérer qu'une étape supplémentaire de purification serait nécessaire avant d'envisager une séparation des oocystes sur gradient. Cette étape permettrait d'éliminer les débris ayant échappé à la séparation sur FEA et qui associés aux oocystes sont susceptibles d'interférer dans la migration des oocystes à l'intérieur du gradient (voir § A.II.).

La Figure N°33 permet également de remarquer que la flottation sur NaCl permet d'obtenir des rendements de récupération plus importants que la flottation sur saccharose avec

des rendements moyens respectifs de 36.1% ± 14.19 contre 25.5% ±10.24. Cette différence significative a été confirmée au seuil de 1 % après analyse de variance et comparaison entre les moyennes des séries deux à deux par un test PSLD de Fischer sur les rangs.

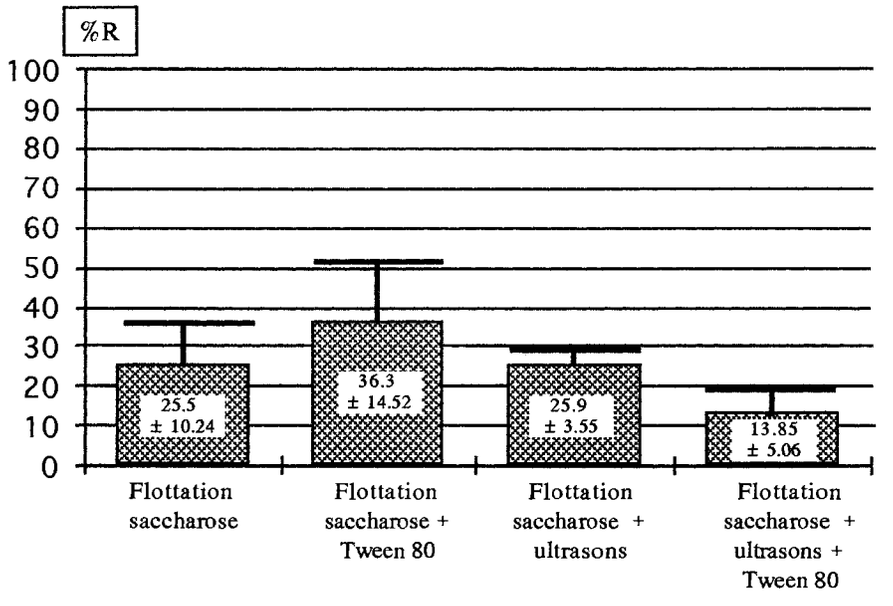
Cette différence pourrait être justifiée par la viscosité plus importante de la solution de saccharose par rapport à la solution de NaCl ce qui pourrait modifier la migration des particules de débris et d'oocystes mais également leur séparation.

A.1.2.2.- Utilisation des détergents et des ultrasons :

Cette partie de l'étude a permis de déterminer l'efficacité de l'utilisation de détergents ou d'ultrasons sur l'optimisation des rendements de récupération des oocystes lors de l'étape de purification.

Pour cela différents protocoles, incluant ou non, respectivement ou en association détergent et ultrasons, ont été testés et comparés (Figure N°35) (Annexe N°1 - tableau II).

Figure N°35 : Evolution des rendements de récupération moyens des protocoles de purification employant une flottation sur saccharose en fonction de l'utilisation couplée de détergent et / ou d'ultrasons.



D'après la Figure N° 35, il semblerait que l'utilisation de Tween 80 permettrait d'améliorer le rendement de récupération des oocystes comme l'avaient déjà suggéré Musial et al, 1987. Mais il faut remarquer que l'analyse statistique n'a permis de mettre en évidence aucune différence significative entre les rendements obtenus avec et sans utilisation de détergent ou d'ultrasons (après comparaison des moyennes des séries 2 à 2 par un test PSLD de Fischer sur les rangs au seuil de signification de 5%).

Une des hypothèses, permettant d'expliciter ce résultats, résiderait tout d'abord dans la nature des interactions entre oocystes et débris au cours de cette expérience et au cours de l'expérience de Musial *et al.*. En effet, les expériences effectuées dans cette étude ont été réalisées sur des échantillons contaminés artificiellement avec des suspensions d'oocystes ayant déjà subi une purification par FEA / flottation sur NaCl. Les interactions entre oocystes et débris mises en oeuvre au cours de cette étude ont donc pu présenter un caractère différent de celui décrit par Musial *et al.*, 1987. Ainsi, le traitement des oocystes avant contamination artificielle et le temps de contact assez court entre les oocystes et l'échantillon de selles avant la réalisation des expériences a pu minimiser les interactions potentielles habituellement mises en jeu et rompues par les détergents.

Par contre l'analyse statistique des résultats a pu mettre en évidence une différence significative (au seuil de 5 %) entre les rendements moyens obtenus lors de l'utilisation séparée et concomitante de détergent et d'ultrasons. Il apparaîtrait donc que l'utilisation de détergent couplée à l'utilisation d'ultrasons semblerait altérer les rendements de récupération des oocystes, ce qui pourrait s'expliquer par une détérioration éventuelle de la structure des oocystes par ultrasonication qui provoquerait une fragilisation de la résistance des oocystes vis-à-vis des détergents.

A.I.2.3.- Variation des rendements de récupération des oocystes suivant le niveau de contamination de départ :

Face aux faibles rendements de récupération obtenus pour les différents modes de purification testés, la question de l'influence du niveau de contamination de départ sur les résultats finaux a été soulevée.

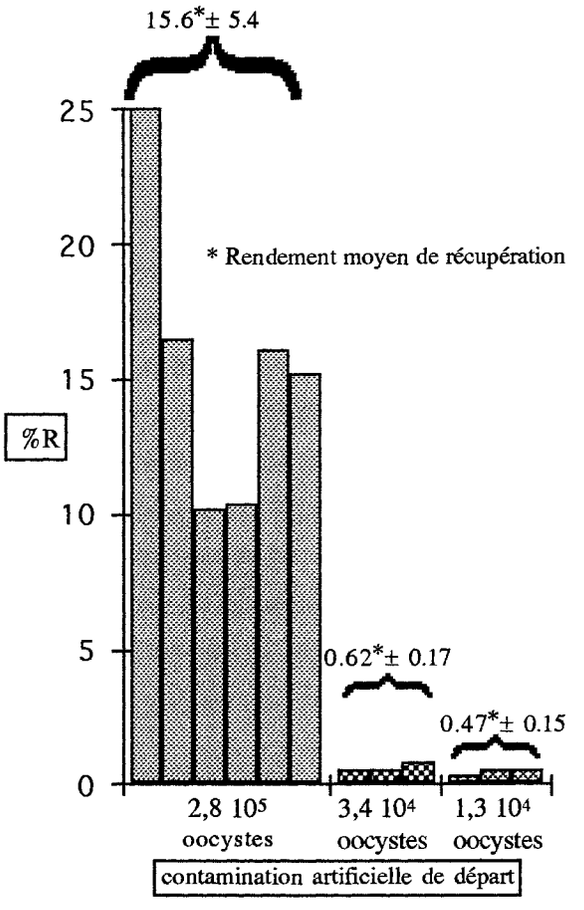
Le protocole de purification utilisant la séparation sur gradient de saccharose caractérisé par des rendements de récupération particulièrement faibles dans les conditions générales testées a servi de modèle pour l'évaluation de l'impact de ce facteur.

La figure N°36 regroupe les différents rendements de récupération obtenus pour les trois séries d'essais réalisés avec des contaminations variant de 1,3 10^4 à 2,8 10^5 oocystes pour 4 ml d'échantillons de selles de départ.

Il apparaît sur cette figure que le rendement moyen le plus important correspond à la série d'échantillons purifiés inoculés avec la quantité la plus importante d'oocystes. Une différence significative au seuil de 5% a d'ailleurs été mise en évidence, par analyse de variance

et test PSLD de Fischer sur les rangs, entre les rendements de récupération obtenus pour les concentrations artificielles élevées et ceux obtenus pour les contaminations inférieures.

Figure N°36 : Variation du pourcentage de récupération des oocystes après purification sur gradient de saccharose-phénol en fonction du niveau de contamination artificielle de départ.



Il faut par contre remarquer qu'à des concentrations variant de $1.3.10^4$ à $3.4\ 10^4$, le double, aucune différence significative dans le rendement de récupération n'a été décelée.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence la variation du rendement de récupération des oocystes en fonction de la contamination de départ. Il faut également préciser que l'augmentation des rendements obtenus n'est pas strictement proportionnelle au facteur d'augmentation de la quantité d'oocystes inoculés. Weber *et al.*, 1992, avaient déjà remarqué le même type de résultats lors de la comparaison des rendements de récupération de différentes procédures de purification pour des contaminations artificielles variant de 10^3 à $5\ 10^4$ oocystes/g de selles.

A.I.3.- CONCLUSION :

Au vu des résultats obtenus au cours de cette première partie de l'étude, il apparaît que le protocole de purification des oocystes incluant une séparation sur formol éthyl acétate et une flottation sur NaCl permet d'obtenir les meilleurs rendements de récupération des oocystes à partir d'échantillons de selles contaminées artificiellement. L'utilisation de détergents ou d'ultrasons n'a pas permis d'augmenter significativement les rendements obtenus dans les cas particuliers testés. Mais il faut signaler que ces résultats ne remettent pas en cause l'efficacité des détergents pour la rupture de certaines interactions oocystes-sédiments lors de la purification de *Cryptosporidium* à partir d'échantillons environnementaux comme l'avaient souligné Musial *et al.*, 1987.

Enfin, au vu de l'évolution des rendements de récupération en fonction du niveau de contamination de départ, il faut préciser que le protocole préconisé utilisant la flottation sur NaCl pourra être recommandé dans le cas d'échantillons faiblement contaminés. Pour de plus fortes contaminations que celles testées (supérieure à 10^6 oocystes/L) et notamment dans le cas de selles naturellement contaminées (excrétées par des sujets contaminés) d'autres investigations sont nécessaires afin de déterminer la meilleure technique de purification a adopter.

Les premiers résultats de cette étude ont donc permis de déterminer la méthode de purification permettant d'obtenir les meilleurs rendements de récupération dans le cas d'échantillons contaminés artificiellement. Cette technique sera donc utilisée tout au long de l'étude expérimentale notamment pour la clarification des échantillons d'eaux après concentration.

A.II.- PURIFICATION DES OOCYSTES À PARTIR DE SELLES RECOLTÉES AUPRES DE SUJETS CONTAMINES

L'objectif de cette seconde partie de l'étude est la récupération d'une quantité d'oocystes optimale alliée à un haut degré de pureté des suspensions. Ces deux caractéristiques sont particulièrement importantes notamment pour l'étude des caractéristiques de surface du parasite mais aussi lors des essais de développement sur culture cellulaire. Le rendement de la méthode ne sera donc pas le facteur déterminant du choix de la technique.

A.II.1.- MÉTHODES ET PROTOCOLES TESTES :

A.II.1.1.- Protocole général :

Plusieurs protocoles de purification ont été testés en vue d'évaluer leur performance pour concentrer et purifier les oocystes à partir d'échantillons de selles de veaux contaminées naturellement.

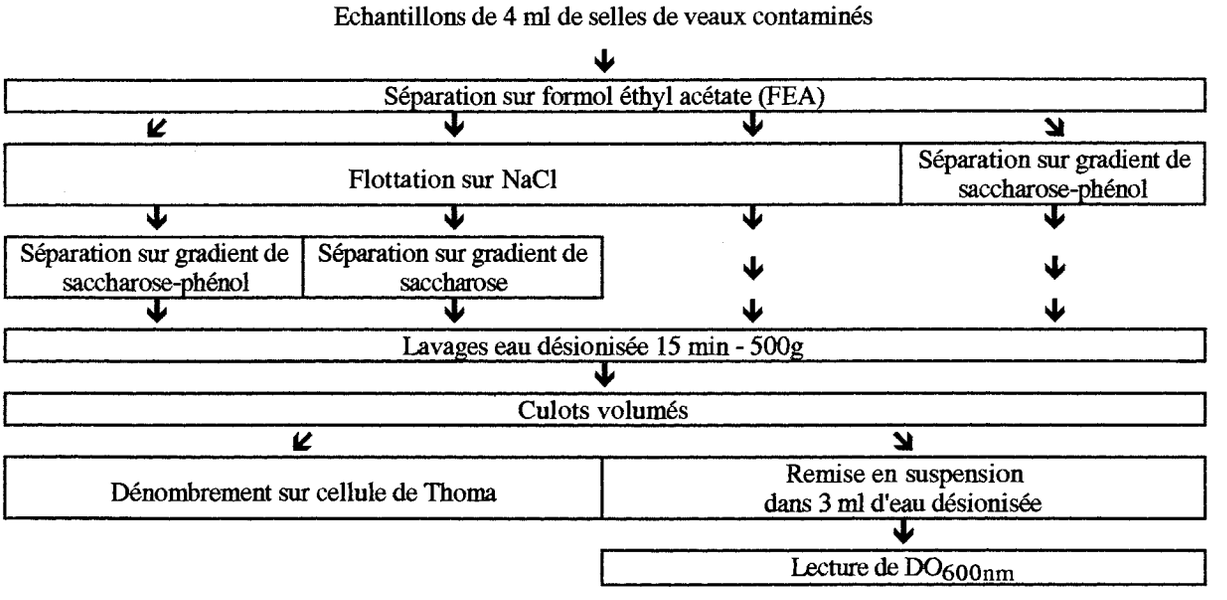
4 protocoles ont été testés :

- les deux premiers protocoles sont constitués de deux étapes principales : tout d'abord une séparation sur formol éthyl acétate puis soit une flottation sur NaCl soit une séparation sur gradient de saccharose-phénol.

- Les deux autres protocoles utilisent trois étapes de purification successives constituées toujours d'une séparation sur FEA puis d'une flottation sur NaCl et enfin d'une séparation soit sur gradient de saccharose soit sur gradient de saccharose-phénol.

Le protocole général est résumé sur la figure N°37.

Figure N°37 : Protocole général de concentration-purification d'oocystes à partir de selles contaminées naturellement.



Les performances des différentes techniques testées ont été évaluées et comparées

- suivant tout d'abord la quantité d'oocystes purifiés rapportée au volume d'échantillon de selles analysé : ce qui permet d'obtenir des renseignements sur l'efficacité des techniques pour concentrer les oocystes.

- et ensuite suivant de le degré de purification obtenu par détermination de la densité optique à 600 nm de la suspension concentrée.

A.II.1.2.- Méthodes spécifiques utilisées :

Les différentes étapes de purification utilisées emploient les mêmes méthodes que celles décrites dans le paragraphe A.I.1.3..

Le dénombrement sur cellule de Thoma est réalisé selon la méthode décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes § I.3.1..

Le degré de pureté de la suspension d'oocystes purifiée est évalué par lecture de densité optique au spectrophotomètre (Spectronic 20, Bausch et Lomb) à une longueur d'onde de 600 nm. Le tube témoin (blanc) est constitué d'une solution d'eau désionisée. Les tubes essais sont constitués du culot total obtenu après purification remis en suspension dans 3 ml d'eau désionisée.

A.II.1.3.- Expression des résultats :

Le dénombrement des oocystes dans les culots de purification est réalisé sur cellule de Thoma. 3 à 6 lectures sont réalisées, chaque lecture représentant l'examen de la totalité d'une grille de cellule de comptage soit 0,064 µl.

Les oocystes dénombrés sur chaque grille sont additionnés et rapportés au volume total d'échantillon examiné selon la formule (a) :

Equation (a) : $$C = \frac{\sum_{i=1}^{i=x} Ni}{Vt}$$

avec C : concentration en oocystes dans le culot purifié (oocystes /L),

Ni : nombre d'oocystes identifiés pour chaque i grille (avec i variant de 1 à x=6),

et Vt : volume total des x grilles analysées (soit en L : x X $0{,}064.10^{-6}$).

Le nombre d'oocystes récupérés après purification dans l'ensemble du culot (Nc) est ensuite déterminé en multipliant C par le volume total de culot obtenu (Vc : en L).

La concentration d'oocystes initialement présente dans la selle avant purification sera alors estimée pour chaque essai réalisé dans le cadre de chaque protocole de purification testé.

La formule (b) permet de calculer cette concentration estimée (oocystes/L) :

Equation (b) : $$Ci = Nc / Ve$$

avec Ci : concentration initiale estimée d'oocystes dans l'échantillon de selles de départ,

Nc : Nombre total d'oocystes dans le culot de purification,

Ve : volume d'échantillon de selle purifié en L pour chaque essai de purification (dans tous les cas testés Ve était 4 ml).

Sachant que tous les essais ont été réalisés à partir d'échantillons provenant de la même selle de départ, les concentrations initiales en oocystes dans l'échantillon de selle estimées selon les différents protocoles de purification pourront être comparées afin de déterminer le protocole permettant de récupérer le plus grand nombre d'oocystes après purification.

Les tests statistiques utilisés dans cette partie de l'étude ont été réalisés sur des valeurs transformées en log afin de travailler sur des échantillons de caractère Normal.

A.II.2.- RESULTATS ET DISCUSSION :

A.II.2.1.- Concentration et récupération des oocystes après purification :

Pour chaque série d'essais réalisée les concentrations initiales en oocystes estimées après purification ont été déterminées. Elles sont regroupées dans le tableau N°30.

Tableau N°30 : Concentration initiale en oocystes estimées dans l'échantillon de selles analysé selon les différents protocoles de purification employés.

Protocole de purification utilisé	FEA + flottation NaCl + gradient saccharose-phénol	FEA + flottation NaCl + gradient saccharose	FEA + flottation NaCl	FEA + gradient saccharose-phénol
Concentration estimée dans l'échantillon de départ (oocystes /L)	$3.87\ 10^8$	$5.8\ 10^8$	$7.2\ 10^8$	$8.55\ 10^8$
	$2.58\ 10^8$	$5.7\ 10^8$	$4.75\ 10^8$	$1.92\ 10^8$
	$4.9\ 10^8$	$7.65\ 10^8$	$3.4\ 10^8$	$1.62\ 10^8$
	$3.44\ 10^8$	$2.3\ 10^8$	$1.53\ 10^9$	-
	$3.85\ 10^8$	$4.9\ 10^8$	$2.44\ 10^9$	-
	$3.9\ 10^8$	$2.78\ 10^8$	-	-
	-	$4.45\ 10^8$	-	-
	-	$3.9\ 10^8$	-	-
Concentration moyenne estimée pour chaque série d'essais et écart type	$3.76\ 10^8 \pm 7.5\ 10^7$	$4.54\ 10^8 \pm 1.8\ 10^8$	$1.1\ 10^9 \pm 8.8\ 10^8$	$4.03\ 10^8 \pm 3.9\ 10^8$

D'après les résultats présentés dans ce tableau il semble que le protocole de purification utilisant une séparation couplée à une flottation sur NaCl seule permette d'isoler une plus grande quantité d'oocystes que les autres protocoles pour le même échantillon de départ. Une analyse de variance classique sur les différentes séries d'essais, après transformation des valeurs de concentration en log, a permis effectivement de mettre en évidence une différence significative

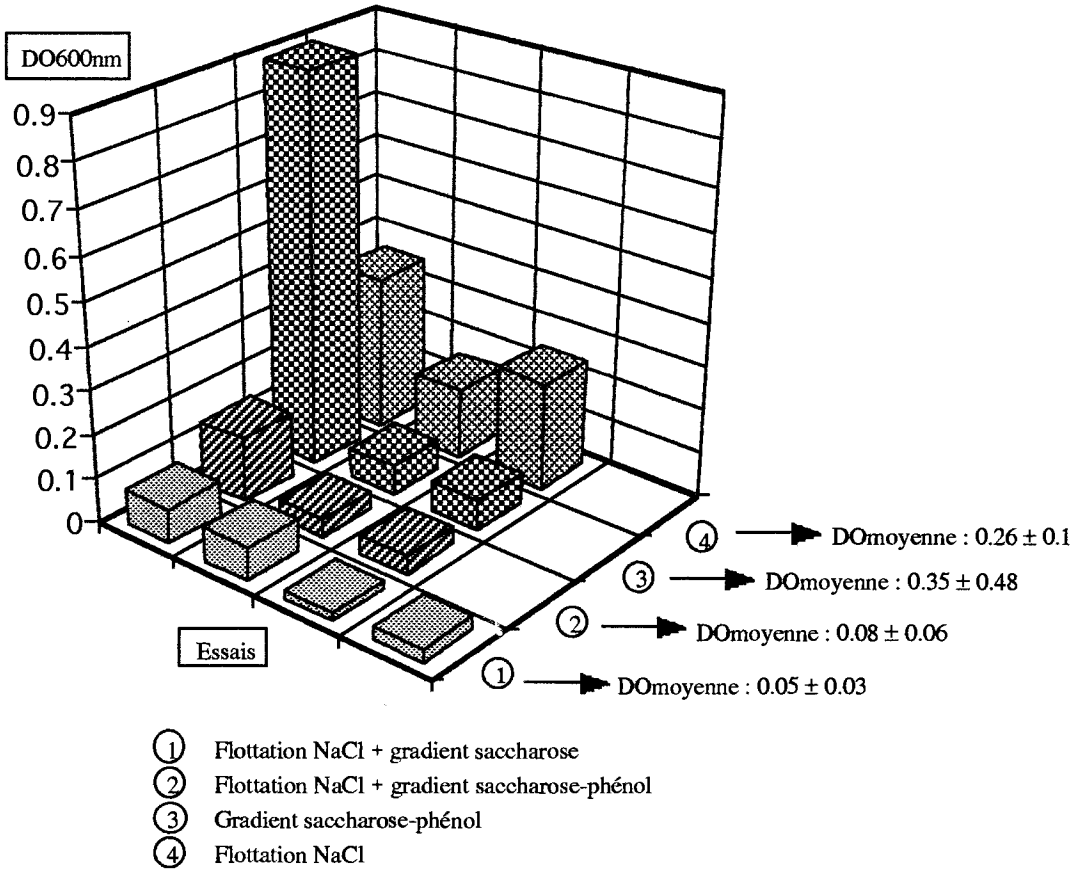
au seuil de 10% (p.c. = 0.07) et après comparaison 2 à 2 des moyennes par le test PLSD de Fischer une différence significative au seuil de 10% entre les résultats obtenus pour le protocole employant seulement une flottation sur NaCl et ceux obtenus pour les autres protocoles de purification testés.

Mais avant de qualifier cette méthode pour la purification des oocystes à partir des selles pour la suite de l'étude, il est nécessaire qu'elle réponde à une deuxième exigence qui est la pureté de la suspension purifiée.

A.II.2.2.- Estimation du degré de purification obtenu selon les différents protocoles :

Le degré de pureté des suspensions d'oocystes purifiées selon les différents protocoles a été évalué par mesure de densité optique à 600 nm. Ces mesures ont permis d'évaluer le degré de turbidité relatif à la présence plus ou moins importante de matières en suspension résiduelles dans les suspensions analysées.

Figure N°38 : Degré de pureté obtenu pour chaque protocole de purification testé, évalué par mesure de DO_{600}.



D'après les résultats présentés sur la figure N°38, il apparaît que la flottation sur NaCl ne permet d'obtenir qu'un degré de purification assez médiocre avec une DO moyenne des suspensions de 0.26 ± 0.1.

Par contre si une étape supplémentaire de séparation sur gradient est ajoutée à ce protocole une amélioration significative (au seuil de 5% (p.c. = 0.025 par ANOVA) du degré de purification est obtenu avec des valeurs de DO_{600} variant de 0.05 ± 0.03 pour le gradient de saccharose et 0.08 ± 0.06 pour le gradient de saccharose phénol.

La flottation sur saccharose phénol sans adjonction de l'étape préliminaire de flottation sur NaCl ne permet par contre pas d'obtenir d'aussi bons rendements ; avec une DO moyenne de 0.35 ± 0.48, elle témoigne surtout d'une grande variabilité dans les résultats obtenus allant de 0.9 unité de DO à 0.07. Le manque de reproductibilité de cette technique n'a donc pas permis de la plébisciter.

Le degré élevé de pureté des suspensions obtenu après purification en 3 étapes, par séparation sue FEA, flottation sur NaCl et enfin séparation sur gradient , peut s'expliquer par l'intervention d'un processus d'affinage successif qui a permis de séparer séquentiellement les oocystes des débris.

La première étape de séparation sur formol éthyl acétate a permis tout d'abord d'éliminer les particules liposolubles grâce à la partition des matières en suspension entre une phase hydrophile (eau formolée) et une phase plus hydrophobe (éthyl acétate).

La flottation sur NaCl ensuite a permis d'isoler en deux groupes les particules en suspension selon leur densité supérieure ou inférieure à 1.10. Cette étape a permis de se débarrasser des plus gros débris gênants.

La dernière étape de séparation sur gradient a enfin permis d'effectuer un dernier affinage en séparant les plus petites particules entre elles toujours selon leur densité mais à une échelle beaucoup plus fine.

Cet affinage successif a enfin permis de pallier aux problèmes de variabilité des résultats décelés notamment pour le protocole 3 (Figure N°38). Lors de ce protocole n'incluant pas d'étape préliminaire de flottation sur NaCl mais seulement une séparation sur gradient de saccharose-phénol, la migration des gros amas de particules n'a pu être maîtrisée dans tous les cas provoquant une grande variabilité des valeurs de DO. La présence de très nombreuses particules a pu en effet gêner leur répartition sélective à l'intérieur du gradient.

A.II.3.- CONCLUSION :

Globalement, si une séparation sur FEA couplée à une étape de flottation sur NaCl permet de récupérer les plus grandes quantités d'oocystes à partir d'échantillons de selles contaminées naturellement , elle ne garantit pas un degré de purification suffisant pour pouvoir envisager d'étudier les caractéristiques intrinsèques du parasite isolé.

Ce protocole de purification pourra donc être envisagé notamment pour la préparation de suspension d'oocystes semi-purifiée nécessaire lors de la confection d'inoculum pour les contaminations artificielles d'échantillon.

L'utilisation d'un protocole de purification en trois phases permet par contre d'allier un degré de purification des suspensions très intéressant et le regroupement d'une quantité d'oocystes encore assez élevée avec la concentration de 4 10^8 oocystes en moyenne par litre d'échantillon soumis à purification. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les résultats obtenus pour l'emploi d'un gradient de saccharose simple ou d'un gradient de saccharose-phénol.

Dans ces conditions, le gradient de saccharose a été choisi en raison de sa simplicité de réalisation.

Etude des caractéristiques de surface de Cryptosporidium

B - ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE SURFACE DE CRYPTOSPORIDIUM

Dans le cadre de l'évaluation des performances des systèmes de microfiltration pour l'élimination de Cryptosporidium dans les eaux de surface, des informations sur les caractéristiques de surface des oocystes sont indispensables. La compréhension et la maîtrise des phénomènes régissant l'adsorption des oocystes passent nécessairement par l'évaluation de l'hydrophobicité et des propriétés électrostatiques de surface du parasite. En effet, le caractère hydrophobe et le potentiel Zéta sont deux facteurs qui en corrélation avec la composition chimique et la structure du parasite, interviennent d'une façon significative dans les mécanismes complexes d'adhésion des microorganismes aux particules en suspension ou encore aux surfaces filtrantes.

Néanmoins, il est impossible d'expliquer l'adsorption préférentielle des cellules microbiennes d'une espèce particulière en se référant à l'action d'une force unique ou à une balance simple des énergies ou charges de surface.

De plus, l'analyse globale des mécanismes est compliquée par les effets du pH et de la force ionique sur la double couche électrocinétique des cellules ou des particules adsorbantes.

Selon Badenoch, 1990, des études sur les propriétés physico-chimiques de surface des oocystes sont actuellement en cours au Scottish Parasite Diagnostic Laboratory . Aucune autre information n'étant pour l'instant disponible , l'objectif de cette étude s'est focalisé sur la détermination de l'hydrophobicité et des caractéristiques de surface de Cryptosporidium. De plus, afin d'évaluer l'impact de certains facteurs environnementaux et expérimentaux qui pourraient intervenir en modifiant les caractéristiques intrinsèques de surface du parasite, les mesures d'hydrophobicité et de potentiel Zéta ont été réalisées pour différentes conditions de pH, force ionique ou conductivité.

Du point de vue méthodologique, si la technique microélectrophorétique mise en oeuvre pour la détermination du potentiel Zéta d'une particule colloïdale est bien définie, en revanche, un éventail assez vaste de méthodes est proposé pour l'évaluation de l'hydrophobicité des cellules microbiennes . Une étude méthodologique préliminaire a donc permis d'adapter une de ces techniques pour l'évaluation de l'hydrophobicité de Cryptosporidium.

B.I.- EVALUATION DE L'HYDROPHOBICITE ET DU POTENTIEL ZETA DE CRYPTOSPORIDIUM : PRINCIPE ET METHODOLOGIE :

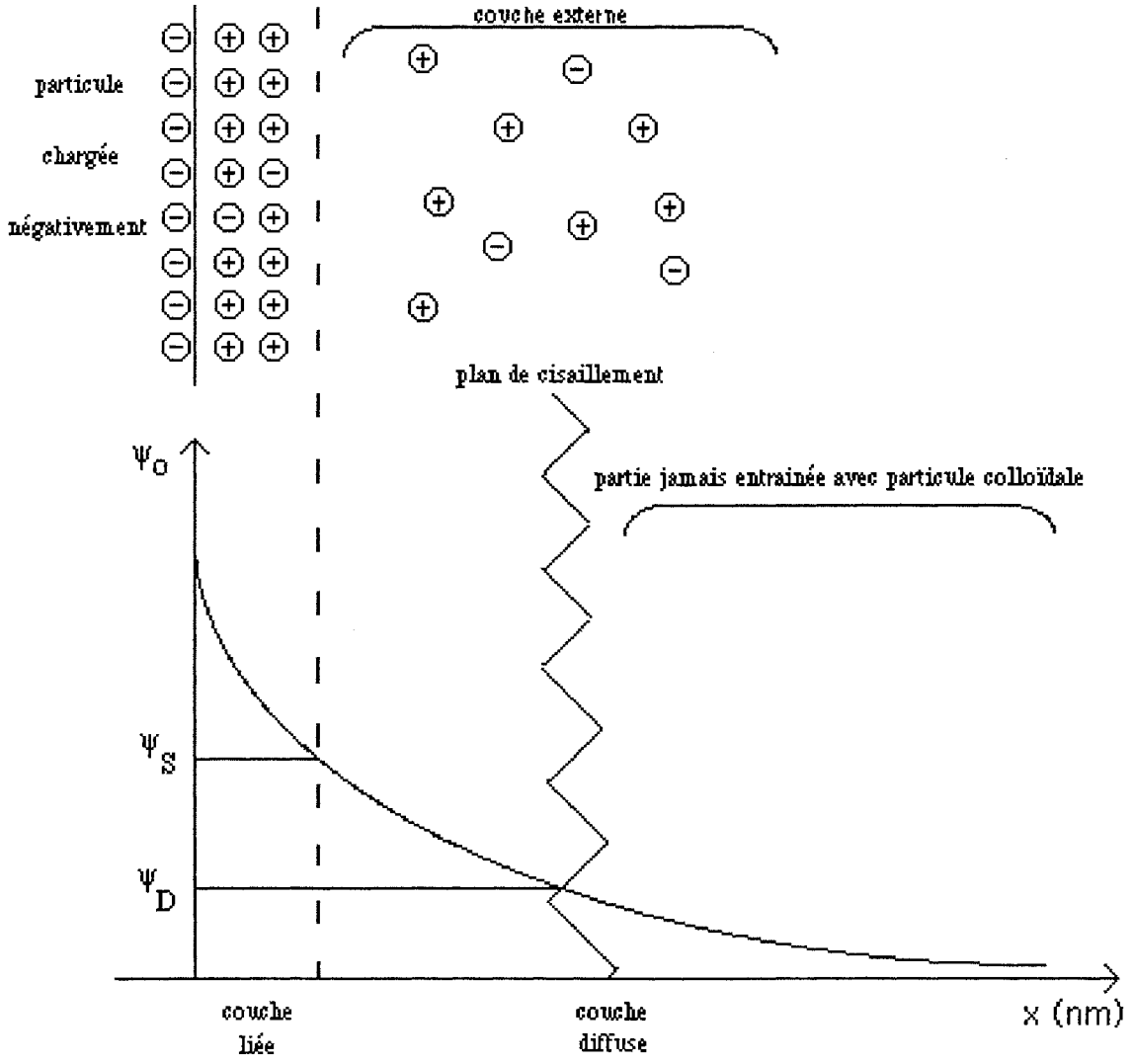
B.I.1.- POTENTIEL ZETA : Principe :

Le potentiel Zéta est caractéristique de la suspension et détermine la mobilité électrophorétique des particules. Il correspond au potentiel et donc aux charges portées par la particule.

Les valeurs du potentiel Zéta apportent des renseignements et des précisions sur les interactions et les énergies mises en jeu notamment au cours de la coagulation mais également plus généralement sur la stabilité des substances colloïdales et leur comportement.

Le potentiel Zéta ou potentiel électrocinétique se situe dans la couche mobile à l'endroit où se trouve le plan de cisaillement, ce plan délimitant la couche liquide adhérent à la particule de la couche mobile. Souvent Ψ_D (potentiel de la double couche diffuse) est assimilé au potentiel Zéta et on relève des valeurs de -10 à -50 mV (pour eaux naturelles et usées).

Figure N° 39 : Potentiel et charge de surface d'une particule colloïdale.



La figure N°39 représente la surface d'une particule et la répartition des charges selon le modèle de la double couche de Stern, avec Ψ_O : Potentiel de surface, Ψ_S : Potentiel de Stern et Ψ_D : Potentiel correspondant au plan de cisaillement, assimilable au potentiel Zéta électrocinétique.

Des mesures de potentiel Zéta peuvent être réalisées directement grâce à la détermination de la vitesse de migration de la particule dans un champ électrique.

En général il est établi des corrélations entre la variation du potentiel Zéta et la variation d'un paramètre que l'on a choisi (pH, f.i., potentiel redox, concentration d'un ion, température, ...).

La méthode utilisée au cours de cette étude est décrite dans le chapitre matériels et méthodes § II.1..

B.I.2.- HYDROPHOBICITE::

B.I.2.1.- Principe :

Rosenberg a beaucoup étudié l'hydrophobicité de surface des bactéries (Rosenberg *et al.*, 1980, 1986, 1991), mais ce concept n'est pas un sujet d'intérêt réduit uniquement à la bactériologie, en effet cette théorie est impliquée également dans l'adhésion, entre autre, des virus, levures et cellules eucaryotes (Shields and Farrah, 1983 ; Ouchi and Akiyawa, 1971 ; Hills, 1984 ; Reuvewy *et al.*, 1983).

Les interactions hydrophobes sont impliquées dans de nombreux cas d'adhésion comme la partition aux interfaces huile-eau et air-eau, l'adhésion aux matériaux plastiques, aux surfaces aquatiques submergées, aux surfaces minérales, ...

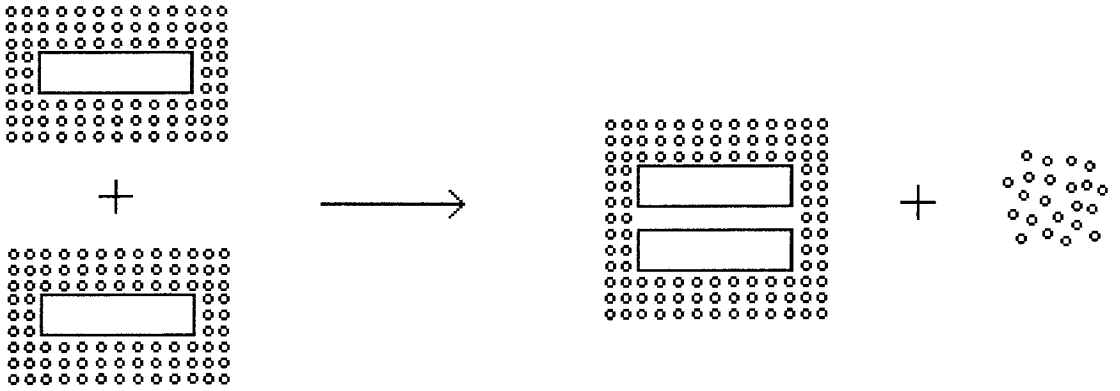
Reed and Rice, 1931, ont montré que certaines bactéries (mycobactéries,...) sont capables de passer d'une phase aqueuse à une phase hydrocarbonée par agitation vigoureuse.

Une majorité de bactéries sont facilement mises en suspension en milieu aqueux grâce aux composants polaires et hydrophiles qui constituent la surface bactérienne. En fait, la capacité de certaines bactéries à adhérer aux "gouttes d'huile" à l'interface "huile - eau", est obtenue grâce à l'intervention de molécules amphipatiques interagissant avec les deux phases "huile" et eau.

Similairement les surfaces auxquelles adhèrent les bactéries sont constituées de composants polaires et apolaires. C'est le degré de chacun qui détermine l'importance et la structure de la couche proximale d'eau et donc qui conditionne la favorabilité énergétique de l'adhésion (Figure N°40).

Figure N° 40 : Agrégation de deux solutés non polaires par interactions hydrophobes.

Lorsque les deux solutés apolaires séparés (représentés par les rectangles (à gauche), recouverts par une couche ordonnée de molécules d'eau (représentées par les ronds), interagissent, les molécules d'eau sont relarguées dans la phase aqueuse (à droite). (Rosenberg et al., 1986)



C'est donc le rapport entre composants hydrophobes et hydrophiles qui détermine la contribution des interactions hydrophobes dans les phénomènes d'adhésion.

Du point de vue méthodologique, si la technique microélectrophorétique mise en oeuvre pour la détermination du potentiel Zéta d'une particule colloïdale est bien définie, en revanche, un éventail assez vaste de méthodes est proposé pour l'évaluation de l'hydrophobicité des cellules microbiennes, notamment :

* la mesure d'angle de contact (Van Oss and Gilmann, 1972)
* le test d'agrégation en milieu salin (Lindahl *et al.*, 1981)
* les sondes moléculaires hydrophobes (Hill *et al.*, 1963)
* la chromatographie d'interaction hydrophobe (Hjerten *et al.*, 1974)
* l'adhésion aux solides hydrophobes (Rosenberg *et al.*, 1981)
* ou encore le test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (AMH) (Rosenberg *et al.*, 1980)

Le tableau N°31 représente une synthèse des différentes techniques mises au point pour évaluer le caractère hydrophobe de différents microorganismes.

Parmi toutes ces techniques, le test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (AMH) apparaît comme le plus aisé d'application et le plus souvent employé dans la littérature. Cette technique est basée sur le degré d'adhérence des cellules sur un liquide hydrocarboné, comme l'octane ou l'hexadécane, après une brève période d'agitation (Rosenberg *et al.*, 1980, 1986, 1991).

Ainsi la partition des oocystes de *Cryptosporidium* à l'interface octane-eau pourra être déterminée, afin d'apprécier leur capacité à établir des liaisons hydrophobes à leur surface.

L'évaluation du caractère hydrophobe de surface de *Cryptosporidium* sera donc déterminé par cette méthode après adaptation du test à ce modèle de microorganisme.

Tableau N°31 : Principe et description des différentes méthodes employées dans la littérature pour l'évaluation de l'hydrophobicité de surface des microorganismes.

TEST	PRINCIPE	COMMENTAIRE
Chromatographie d'interaction hydrophobe Hjerten *et al.*, 1974	Composition de la colonne : Suspension aqueuse de billes de sépharose liées de façon covalente à des groupements hydrophobes (phényl, ...) . Dépot des cellules sur la colonne et détermination de la rétention (par turbidimètrie, mesure UFC, ...).	Rétention des microorganismes par interactions hydrophobes mais aussi selon la taille des microorganismes : la colonne de bille jouant aussi un rôle de filtre "mécanique"
Mesure de l'angle de contact Van Oss and Gillman, 1972	Une petite goutte d'eau est déposée sur une surface cellulaire et l'angle de contact obtenu entre la surface et la tangente à la goutte est mesurée. Donc plus la surface est hydrophobe, plus la goutte sera bombée et donc plus l'angle de contact sera important.	La pénétration de la goutte d'eau se fait progressivement dans le film, la surface n'étant pas toujours parfaitement plate. De plus, l'hydrophobicité interne du film n'est pas évaluée
MATH test (Test d'Adhésion Microbienne aux Hydrocarbures) Rosenberg *et al.*, 1980	Technique basée sur le degré d'adhérence des cellules sur un liquide hydrocarboné (octane ou hexadécane) après une brève période d'agitation. Le pourcentage de cellules retenues à l'interface hydrocarbure-eau est déterminé par mesure de densité optique dans la phase aqueuse avant et après le test.	Les cellules peuvent adhérer aux parois du tube. Toxicité de l'hydrocarbure : risque de lyse des cellules.
Sondes moléculaires hydrophobes Hill *et al.*, 1963 Kjelleberg *et al.*, 1980	Des molécules de surfactant chargées (habituellement négatives) sont ajoutées aux suspensions de microorganismes : une mesure de la mobilité électrophorétique est ensuite réalisée, celle-ci étant modifiée suivant le nombre de molécules de surfactant s'étant liées par interactions hydrophobes aux surfaces cellulaires. D'autres molécules comme l'acide dodécanoïque marquée radioactivement ont été utilisées permettant de donner des informations sur le nombre de sites de fixation présents sur les surfaces cellulaires.	Petite taille des sondes : elles peuvent s'intercaler dans l'enveloppe cellulaire et se fixer sur des sites internes par rapport à la surface cellulaire
Test d'agrégation en milieu salin Lindhal *et al.*, 1981	Les cellules sont mises en suspension dans une solution diluée de tampon phosphate et une addition de sulfate d'ammonium est réalisée jusqu'à ce qu'il y ait agrégation. Plus les cellules ont un caractère hydrophobe important plus elles ont tendance à précipiter à de faibles concentrations salines.	Les fortes concentrations en sels risquent de modifier la surface cellulaire
Adhésion à des solides hydrophobes Rosenberg, 1981	Mesure de l'adhésion de cellules sur une surface de polystyrène réalisée habituellement par dénombrement.	———

B.I.2.2.- Adaptation du test AMH pour l'évaluation de l'hydrophobicité de Cryptosporidium :

B.I.2.2.1.- Protocoles et méthodes utilisées :

➢ *Oocystes de Cryptosporidium :*

Des échantillons de selles de veaux contaminées par *Cryptosporidium* ont été récoltés et stockés à 4°C en présence de 2.5% de dichromate de potassium. Les oocystes sont ensuite purifiés en 3 étapes, comprenant une séparation sur formol éthyl acétate, une flottation sur NaCl et enfin une séparation sur gradient de saccharose, puis lavés et remis en suspension dans de l'eau désionisée.

➢ *Test AMH :*

Cette technique est basée sur le degré d'adhérence des cellules (les oocystes) sur un liquide hydrocarboné (ici l'octane) après une brève période d'agitation.

Le pourcentage d'oocystes retenus à l'interface octane-eau est déterminé par mesure de densité optique (DO) dans la phase aqueuse avant et après agitation. 2,5 ml de suspension d'oocystes concentrée sont déposés dans un tube de verre de 12 mm de Ø, puis vortexés pendant 120 secondes. Ce tube représente le témoin. Une mesure de densité optique (DO) à une longueur d'onde adaptée aux oocystes, est réalisée avant et après agitation. Ces mesures permettent d'évaluer et de prendre en compte l'éventuelle adhésion des oocystes sur les parois du tube en verre. En parallèle, la même suspension d'oocystes de 2,5 ml est additionnée de 1 ml d'octane (99%) et vortexée pendant 120 secondes. Après une période de repos de 5 min, 3 phases distinctes sont observées : (1) une phase supérieure composée d'octane, (2) une phase intermédiaire constituée de l'émulsion octane-oocystes-eau, (3) une phase aqueuse inférieure (voir § II.2., Chapitre Matériels et Méthodes).

Le pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane par interactions hydrophobes est déterminé par l'équation (a) : $\%A_{DO} = \dfrac{DOt\lambda - DOe\lambda}{DOt\lambda}$

avec $\%A_{DO}$: Pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane calculé à partir des valeurs de DO ;
$DOt\lambda$: mesure de densité optique dans le tube témoin
$DOe\lambda$: mesure de densité optique dans le tube essai
} Après agitation puis repos.

➢ *Adaptation au modèle Cryptosporidium :*

Afin d'adapter le test AMH à *Cryptosporidium*, des spectres d'adsorption ont été réalisés sur des suspensions purifiées d'oocystes afin de définir la longueur d'onde optimale à laquelle doivent être effectuées les lectures de DO du test. Des mesures de variation de $DO\lambda$ en

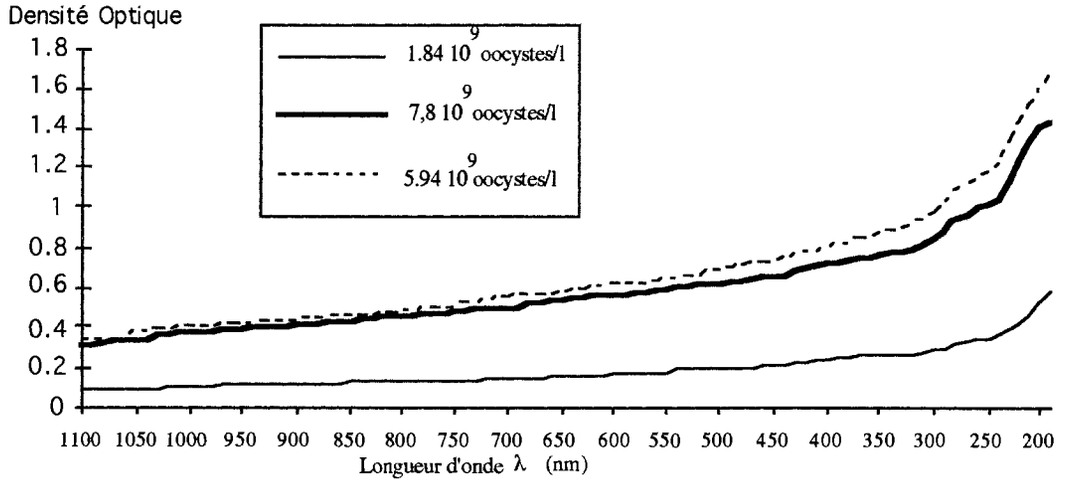
fonction de la concentration en oocystes ont également été effectuées en vue d'évaluer la représentativité des valeurs de DO comme indicateur de variations de la quantité d'oocystes présente au cours du test. Enfin la fiabilité des résultats du test obtenu par mesure de DOλ a été vérifiée par dénombrement des oocystes dans la phase aqueuse à chaque mesure de DOλ. Les échantillons prélevés sont soit colorés par immunofluorescence (*Cryptosporidium* "detect", EUROBIO) et dénombrés au microscope à épifluorescence (x400) soit numérés directement à l'aide d'une cellule de Thoma au microscope optique (x400).

B.I.2.2.2.- Résultats et discussion :

➢ *Détermination de la longueur d'onde adaptée pour les mesures de DO :*

Trois spectres optiques balayant toutes les gammes de longueurs d'ondes (de 1100 à 200 nm) ont été réalisés pour des suspensions de concentrations différentes en oocystes (Figure N° 41).

Figure N° 41 : Spectre d'adsorption des suspensions de *Cryptosporidium* purifiées par FEA-NaCl-Gradient de saccharose.



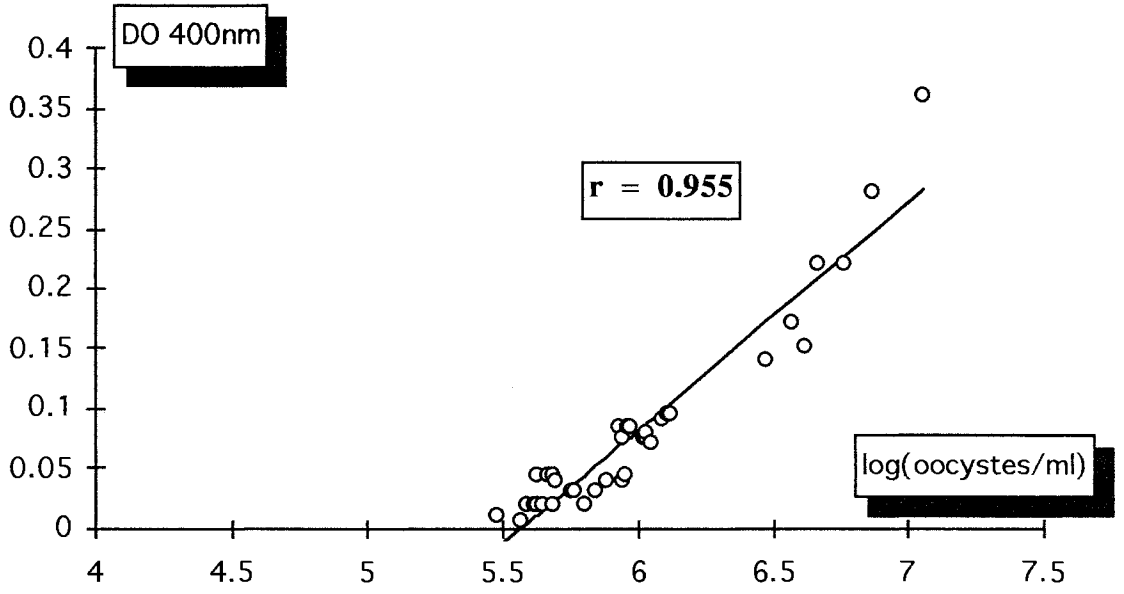
L'allure générale des courbes obtenues ne permet de déceler aucun pic spécifique et il faut donc bien souligner que les mesures de densité optique tout au long de ce test ne refléteront que le degré de turbidité relatif à la présence plus ou moins importante de matière en suspension, en l'occurrence ici les oocystes, dans la solution examinée.

Cette restriction étant apportée, la longueur d'onde choisie et fixée pour la suite des mesures de densité optique relatives au test AMH, est de 400 nm. En effet, cette valeur, quelque peu arbitraire, a été retenue car elle permet d'obtenir des valeurs de DO assez élevées, et de rester dans les gammes de longueur d'onde du visible.

➢ *Variation de la densité optique en fonction de la concentration en oocystes dans la suspension initiale :*

Afin de déterminer si les variations de densité optique sont bien représentatives des variations de concentration en oocystes au cours du test et non pas uniquement des débris, des mesures de DO ont été effectuées sur plusieurs suspensions d'oocystes. Les valeurs obtenues sont rapportées sur la figure N°42.

Figure N°42 : Evolution de la densité optique en fonction du log de la concentration en oocystes dans la suspension purifiée.



Une relation linéaire peut-être établie entre le logarithme de la concentration en oocystes dans la suspension et la DO_{400} mesurée au cours des tests : DO400 = 0,19 log (conc.oocystes/ml) - 1,06 (b). Cette relation a été définie avec un coefficient de corrélation (r) de 0,955.

Ces premiers résultats laissent suggérer que l'évolution de la quantité d'oocystes présents dans la phase aqueuse lors du test AMH pourrait être estimée par les variations de mesures de DO.

➢ *Test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (AMH) :*

Une série de 23 échantillons a été testée. Dans chaque cas le pourcentage d'adhésion aux hydrocarbures (A%) a été déterminé à partir des valeurs de DO (suivant la formule (a)) et dans la plupart des cas également à partir des valeurs de concentration effective en oocystes (numération), suivant la formule (b) : $\%A_{conc} = \frac{\text{Nb témoin - Nb essai}}{\text{Nb témoin}}$

avec $\%A_{CONC}$: pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane calculé à partir des quantités d'oocystes dénombrées avant et après le test ;

Nb témoin : nombre d'oocystes dénombrés dans le tube témoin
Nb essai : nombre d'oocystes dénombrés dans la phase aqueuse du tube essai
} Après agitation puis repos.

Les dénombrements sont réalisés sur cellule de Thoma sur un total de 6 grilles de 0.064µl pour chaque lecture.

Le calcul de ces deux valeurs, $\%A_{DO}$ et $\%A_{conc}$, permet d'évaluer la représentativité des résultats du test basé sur les lectures de densité optique, par rapport à la réalité (oocystes effectivement disparus dans la suspension aqueuse donc ayant adhérés à l'octane).

Le Tableau N°32 rassemble tous les résultats (après calculs) des tests réalisés sur les différentes suspensions d'oocystes purifiées. (Le détail des résultats est présenté dans les tableaux I et II - Annexe 2).

Tableau N°32 : Taux d'adhésion aux hydrocarbures calculés en DO ($\%A_{DO}$) et en concentration ($\%A_{CONC}$) obtenus pour les différentes suspensions d'oocystes testées.

Concentration suspension initiale/ml		% A_{DO}	% A_{CONC}	DO_{T-}
Groupe A	3.10^4	80%	----	0,04
	$3,3.10^4$	78%	----	0,09
	$1,26.10^5$	75%	----	0,025
	$1,5.10^5$	20%	20%	0,05
	$2,06.10^5$	66%	----	0,05
	$2,65.10^5$	75%	5,9%	0,02
	$2,87.10^5$	100%	14,8%	0,03
	$2,9.10^5$	100%	----	0,005
	$2,96.10^5$	100%	31,6%	0,01
	$3,72.10^5$	----	12,5%	----
	$3,81.10^5$	50%	14%	0,02
	$4,03.10^5$	75%	9,7%	0,02
	$4,2.10^5$	50%	39,3%	0,01
	$4,4.10^5$	77%	37,5%	0,045
Groupe B	$5,54.10^5$	**28 %**	8,1%	0,17
	$7,2.10^5$	**21,3 %**	9,3%	0,5
	$9,16.10^5$	**25 %**	----	0,04
	$1,27.10^6$	**35,7 %**	16,8%	0,08
	$1,27.10^6$	**33,3 %**	16,8%	0,075
	$1,29.10^6$	**16,7 %**	13,12%	0,095
	$4,18.10^6$	**6,7 %**	----	0,150
	$7,4.10^6$	**21,4 %**	----	0,280
	$7,4.10^6$	**21,4 %**	----	0,280

Un test t sur les rangs a été réalisé pour comparer les deux populations obtenues à partir des valeurs de $\%A_{CONC}$ et $\%A_{DO}$ rapportées dans le tableau N°32. Il apparaît que les deux populations sont significativement différentes au seuil de 5% (p.c. = 0.0001). Le test réalisé à partir des valeurs de DO ne donne donc pas les mêmes résultats que lorsqu'il est réalisé à partir du nombre d'oocystes réellement présents dans la phase aqueuse.

Afin de trouver une explication à ce phénomène une représentation de l'évolution du pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane, calculé des deux façons soit $\%A_{DO}$ et $\%A_{CONC}$, en fonction de la concentration en oocystes dans la suspension de départ a été réalisée (Figures N°43 et 44).

Figure N° 43 : Evolution de $\%A_{DO}$ en fonction de la concentration en oocystes initiale dans la suspension testée

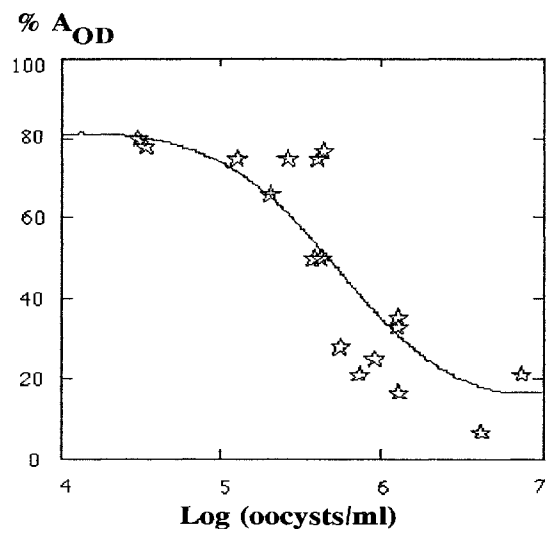
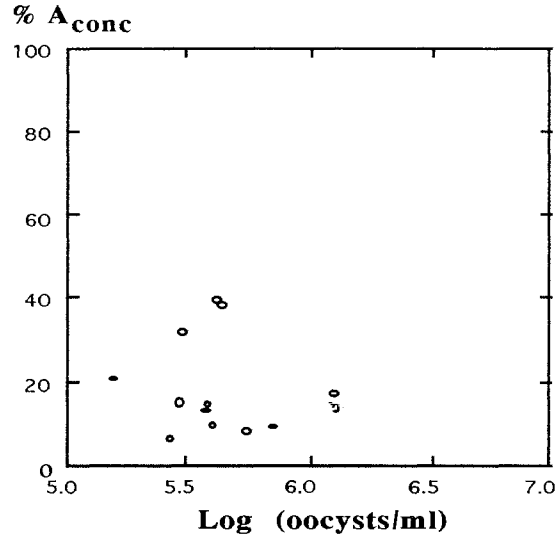


Figure N° 44 : Evolution de $\%A_{CONC}$ en fonction de la concentration en oocystes initiale dans la suspension testée



D'après les Figures N°43 et 44, à la différence des valeurs de $\%A_{CONC}$, les valeurs de $\%A_{DO}$ semblent augmenter lorsque la concentration en oocystes dans la suspension initiale décroît. Cette tendance semble confirmée si l'on observe les valeurs de $\%A_{DO}$ rapportées dans le Tableau N°32 . En effet, ces résultats peuvent être rassemblés dans 2 groupes distincts : pour des concentrations inférieures à $5{,}54.10^5$ oocystes/ml (groupe A), un pourcentage d'adhésion à l'octane moyen de 64,6 % ± 19,2 est obtenu et pour des concentrations supérieures (groupe B)(en gras dans le tableau) une moyenne de 23,3 % ± 8,73. Un test t sur les rangs a été réalisé afin de comparer ces deux groupes et une différence significative au seuil de 5% (p.c. = 0.0001) a été décelée entre les deux populations. Des pourcentages d'adhésion à l'octane très différents peuvent donc être obtenus selon la concentration en oocystes dans l'échantillon de départ, si le test est réalisé à partir de mesures de DO.

Les deux sous groupes différenciés au niveau des valeurs de $\%A_{DO}$ ont été comparés aux valeurs obtenues pour $\%A_{CONC}$. Un test t sur les rangs a permis de mettre en évidence une différence significative au seuil de 5 % (p.c. = 0.0001) entre le groupe A et les valeurs obtenues pour $\%A_{CONC}$ mais par contre aucune différence (au même seuil) (p.c. = 0.12) entre le groupe B et ces valeurs.

Le pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane serait représentatif et pourrait donc être évalué à partir de mesures de DO sur la phase aqueuse uniquement pour des suspensions caractérisées par une concentration initiale en oocystes supérieure à 5.5 10^5 oocystes /L. Cette limitation de l'adéquation du test initial à des suspensions très concentrées peut trouver une explication si l'on observe les valeurs de DO initialement mesurées sur les suspensions considérées. Ces valeurs sont reportées dans le tableau N°32. Si l'on compare par test t sur les rangs les valeurs de DO caractéristiques des suspensions de concentration en oocystes supérieures à 5.5 10^5 oocystes /L (groupe B) et celles correspondant à des suspensions de concentration inférieures (Groupe A), une différence significative au seuil de 5% (p.c. = 0.0001) est observée entre les deux populations. En effet les valeurs de DO rapportées pour les suspensions de concentration < 5.5 10^6 oocystes/L semblent très inférieures à celles obtenues pour les autres suspensions. Le test AMH étant basé initialement sur les variations de densité optique de la phase aqueuse, dans le cas de valeurs de DO très faibles une incertitude très importante est imputée aux résultats. Cette incertitude correspond d'une part à la précision plus ou moins importante de l'appareil utilisé pour les mesures de DO mais également aux artefacts imputables aux interférences produites par la présence de débris persistant après purification dans la suspension d'oocystes.

B.I.2.2.2.- Conclusion :

Le test AMH appliqué en toute rigueur selon le protocole initialement décrit par Rosenberg et al, 1980 et impliquant le calcul du pourcentage d'adhésion des microorganismes à l'octane à partir des mesures de DO sur la phase aqueuse, ne permet pas d'obtenir des résultats fiables dans toutes les conditions lors de l'application à la mesure de l'hydrophobicité de surface de *Cryptosporidium*.

Ce test ne peut être appliqué que pour des suspensions de concentration supérieure à 5,5 10^5 oocystes/L après purification selon le protocole décrit.

Cette limitation est imputée, d'une part au manque de précision des appareils de lecture utilisé et d'autre part aux interférences liées à la présence de débris gênants dans les suspensions, qui confèrent une très grande incertitude quant aux valeurs de DO utilisées pour le calcul de %A.

L'évaluation de l'hydrophobicité de surface des oocystes sera donc réalisée pour la suite de l'étude grâce à la détermination du pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane selon le protocole incluant un dénombrement systématique des oocystes dans la phase aqueuse au cours du test. Ce protocole est décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes § II.2..

B.II.- HYDROPHOBICITE ET PROPRIETES ELECTROSTATIQUES DE SURFACE DE CRYPTOSPORIDIUM :

B.II.1.- PROTOCOLE ET METHODES UTILISES :

➢ *Oocystes de Cryptosporidium :*

Les oocystes de *Cryptosporidium* sont purifiés selon le protocole défini précédemment à partir de selles de veaux préalablement stockées à 4°C, en présence de 2.5% de dichromate de potassium.

Il est important de noter, que si le dichromate de potassium peut affecter les caractéristiques de surface de *Cryptosporidium* (Upton et al, 1988), le stockage dans une solution conservatrice est essentiel et utilisé dans la majorité des travaux réalisés sur *Cryptosporidium*. Les conséquences relatives à l'emploi de cette solution, sur la structure et les caractéristiques des oocystes, ne sont pour l'instant pas connus avec précision et en l'absence d'informations plus complètes, les résultats obtenus dans les conditions décrites au cours de cette étude seront extrapolés à ceux potentiellement rencontrés dans l'environnement.

➢ *Test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures et Potentiel Zéta :*

Les méthodes utilisées sont celles décrites au chapitre Matériels et Méthodes § II..

➢ *Impact des réactifs utilisés lors du protocole de purification :*

Deux séries d'expériences préliminaires ont été réalisées afin d'évaluer l'éventuel impact de la purification sur l'hydrophobicité des oocystes :

❒ La première série a consisté à évaluer l'hydrophobicité d'oocystes purifiés uniquement par flottation sur NaCl et gradient de saccharose. Ces essais permettront de montrer l'impact du formol et de l'éthyl acétate sur les caractéristiques de surface du parasite mais également l'effet des particules fécales, habituellement éliminées au cours de cette étape de purification, sur les mesures.

❒ La seconde série d'essais a permis de déterminer l'hydrophobicité des oocystes purifiés sans la dernière étape de séparation sur gradient de saccharose.

➢ *Impact des facteurs environnementaux :*

Différentes conditions de pH, conductivité ou force ionique ont été testées afin d'évaluer l'influence de ces paramètres sur la charge de surface et le potentiel hydrophobe du parasite.

Les mesures de conductivité réalisées ici représentent une évaluation de l'importance de

la force ionique qui est très difficile à déterminer précisément pour des milieux aussi complexes que l'eau de rivière.

• **Hydrophobicité :** Des suspensions d'oocystes purifiés de concentration voisine de 10^5 oocystes/ml sont ajustées à des pH de 2,4,5,6,7,8,9,11 et 13 par addition de HCl et NaOH 0,1 N. Le pourcentage d'adhésion à l'octane est déterminé pour chacune de ces suspensions. Des mesures de conductivité (Konduktometer E 382, Metrohm AG) sont réalisées en parallèle sur ces échantillons. L'impact de la force ionique sur le potentiel hydrophobe de surface des oocystes est également évalué par réalisation du test AMH sur des suspensions de *Cryptosporidium* en présence de $MgCl_2$ à des concentrations s'échelonnant de 5.10^{-4} à 5.10^{-2} M.

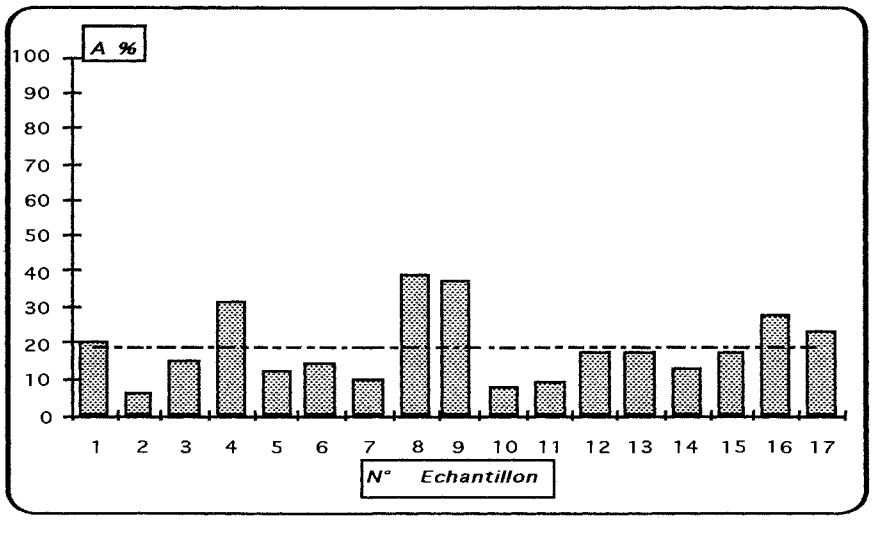
• **Potentiel Zéta :** Le potentiel Zéta des oocystes a été déterminé pour une gamme de pH s'échelonnant de 3 à 12 après addition de HCl ou NaOH 0,1 N et mesure instantanée. L'impact de la force ionique de la suspension a été évaluée par mesure du potentiel Zéta sur des échantillons d'oocystes remis en suspension dans des solutions de $MgCl_2$ 10^{-2} et 10^{-4} M de conductivité connue. Le comportement des oocystes en eaux de surface a également été testé par évaluation du potentiel Zéta de *Cryptosporidium* en suspension dans de l'eau brute de rivière (prélevée à Messein (54)) filtrée sur 0,22 µm et ajustée à des pH s'échelonnant de 2 à 10 après addition de HCl ou NaOH 0,1 N. Des mesures de conductivité ont également été effectuées sur ces suspensions.

B.II.2.- RESULTATS :

➢ *Adhésion à l'octane :*

Une série de 17 échantillons a été testée en vue d'obtenir une valeur moyenne du pourcentage d'adhésions des oocystes à l'octane (Fig. N°45)

Figure N°45 : Pourcentages d'adhésion à l'octane obtenu au cours des 17 essais réalisés sur des suspensions à une concentration 10^5 oocystes/ml.



Il apparaît que le caractère hydrophobe des oocystes purifiés, en suspension dans de l'eau désionisée, à un pH voisin de 6, est en moyenne égal à 18,75 % ± 10,05.

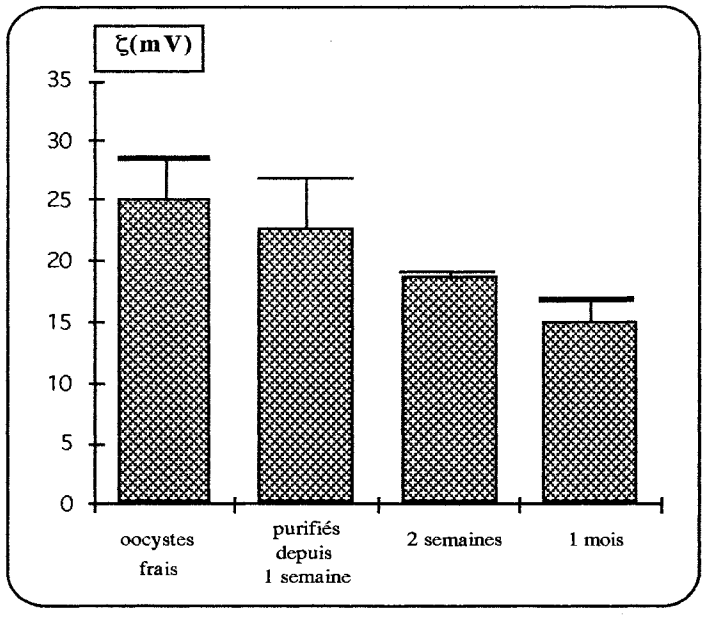
➢ *Potentiel Zéta:*

Une valeur moyenne de potentiel Zéta a également été déterminée dans les mêmes conditions expérimentales sur trois échantillons. Les oocystes de *Cryptosporidium* sont d'après les résultats obtenus caractérisés par une charge de surface négative voisine de -25 mV ± 2,8 à pH 6.

D'après la figure N°46, le potentiel de surface des oocystes semble demeurer stable au cours du temps.

Figure N°46 : Stabilité du potentiel zéta de *Cryptosporidium* en fonction du temps.

Les potentiels sont mesurés sur des suspensions purifiées d'oocystes à pH neutre. Chaque valeur représente une moyenne réalisée sur trois essais et les mesures sont réalisées en duplicats pour chaque essai. Les barres d'erreur représentent les déviations standard calculées pour chaque valeur moyenne.



Il apparaît ainsi, que le potentiel zéta, d'une suspension d'oocystes en eau désionisée et à pH neutre, ne diminue pas significativement après une période de deux semaines, selon les résultats d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis pour une probabilité critique p.c.=0.18. Une légère diminution des valeurs de potentiel mesuré est décelable uniquement après 1 mois de séjour dans les conditions précédemment citées (toujours selon un test de Kruskal-Wallis avec une p.c. = 0.05).

➢ *Impact des réactifs utilisés lors de la purification sur l'hydrophobicité des oocystes :*

➥ En l'absence de l'étape de séparation sur formol éthyl acétate (FEA), une grande partie des débris de nature hydrophobe n'est pas éliminée et ces particules, lors du test d'adhésion à l'octane, passent dans la phase octane et forment une émulsion très importante. Le dénombrement des oocystes est alors impossible dans la phase aqueuse, les débris encore présents interférant lors de l'observation microscopique.

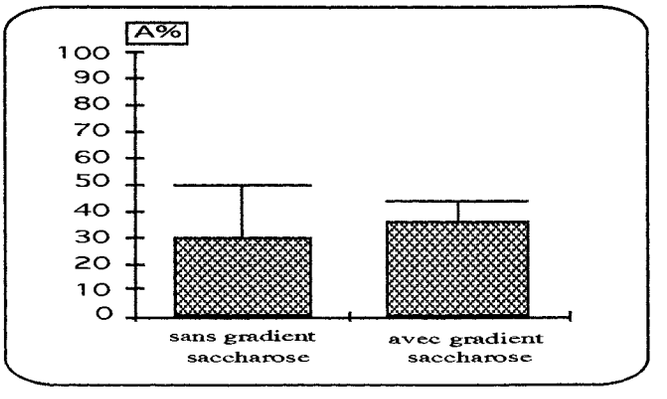
Ces résultats confirment la nécessité de l'étape préliminaire de séparation sur FEA notamment pour l'obtention d'un degré de purification suffisant pour la réalisation d'un dénombrement. De plus le caractère hydrophobe d'une partie des particules fécales, habituellement éliminées au cours de cette étape, peuvent interférer avec les résultats du test AMH, certaines de ces particules pouvant interagir avec les oocystes et ainsi les entraîner dans la phase octane au cours du test.

En résumé, la suspension d'oocystes doit présenter un degré de purification optimal et pour cette raison l'étape de séparation sur FEA est essentielle, même si en hypothèse il n'est pas exclu que ce type de réactifs puisse modifier la structure externe des oocystes et spécialement la structure hydrophobe du parasite. Jusqu'à présent aucune étude n'a permis d'évaluer l'ampleur de l'impact de ces réactifs sur la structure biochimique externe des oocystes.

➥ Dans la seconde série d'essais, pour laquelle le protocole de purification a été privé de l'étape de séparation sur gradient de saccharose, l'hydrophobicité des oocystes a été déterminée. Les résultats, rassemblés dans la Figure N°47, montrent un pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane statistiquement identique aux résultats obtenus lors de l'utilisation du gradient de saccharose (selon les résultats d'un test non paramétrique de Wilcoxon pour une p.c.>0.4).

Figure N°47 : Impact du gradient de saccharose sur les mesures d'hydrophobicité réalisées sur les oocystes de *Cryptosporidium.*

Deux séries de trois essais ont été réalisées, l'une avec et l 'autre sans intervention d'une étape finale de séparation sur gradient de saccharose au cours du protocole de purification . Les mesures sont réalisées sur des suspensions d'oocystes dans de l'eau désionisée à pH 6. Chaque valeur représente une moyenne de trois essais, et les barres d'erreurs représentent les déviations standards.



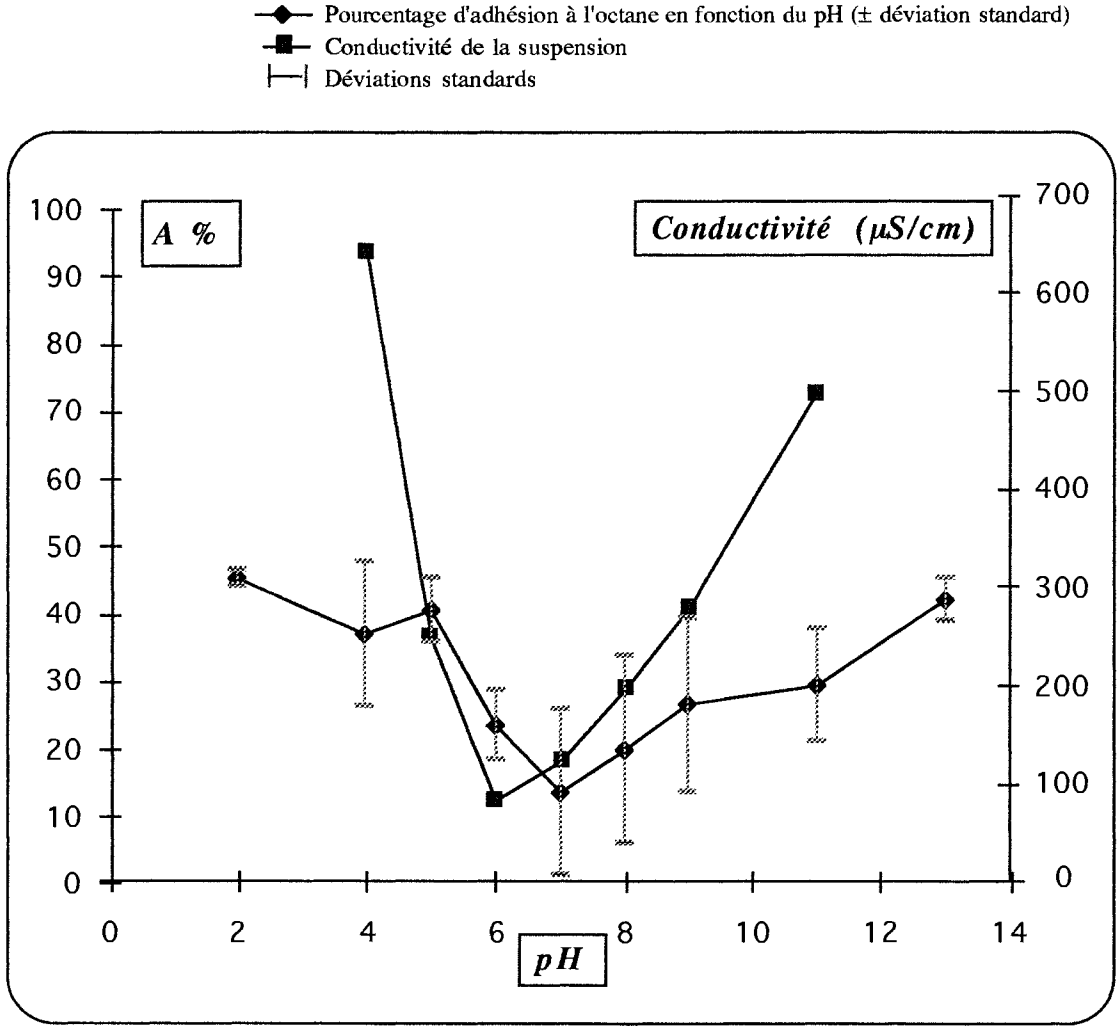
Le matériel fécal éliminé par le gradient de saccharose mais également le réactif lui-même ne semblent donc pas affecter les mesures d'hydrophobicité réalisées sur le parasite.

➢ *Impact des caractéristiques physico-chimiques du milieu sur l'adhésion des oocystes à l'octane :*

Trois séries d'expériences ont été réalisées afin de déterminer l'évolution du pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane (%A) en fonction du pH. La figure N°48 en illustre les résultats :

Figure N°48 : Evolution de l'hydrophobicité des oocystes de *Cryptosporidium* en fonction du pH de la suspension.

La conductivité et le pourcentage d'adhésion à l'octane (A%) sont mesurés pour des suspensions d'oocystes purifiées dans de l'eau désionisée immédiatement après ajustement au pH défini par HCl 0.1N ou NaOH 0.1N.

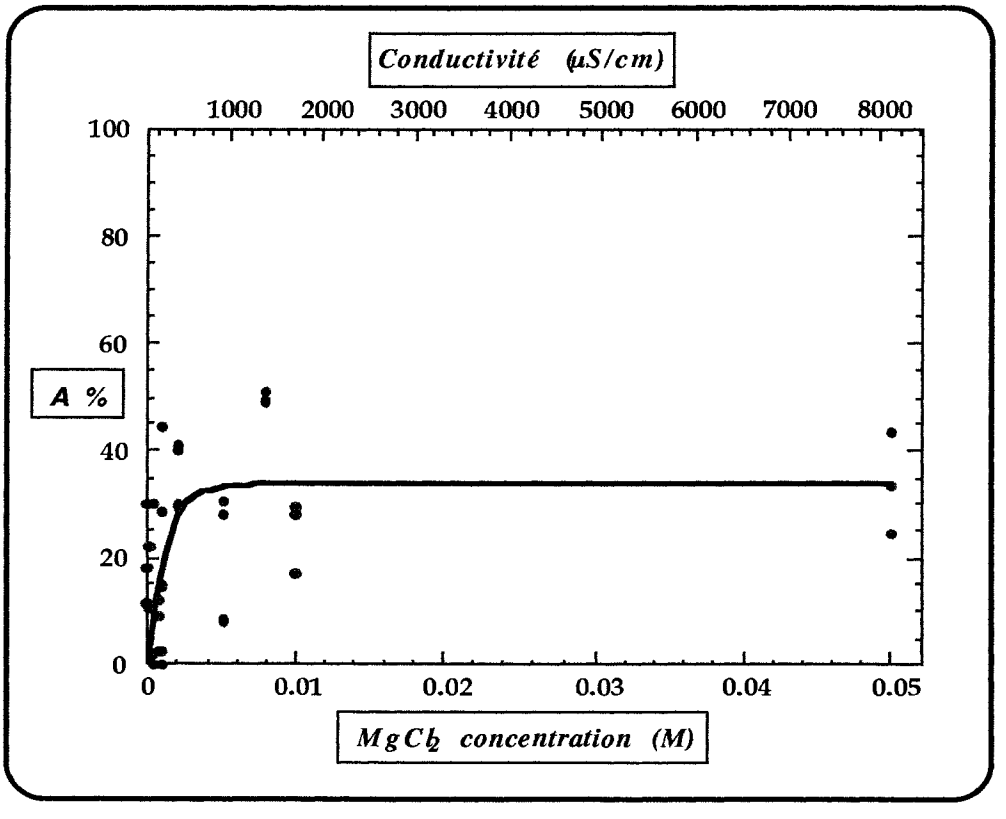


Sur cette figure sont représentées la variation du pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane ainsi que les variations de conductivité dans les suspensions en fonction du pH. Il apparaît que le caractère hydrophobe de surface des oocystes augmente lorsqu'on évolue vers des pH extrêmes avec un minimum observé à pH voisin de 7. Il faut parallèlement remarquer qu'une évolution du même type est observée pour les variations de conductivité en fonction du pH de la suspension. Il apparaît également que l'amplitude des variations du pourcentage d'adhésion à l'octane n'est pas très importante et que le caractère hydrophobe de *Cryptosporidium* n'est pas très marqué. Les propriétés hydrophobes des oocystes ne sont donc pas dominantes.

Afin d'évaluer si un lien peut être démontré entre l'augmentation du caractère hydrophobe à pH acide ou basique et l'augmentation de la conductivité donc de la force ionique dans la suspension, des mesures de pourcentages ont été réalisées sur différentes suspensions pour des concentrations de $MgCl_2$ croissantes et donc une conductivité croissante.

La figure N°49 illustre l'évolution de l'hydrophobicité de surface des oocystes en fonction de la concentration en $MgCl_2$ ou de la conductivité de la suspension analysée.

Figure N°49 : Pourcentage d'adhésion (%A) des oocystes à l'octane en fonction de la concentration en $MgCl_2$ et de la conductivité dans la suspension (à pH 6).

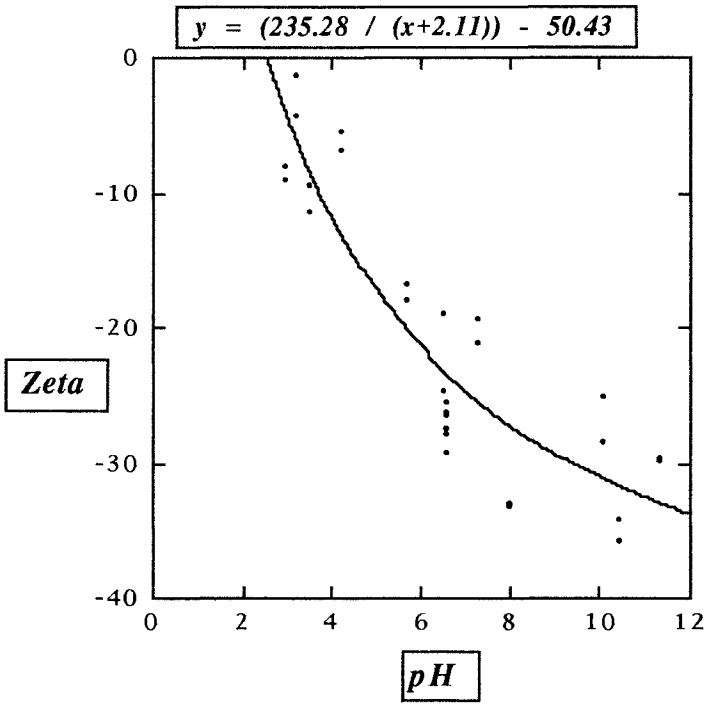


Il apparaît sur ce graphe que la force ionique du milieu influerait sur le pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane. En effet, la concentration en $MgCl_2$ et donc la conductivité de la suspension provoquent une augmentation notable du caractère hydrophobe de surface des oocystes. L'évolution de l'hydrophobicité des oocystes sur la figure N°48 n'illustre donc pas uniquement les effets du pH de la suspension mais également l'influence de la conductivité.

➢ *Impact des caractéristiques physico-chimiques du milieu sur le potentiel zéta :*

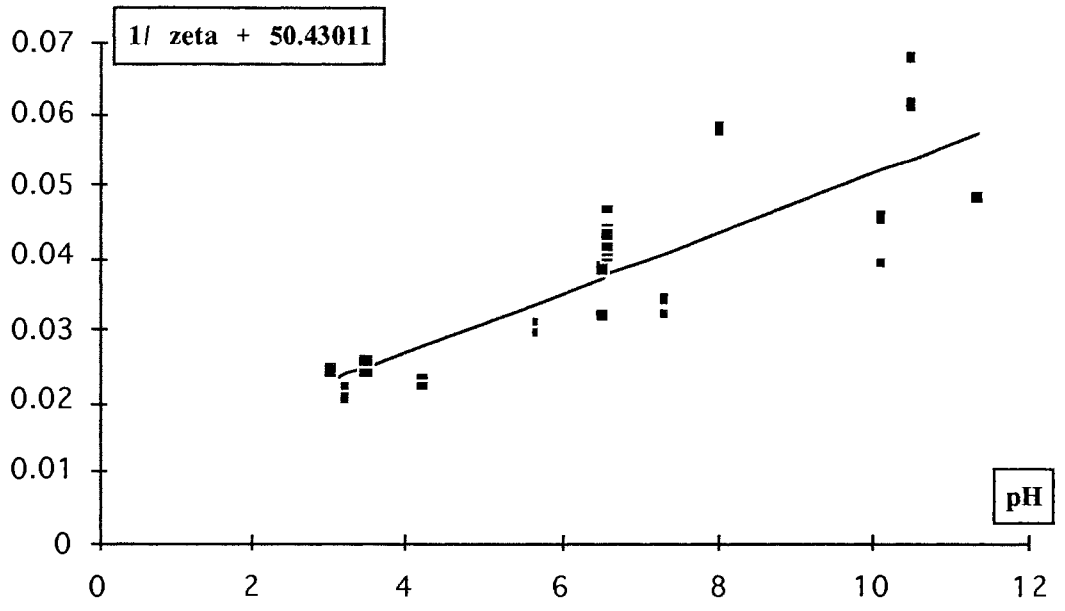
Deux séries d'expériences ont été réalisées afin de déterminer l'évolution du potentiel Zéta de *Cryptosporidium* en fonction du pH. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°50.

Figure N°50 : Variation du potentiel zéta de *Cryptosporidium* en fonction du pH de la suspension.



Il apparaît que les oocystes de *Cryptosporidium* se comportent comme une particule colloïdale de charge globale négative en milieu aqueux. Afin de déterminer pour quel pH le potentiel de surface des oocystes s'annule, une transformation linéaire du modèle reliant Zéta et pH a été réalisée (Figure N° 51).

Figure N°51 : Linéarisation du modèle reliant Zéta et pH.



Cette transformation linéaire a pour équation : $\frac{1}{(y + 50.43)} = 0.0042x + 0.01$

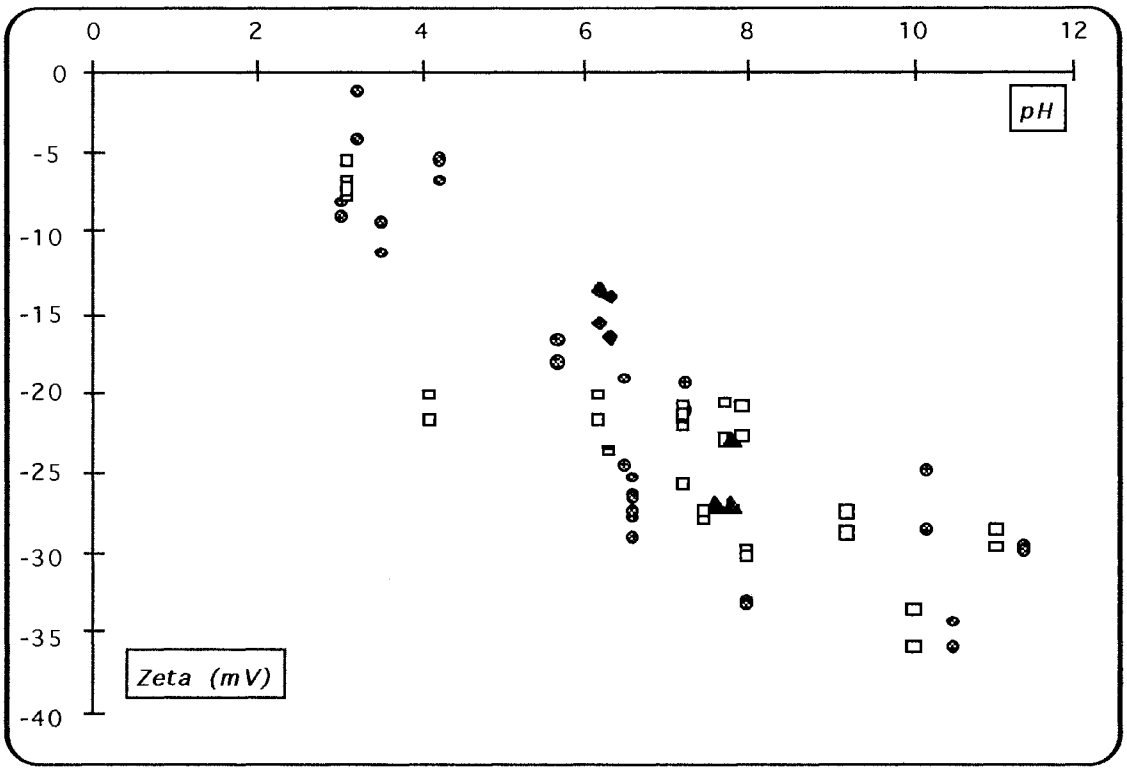
Le coefficient de corrélation r de la régression est de 0,82 ; il est significatif au risque de 1 % pour n-2 = 26 (GELLERS, 1983). D'après cette équation, il est possible de déterminer la valeur de pH pour un potentiel Zéta nul. Le point isoélectrique des oocystes se situe donc à un pH voisin de 2,5.

Afin d'évaluer l'impact de la force ionique et des facteurs environnementaux éventuellement présents en eau de rivière, le potentiel Zéta de différentes suspensions d'oocystes de conductivité et de pH déterminés a été mesuré. Ainsi sur la figure N°52 est rapportée l'évolution du potentiel Zéta de différentes suspensions d'oocystes en solution aqueuse, en eau de rivière ou encore dans des solutions de $MgCl_2$ de conductivités connues.

Il apparaît sur ce graphe que l'aspect global de l'évolution du potentiel Zéta des oocystes en fonction du pH est conservé dans les différentes conditions expérimentales testées : la diminution du pH entraînant une réduction de la charge négative de surface du parasite jusqu'à des valeurs proches de 0 pour des pH voisins de 3.

Figure N°52 : Evolution du potentiel zéta de différentes suspensions d'oocystes de conductivité connue en fonction du pH.

- suspension eau désionisée (conductivité sans ajustement pH, <100µS/cm)
- suspension eau de rivière (Moselle) (conductivité sans ajustement pH, >300µS/cm)
- suspension avec ajout $MgCl_2$ (conductivité, 29 et 1800µS/cm)
- suspension eau de rivière non filtrée (conductivité sans ajustement pH, >300µS/cm)



Le tableau N°32 permet de montrer les variations de potentiel Zéta en fonction de la conductivité du milieu.

Tableau N°32 : Conductivité et potentiel zéta de différentes suspensions d'oocystes.

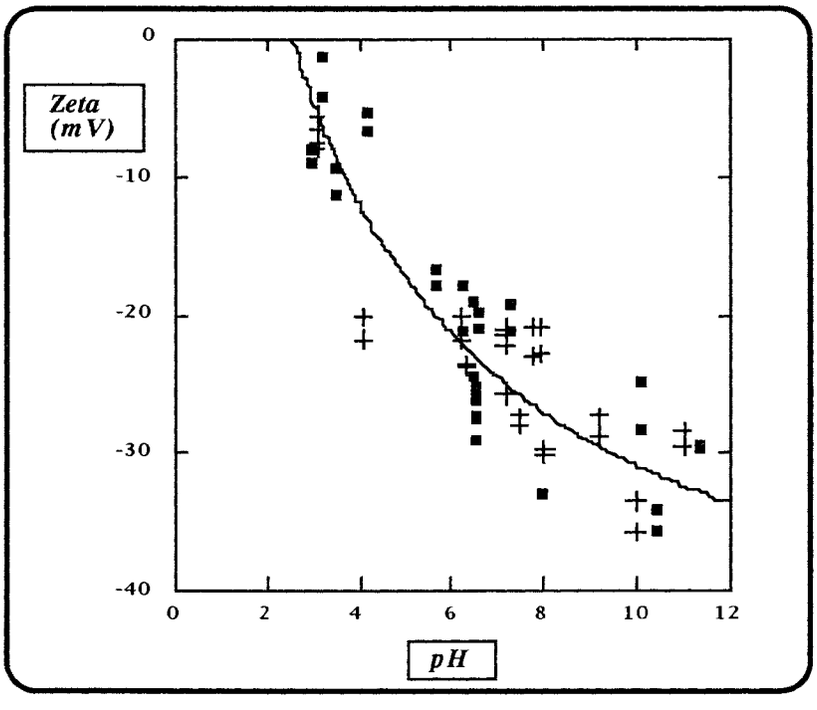
	pH (sans ajustement)	Potentiel zéta (mV)	Conductivité (µS/cm)
Eau de rivière non filtrée (Moselle)	7.60 7.60	-26.68 -26.88	373 373
Eau de rivière filtrée (Moselle)	6.33 6.33	-23.69 -23.89	343 343
$MgCl_2$ 10^{-2} M	6.16 6.16	-15.55 -13.46	1789 1789
$MgCl_2$ 10^{-4} M	6.30 6.30	-13.89 -16.47	29.6 29.6
Eau désionisée	6.52 6.52	-19.13 -24.70	83.9 83.9

Seules de faibles variations en valeur absolue du potentiel Zéta peuvent être décelées en fonction de la conductivité du milieu. Le potentiel Zéta n'augmente pas avec les valeurs de conductivité élevées. (Mg^{++} ne semble pas spécifiquement adsorbé car même si une légère diminution en valeur absolue du potentiel est décelable, aucune modification du signe de la charge n'est décelable).

Si l'on regarde l'évolution générale du potentiel Zéta en eau de rivière et en eau désionisée en fonction du pH (Figure N°53), il apparaît que le comportement des oocystes en fonction du pH varie peu. En effet, le potentiel Zéta des oocystes demeure négatif dans la gamme de pH variant de 3 à 12 pour les suspensions d'oocystes en eau de rivière brute.

Figure N°53 : Evolution du potentiel zéta des oocystes de *Cryptosporidium* en eau de rivière et en eau désionisée en fonction du pH.

■ eau désionisée, + eau de rivière (Moselle), — y = (235.28 / (x + 2.11)) - 50.43



Un test du χ^2 a été réalisé pour tester l'hypothèse estimant que les potentiels zéta déterminés en eau de rivière sont identiques à ceux obtenus et décrits par le modèle non linéaire théorique prédéfini en eau désionisée. L'hypothèse n'est pas rejetée au seuil de 5%.

Le comportement des oocystes est donc similaire au modèle défini en eau désionisée dans les conditions d'utilisation des systèmes de filtration d'eau de surface (dans des conditions impliquant des conductivités maximales testées de 700 µs/cm).

B.II.3.- DISCUSSION:

Jusqu'à ce jour très peu d'études se sont focalisées sur l'évaluation du potentiel Zéta et de l'hydrophobicité de *Cryptosporidium* spp. Les résultats des tests d'adhésion à l'octane montrent que les oocystes de *Cryptosporidium* ne possèdent pas de propriétés hydrophobes très marquées (dans la gamme de pH habituellement rencontrée en eau de surface : voisin de la neutralité). L'adhésion des oocystes à l'octane avoisine en moyenne les 20 %, bien que fluctuant selon le pH et la force ionique du milieu environnant, mais sans pour autant dépasser des valeurs encore assez modestes de 40 %.

La faible hydrophobicité du parasite conforte les hypothèses de Musial *et al.*, 1986, relatives à l'adhésion préférentielle des oocystes aux parois de verre contrairement aux matériaux plastiques hydrophobes. Mais Musial *et al.*, 1986 ont également souligné les propriétés spécifiques des oocystes à "s'accrocher" à des filtres en polypropylène et les capacités des détergents (en tant qu'agents chaotropes) à décrocher ceux-ci de ce type de filtre. Le caractère hydrophobe de *Cryptosporidium* quelque peu exacerbé pour des suspensions de conductivité élevée pourrait donc influer d'une façon assez mineure toutefois dans les phénomènes d'adhésion aux surfaces de ce type. Cette évolution croissante de l'hydrophobicité avec la force ionique du milieu pourrait être mise en relation avec les hypothèses avancées par Tanford, 1973, qui signalait que pour de hautes concentrations en ions, la solubilité du soluté est affectée par une diminution de la disponibilité des molécules d'eau et une augmentation de la tension de surface de l'eau, provoquant une augmentation des interactions hydrophobes.

Malgré tout, les variations de pH associées aux conditions de nettoyage et décolmatage des filtres utilisées dans les systèmes de microfiltration d'eaux de surface ne permettent pas d'exacerber suffisamment l'hydrophobicité de surface du parasite pour craindre ce type d'adhésion aux surfaces filtrantes.

En ce qui concerne la charge de surface de *Cryptosporidium*, les expériences réalisées montrent l'existence d'un potentiel Zéta des oocystes voisin de - 25 mV à pH neutre dans de l'eau désionisée ou de l'eau de surface (de conductivité voisine de 300 µs/cm). Ongerth., 1989, a remarqué que le potentiel de surface des oocystes de *Cryptosporidium* frais était de - 20, - 25 mV à pH neutre. Ces données confirment les résultats obtenus au cours de notre étude, bien que le "milieu de suspension" des oocystes n'ait pas été décrit dans les travaux d'Ongerth. Selon Montiel et Welte, 1992, le potentiel Zéta de *Cryptosporidium* serait de -10 mV dans l'eau.

De plus, d'après nos résultats, ce potentiel demeurerait stable au cours du temps et tout au moins au cours du mois suivant la mise en suspension du parasite dans l'eau.

Il apparaît également que la charge de surface du parasite développe un caractère négatif proche de - 35 mV à pH basique pour augmenter en évoluant vers des pH acides jusqu'à 0 à pH

2,5. Ongerth, 1989 rapportait lui une évolution de la charge négative de *Cryptosporidium* jusqu'à 0 pour un pH de 4 - 4,5, mais toujours sans préciser le milieu de suspension du parasite. La connaissance de l'évolution de la charge de surface des oocystes dans le milieu testé en fonction du pH fournit des renseignements très intéressants. En effet dans beaucoup de cas l'adsorption des particules peut-être renversée simplement par modification du pH, suggérant la possibilité d'un renversement complet de charge. En effet, la valeur du pH pour une adsorption optimale dépend du point isoélectrique de la cellule microbienne et de l'adsorbant. Mais il faut remarquer que les interactions entre ces "cellules" et les particules adsorbantes en suspension par exemple dans un fluide sont dépendantes non seulement du pH mais également de la force ionique du milieu environnant. Ainsi, si dans les conditions testées dans ces travaux, (eaux de rivière de conductivité maximale voisine de 700 µs/cm), la modification de la charge de surface n'est pas très sensible, il faut noter qu'en eaux usées caractérisées par des forces ioniques relativement importantes par exemple, la charge de surface serait certainement réduite de façon assez importante (comme il l'a été remarqué pour de nombreuses bactéries, Grotenhuis *et al.*, 1992). Au cours de cette étude, les oocystes de *Cryptosporidium* en suspension dans une solution de $MgCl_2$ (10^{-2} M) de conductivité élevée (environ 1700 µs/cm) ont démontré des variations limitées en valeur absolue de la charge globale négative.

Dans tous les cas, la connaissance de l'évolution de la charge de surface des oocystes en eaux de rivière permet d'appréhender d'une façon plus concrète les phénomènes éventuels d'adhésion des oocystes lors des variations de pH accompagnant notamment les décolmatages de filtres lors des procédés de traitement par microfiltration.

De plus, la maîtrise des mécanismes de floculation utilisés pour la détection ou encore l'élimination des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau passe forcément par la connaissance de la charge de surface du parasite au pH désiré.

B.III.- CONCLUSION :

Avant toutes démarches, un protocole adapté à l'évaluation de l'hydrophobicité de surface des oocystes de *Cryptosporidium* a tout d'abord été mis au point. Ce protocole est basé sur la technique décrite par Rosenberg *et al.*, 1980, impliquant la détermination du degré d'adhésion des microorganismes à un liquide hydrocarboné (l'octane) après une brève période d'agitation. Le dénombrement des oocystes dans la phase aqueuse avant et après agitation a permis de déterminer le pourcentage d'adhésion de *Cryptosporidium* à l'octane et donc d'évaluer l'hydrophobicité de surface du parasite.

Cette partie de l'étude, a donc permis grâce au test d'adhésion microbienne aux hydrocarbones et aux techniques microelectrophorétiques de caractériser les propriétés de surface des oocystes de *Cryptosporidium* parvum.

Les oocystes ont démontré un faible taux d'adhésion à l'octane (seulement 20% en moyenne), laissant suggérer que *Cryptosporidium spp* n'était pas caractérisé par des propriétés hydrophobes très marquées.

Un potentiel zéta de -25 mV à pH 6 - 6.5 a été déterminé pour des oocystes en suspension dans de l'eau désionisée.

Des mesures de potentiel zéta et d'hydrophobicité ont été réalisées en fonction du pH et de la force ionique ou de la conductivité du milieu. Une hydrophobicité maximum a été rapportée pour les valeurs extrêmes de pH, avec 40% d'adhésion à l'octane. Il a ainsi été démontré que la force ionique (estimée par la conductivité du milieu) pouvait influencer les propriétés hydrophobes du parasite.

Les oocystes ont également été caractérisés par une charge de surface pH-dépendante, avec un potentiel zéta variant de 0 à pH 2.5 jusqu'à des valeurs négatives extrêmes de -35 mV pour des pH basiques. Par contre l'évolution de la charge de surface de *Cryptosporidium* en fonction de la conductivité du milieu est très faible.

La connaissance des propriétés hydrophobes et de la charge de surface du parasite ont permis d'obtenir des informations très importantes, qui interviendront notamment au niveau du choix des traitements de floculation employés pour la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau mais également dans le choix des membranes de filtration et des agents nettoyants utilisés au cours de l'étude sur pilote de microfiltration.

Etude de la viabilité des oocystes

C - ETUDE DE LA VIABILITE DES OOCYSTES

Cette partie du travail a eu pour objectif la mise au point d'une technique d'évaluation de la viabilité utilisable sur des oocystes isolés à partir d'échantillons d'eaux.

Deux approches très différentes ont été suivies :

⇨ *Tout d'abord la mise au point d'un modèle de développement de Cryptosporidium sur culture cellulaire. L'objectif de cette démarche était double et consistait dans un premier temps à évaluer le pouvoir infectant des oocystes sans avoir recours aux essais sur l'animal nécessitant un protocole très lourd, mais également à produire des oocystes en culture et donc l'accession à une source de parasite exempte de débris fécaux, permettant de travailler avec des oocystes à l'état "natif" ce qui apporterait des informations précises sur la structure originelle du parasite et non biaisées par l'emploi des divers réactifs de purification habituellement utilisés et dont l'action sur la composition chimique de surface des oocystes n'est pas bien connue.*

⇨ *Dans un deuxième temps, la viabilité des oocystes a été évaluée par une technique employant l'inclusion/exclusion de colorants fluorogéniques vitaux. Dans ce cas, ce n'est plus le pouvoir infectieux proprement dit des oocystes qui est évalué mais leur intégrité structurale et donc leur potentialité à pouvoir développer un caractère infectieux.*

C.I.- DEVELOPPEMENT SUR CULTURE CELLULAIRE :

C.I.1.- PRINCIPE ET METHODOLOGIE :

Le principe général de cette méthode repose sur l'initiation d'un cycle infectieux de développement de *Cryptosporidium in vitro* dans les conditions les plus proches de celles rencontrées chez l'animal.

Dans ces conditions deux éléments sont particulièrement importants :

➢ Tout d'abord le choix du modèle cellulaire qui doit correspondre à celui rencontré lors du développement *in vivo* dans le tractus intestinal et donc être caractérisé par une différenciation en culture de type entérocytaire ou tout au moins à bordure en brosse.

Des cellules de cancer colique humain $CACO_2$ ont donc été choisies. Ce modèle avait déjà été développé notamment par Datry *et al.*, 1989 et Buraud *et al.*, 1991, qui avaient obtenu le développement complet de *Cryptosporidium* sur ce type de cellules.

La méthodologie employée pour la constitution des tapis cellulaires est détaillée dans le chapitre Matériels et méthodes § III.1.3..

➢ Le conditionnement des oocystes avant leur mise en culture est également très important. Cette étape consiste tout d'abord à isoler les oocystes des débris fécaux puis à libérer les formes infectieuses que sont les sporozoïtes, de la forme de résistance enkystée constituée par l'oocyste.

Un protocole de dékystement employant une solution de trypsine et de taurocholate de sodium à 37°C, a ainsi été mis en oeuvre. Ces conditions ont été choisies car elles mettent en jeu les facteurs majeurs stimulant le dékystement et intervenant *in vivo* lors du processus de développement de *Cryptosporidium* (Speer et Reducker, 1985). Un prétraitement à l'hypochlorite de sodium a également été utilisé, car il permet une altération préliminaire partielle de la structure de la paroi de l'oocyste favorisant le dékystement mais également une décontamination concomitante de la suspension.

A partir de ce protocole de base, différentes modalités de dékystement ont été testées incluant l'application de différentes périodes d'incubation, l'utilisation ou non d'ultrasons comme complément mécanique de dékystement et l'isolement ou non des sporozoïtes infectieux.

Le protocole général utilisé est décrit sur la figure N°54 (avec représenté **A** *: suspension d'oocystes purifiée + bactéries et autres microdébris* ; **B** : *suspension d'oocystes décontaminée* ; **C** : *suspension d'oocystes excystés* ; **D_1** : *tapis de cellules épithéliales inoculé avec un mélange oocystes excystés + sporozoïtes* ; **D_2** : *tapis cellulaire inoculé avec une suspension de sporozoïtes filtrés* ; **E** : *tapis cellulaire ensemencé regroupant différents stades de développement intracellulaire de Cryptosporidium, des oocystes excystés ou non ainsi que des sporozoïtes, tous deux, relargués ou n'ayant jamais pénétré les cellules*).

Le détail des méthodologies utilisées est regroupé dans le chapitre Matériels et Méthodes § III.1..

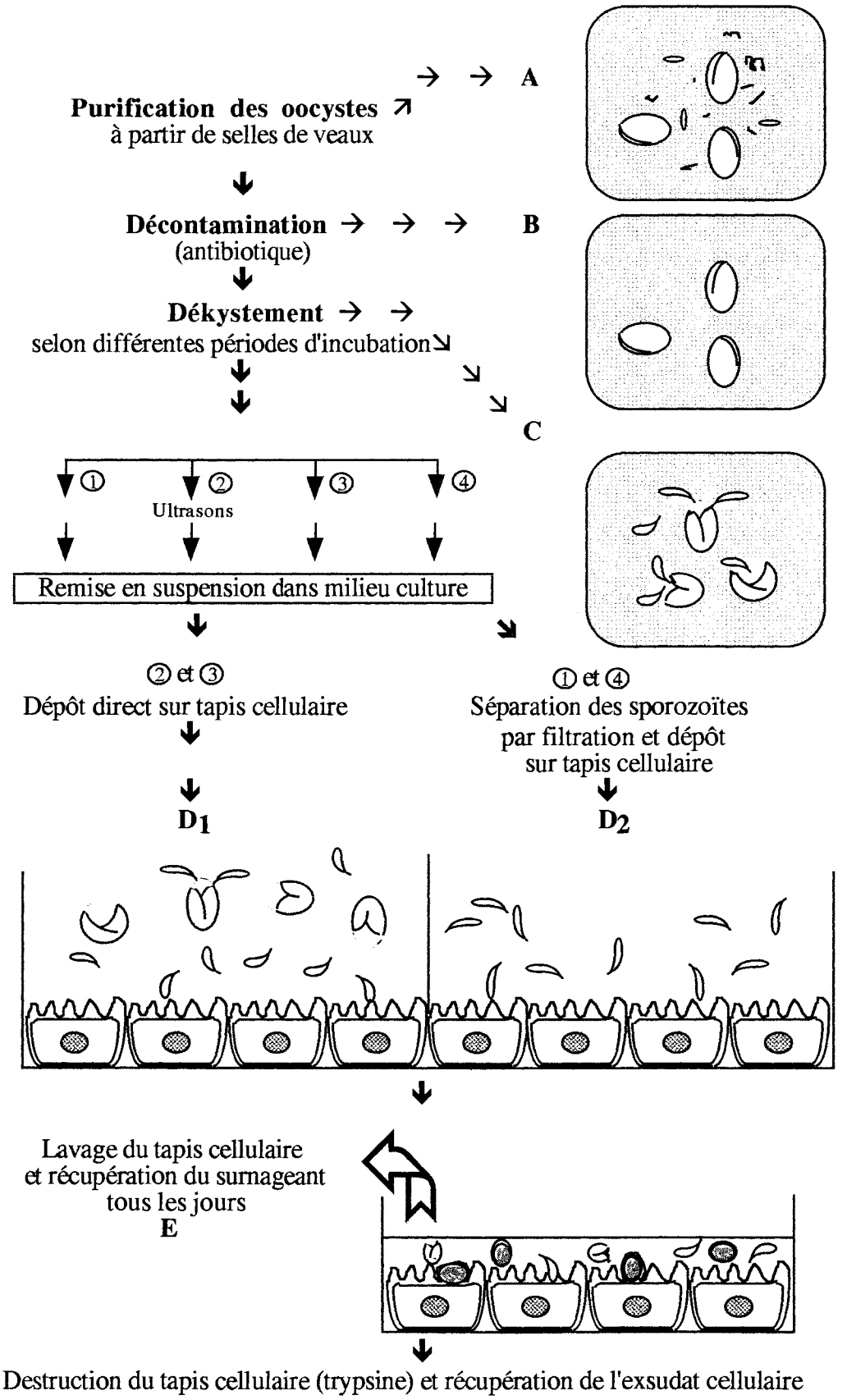
C.I.2.- RESULTATS :

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont exprimés d'une façon qualitative, la production d'oocystes n'ayant jamais été assez importante pour pouvoir accéder à un aspect quantitatif du développement des oocystes.

En raison également des très faibles quantités d'oocystes récoltés après développement sur culture cellulaire les surnageants récupérés chaque jour après lavage du tapis cellulaire ont été mis en commun sur plusieurs périodes.

Le tableau N°33 regroupe l'ensemble des résultats obtenus lors des différents essais réalisés.

Figure N°54 : Protocole général utilisé pour le développement de *Cryptosporidium* sur culture cellulaire.



(après ultrasonication) au 12ème jour de développement

Tableau N°33 : Dékystement et développement de *Cryptosporidium* sur culture cellulaire

ESSAIS		1	2	3	4
Stockage de l'échantillon de selles utilisé		3 mois	3 mois	12 mois $K_2Cr_2O_7$	12 mois $K_2Cr_2O_7$
Protocole de dékystement suivi		1 (filtration 4µm)	4 (filtration 4µm)	2	3
Oocystes préexcystés		+ + oocystes encore détectés après filtration	+ + oocystes encore détectés après filtration	+ + + en moyenne 10^6 oocystes inoculés (excystés et non excystés confondus)	+ + en moyenne 10^6 oocystes inoculés (excystés et non excystés confondus)
Sporozoïtes		évalués à 19500 pour 4 ml qsp de milieu ensemencé et déposé sur puits	évalués à 19500 pour 4 ml qsp de milieu ensemencé et déposé sur puits	+	+
Développement sur culture cellulaire	(J3-J6)• (J3-J7)••	+	+	+ + +	+ +
	(J7-J12)• (J8-J12)••	-	-	+	+
	Cellules ultra-soniquées J12	- -	- -	-	-

- - : très rare, - : rare ; + : faible ; ++ : assez nombreux ; +++ : nombreux
• : pour les essais 1 et 2.
•• : pour les essais 3 et 4.

Les résultats présentés dans le tableau N°33 apportent des informations tout d'abord sur les performances des protocoles de dékystement testés. Quel que soit le protocole utilisé, il apparaît qu'une proportion assez importante d'oocystes excystés a pu être obtenue avec une préférence pour le protocole ayant employé une étape supplémentaire d'ultrasonication qui a participé d'une façon mécanique à l'ouverture des sutures longitudinales des oocystes. Mais il faut préciser que l'impact des ultrasons sur la viabilité des sporozoïtes n'est pas connu et que dans ces conditions il est difficile de recommander ce processus.

En ce qui concerne les résultats obtenus à partir de l'observation des fractions récoltées après développement sur culture cellulaire : il faut préciser que chaque fraction, correspondant au surnageant récupéré sur les tapis cellulaires chaque jour à partir de J3 (3ème jour après ensemencement des cellules par *Cryptosporidium*), a été lavée et culotée par centrifugation puis observée au microscope optique. Ces fractions ont successivement été regroupées en plusieurs groupes en fonction de la présence d'oocystes détectés.

Ces fractions n'ont été récoltées et examinées qu'à partir du 3ème jour après inoculation du parasite en raison des observations faites par Datry *et al.*, 1989, qui ont noté l'apparition d'oocystes dans le milieu de culture uniquement à partir de ce délai.

Dans tous les cas, il faut remarquer que la plus grande quantité d'oocystes a été décelée dans les fractions correspondant à la période située entre le 3ème et le 7ème jour après inoculation. Deux hypothèses peuvent être émises à ce niveau :

➢ Tout d'abord la possibilité d'un développement de *Cryptosporidium* sur cellule et la présence d'un pic d'excrétion des oocystes entre le 3ème et le 7ème jour, ce qui a d'ailleurs été déjà souligné par Datry *et al.*, 1989 sur $CACO_2$ mais également par Current et Haynes,1984 sur cellules HFL (Cellules foetales humaines de poumon) (voir Tableau N°34).

Tableau N°34 : Suivi du développement de *Cryptosporidium* sur culture cellulaire.

		Current and Haynes* (1984)	Datry *et al.*** (1989)
lignées cellulaires		HFL	$CACO_2$
Oocystes détectés au J^{ème} jours après inoculation	J1	0	0
	J2	0	0
	J3	+1	+
	J4	+2	++
	J5	+2	+++
	J6	+3	+++
	J7	+3	++
	J8	+2	ND***

* + 1 : 1 à 5 oocystes/champ ; +2 : 6 à 10 oocystes/champ ; +3 : plus de 10 oocystes/champ
** 0 : absent ; ± : rare ; + : faible ; ++ : nombreux ; +++ : très nombreux
*** N.D. : Non Déterminé

➢ La deuxième hypothèse consiste à considérer les oocystes détectés comme des oocystes ayant adhéré au tapis cellulaire après inoculation et étant décrochés au fur et à mesure des lavages successifs.

Il faut préciser que au vu de nos résultats aucune hypothèse ne peut être adoptée préférentiellement. En effet si la seconde hypothèse est retenue : les différences remarquées entre la présence plus importante d'oocystes dans les premières fractions pour les protocoles n'incluant pas de filtration se justifierait par la présence plus importante de la forme oocystes dans l'inoculum et donc la probabilité plus importante d'adhésion aux cellules et de relarguages au cours des lavages. En revanche l'hypothèse d'un développement des oocystes concomitant à ce phénomène d'adhésion ne peut pas non plus être écartée. Ce développement serait par contre assez limité s'il existe, de par la présence d'une quantité d'oocystes très faible détectée pour les essais 1 et 2, pour lesquelles une forte quantité de sporozoïtes avait été inoculée au départ sur cellules.

Le très faible nombre d'oocystes détectés dans les dernières fractions dans tous les cas ne permet pas non plus de trancher entre les deux hypothèses précédemment citées puisqu'il peut s'expliquer soit par un épuisement des oocystes ayant initialement adhéré aux cellules soit par le bouclage de tous les cycles de développement initiés En effet il faut préciser que la propagation et la multiplication à long terme de *Cryptosporidium* n'a jamais été observée sur culture cellulaire , ceci se justifiant par le fait que jamais aucun oocyste à paroi fine responsable du cycle d'autoinfestation n'a été détecté au cours de développement *in vitro*. Ainsi dans le cas d'un éventuel développement des oocystes sur culture cellulaire au cours de nos travaux, l'absence d'oocystes dans l'exsudat cellulaire en fin d'expérience à J 12 pourrait se justifier par cette explication.

C.I.3.- CONCLUSION :

Au cours de tous les essais réalisés visant à obtenir un développement de *Cryptosporidium* sur culture cellulaire, aucun résultat n'a pu permettre d'affirmer l'obtention d'un cycle de développement complet des oocystes sur cellules $CACO_2$.

Les faibles quantités d'oocystes détectées au cours des périodes ayant suivi l'inoculation des tapis cellulaires, n'ont permis d'obtenir que des renseignements très qualitatifs.

Dans tous les cas le développement de *Cryptosporidium* sur culture cellulaire ne semble pas très adapté dans les conditions actuelles de réalisation, à la mise en évidence du pouvoir infectieux de faibles quantités d'oocystes, comme celles décelées dans des échantillons environnementaux (au cours des expériences réalisées ici et plus généralement dans la bibliographie des quantités d'oocystes ou de sporozoïtes aussi élevées que 10^5 à 10^6 sont utilisées pour inoculer les cellules). De plus au vu des résultats obtenus, il est difficile d'envisager la production de quantité d'oocystes suffisante pour alimenter des travaux sur la structure native de *Cryptosporidium*.

Globalement, les difficultés rencontrées au cours de ce travail pour la mise en culture de la lignée cellulaire $CACO_2$, en plus de la lourdeur des protocoles utilisés, incite à envisager et à recommander en l'état actuel des connaissances d'autres techniques moins astreignantes et plus performantes pour la mise en évidence de la viabilité des oocystes.

C.II.- EVALUATION DE LA VIABILITE DES OOCYSTES PAR INCLUSION-EXCLUSION DE COLORANTS FLUOROGENIQUES :

C.II.1.- PRINCIPE ET METHODOLOGIE :

L'évaluation de la viabilité des oocystes par inclusion / exclusion de colorants

fluorogéniques a été développée récemment grâce aux travaux de Campbell *et al.*, 1992.

Le principe de cette technique repose sur la caractérisation de l'intégrité de la structure des oocystes. Les colorants employés sont le 4',6 diamino-2-phénylindole (DAPI) et l'iodure de propidium (PI). Ces deux composés sont des colorants spécifiques de l'ADN et sont caractérisés spécifiquement par leur capacité respective à franchir ou non la barrière membranaire intègre des oocystes.

Ainsi, le DAPI en contact avec les oocystes sera capable de diffuser à travers les membranes des oocystes et des sporozoïtes et se fixera sur l'ADN des noyaux de ces derniers permettant d'observer sous filtre UV au microscope à épifluorescence une coloration bleu ciel caractéristique et très localisée.

Le PI quant à lui n'est pas capable de franchir la barrière membranaire intacte, il sera donc intégré à l'ADN des oocystes et respectivement des sporozoïtes uniquement si leur structure est altérée. Les oocystes altérés ayant ainsi intégré le PI, seront caractérisés par une fluorescence rouge vive sous filtre vert au microscope à épifluorescence. Les oocystes ainsi colorés pourront être considérés comme morts. Par contre les oocystes qui en présence de PI et de DAPI ne seront pas colorés en rouge mais qui démontreront une fluorescence bleue vive au niveau des noyaux des sporozoïtes seront considérés comme complètement intègres et donc viables.

La technique d'évaluation de la viabilité des oocystes consiste donc à observer la potentialité des oocystes à inclure ou exclure ces deux colorants fluorogéniques que sont le DAPI et le PI.

Les conditions spécifiques, employées au cours de cette étude et définies par Campbell *et al.*, 1992, pour l'inclusion/exclusion de ces colorants sont décrites dans le chapitre Matériels et méthodes § III.2..

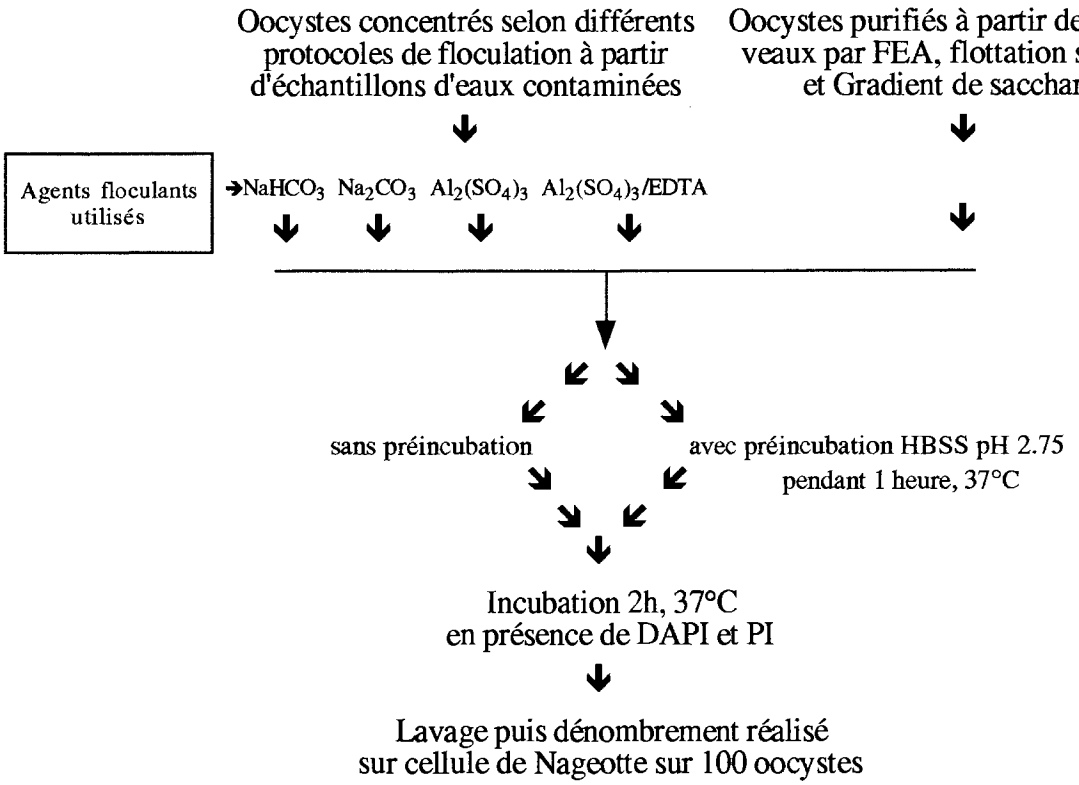
Il faut préciser que certains oocystes échappent à la coloration par DAPI ou PI et ne peuvent donc pas être caractérisés comme viables ou non viables. Ces oocystes particuliers apparaissent comme intègres et donc non vides lors d'observation au microscope optique DIC.

Selon Campbell *et al.*, 1992 ces oocystes seraient réfractaires à la coloration du fait de la non perméabilité de leur paroi qui correspondrait en quelque sorte à un mécanisme de défense en réponse à un stress environnemental. Il est dans ce cas nécessaire de rendre compatible les oocystes à la coloration et donc grâce à une préincubation à un pH acide à stimuler la perméabilité de leur membrane.

Au cours de cette étude, les deux modes de coloration par DAPI et PI avec et sans intervention de cette étape de préincubation ont été testés.

Le protocole général employé est décrit dans la figure N°55.

Figure N°55 : Protocole général employé pour tester l'inclusion/exclusion de DAPI et PI par les oocystes de *Cryptosporidium*.



Comme le montre la figure N°55, la viabilité des oocystes a été testée sur des isolats provenant soit de suspensions purifiées selon le protocole classique à partir de selles, soit d'échantillons d'eaux contaminées concentrés par floculation. Ces derniers échantillons entrent dans le protocole d'étude spécifique d'évaluation de l'impact des traitements par floculation sur la viabilité des oocystes.

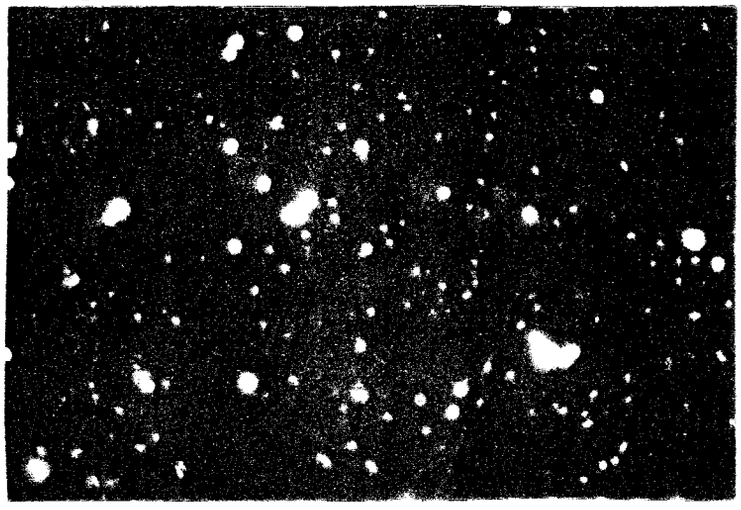
C.II.2.- RESULTATS :

Pour chaque série d'essai réalisée la proportion d'oocystes $DAPI^+$ PI^-, PI^+ (ou sous forme vide (fantômes)) et $DAPI^-PI^-$ a été déterminée parmi 100 oocystes dénombrés.

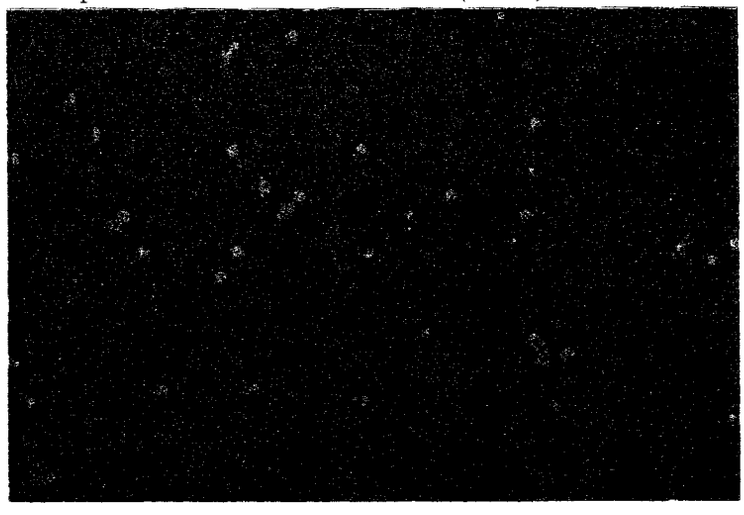
L'observation a été réalisée au microscope à épifluorescence sous filtre UV, sous filtre vert mais également en lumière blanche et dans certains cas en contraste interférentiel de phase (DIC). Pour chaque champ observé les trois principaux types d'observation ont été réalisés successivement afin de déterminer la coloration et la morphologie précise des oocystes dénombrés.

Les photographies N°1, 2 et 3 permettent de visualiser un champ au grossissement 400X selon les différentes conditions d'observation.

Photographie N°1 : oocystes colorés par DAPI et PI, observés en microscopie à épifluorescence sous filtre UV (400X)



Photographie N°2 : oocystes colorés par DAPI et PI, observés en microscopie à épifluorescence sous filtre vert (400X)

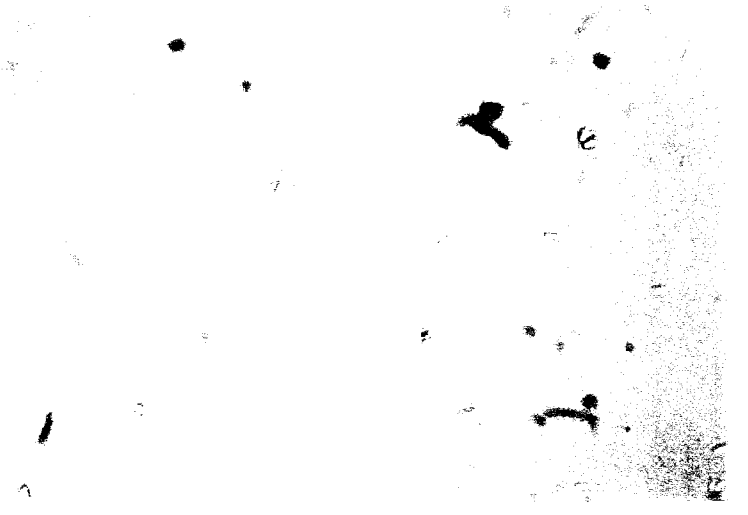


Photographie N°3 : oocystes colorés par DAPI et PI, observés sous lumière blanche (en DIC)(400X)

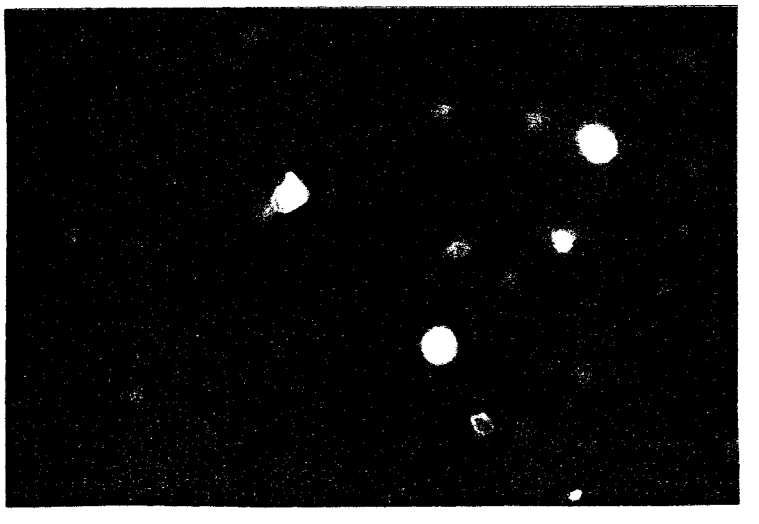


Les photographie N°4 et 5 permettent elles de visualiser des oocystes colorés par DAPI et PI en lumière blanche (DIC) et en épifluorescence sous filtre UV au grossissement 1000X. Elles permettent ainsi de visualiser les oocystes fantômes non colorés par DAPI (ou démontrant une fluorescence bleu pâle diffuse) ainsi que la coloration spécifique plus forte des noyaux des sporozoïtes.

Photographie N°4 : oocystes colorés par DAPI et PI, observés sous lumière blanche (en DIC)(1000X)



Photographie N°5 : oocystes colorés par DAPI et PI, observés en microscopie à épifluorescence sous filtre UV (1000X)



Les observations effectuées ont permis d'établir un tableau de contingence pour chaque essai (Annexe 3 tableau I).

Le pourcentage estimé de viabilité des oocystes est déterminé en additionnant pour le protocole n'employant pas de préincubation les oocystes notés $DAPI^+$ PI^- et les oocystes non colorés et non vides parmi 100 oocystes dénombrés par essai, mais en regroupant seulement les oocystes $DAPI^+$ PI^- parmi 100 oocystes pour le protocole incluant une préincubation.

Le tableau N°35 regroupe le nombre d'oocystes $DAPI^+$ PI^-, non vides et non colorés et la somme des oocystes viables pour chaque essai réalisé et suivant l'utilisation d'un protocole incluant ou non une préincubation.

Tableau N°35 : Détermination du nombre d'oocystes viables pour chaque essai selon le protocole utilisé incluant ou non une préincubation.

Origine des oocystes testés	Nombre d'oocystes dénombrés parmi 100					
	$DAPI^+PI^-$		non vides et non colorés		Considérés viables	
	sans préincubation	avec préincubation	sans préincubation	avec préincubation	sans préincubation	avec préincubation
Floculation $NaHCO_3$	27	50	19	0	46	50
	34	46	19	1	53	46
	31	55	9	0	40	55
Floculation Na_2CO_3	28	52	23	2	51	52
	34	48	12	0	46	48
	29	58	8	0	37	58
	31	52	21	0	52	52
Floculation $Al_2(SO_4)_3$	40	62	23	0	63	62
	33	63	33	1	66	63
	39	61	14	0	53	61
	31	65	11	0	42	65
Floculation $Al_2(SO_4)_3$ /EDTA	34	40	22	3	56	40
	40	48	21	0	61	48
	53	68	8	0	61	68
Purification à partir de selles	40	52	16	0	56	52
	55	62	22	0	77	62
	44	57	7	0	51	57
	50	64	12	0	62	64
	38	36	12	0	50	36
	44	59	23	0	67	59
	50	54	7	0	57	54

Un test t sur échantillons appariés a été réalisé afin de comparer entre eux les nombres d'oocystes $DAPI^+PI^-$ obtenus selon le protocole utilisé mais également les nombres d'oocystes non vides et non colorés dans les deux cas. Une différence significative a ainsi été mise en évidence au seuil de 5% (p.c. = 0.0001) entre les résultats obtenus sans préincubation et avec préincubation. En effet le nombre d'oocystes $DAPI^+PI^-$ est plus élevé après préincubation et parallèlement le nombre d'oocystes non colorés diminue dans ce cas, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Campbell *et al.*, 1992.

De même si l'on compare toujours par un test t sur échantillons appariés les oocystes estimés viables selon les deux protocoles testés, aucune différence significative n'est démontrée au seuil de 5% (p.c.=0.921).

Il apparaît donc que les oocystes non colorés et non vides peuvent être transformés en oocystes $DAPI^+PI^-$ après une stimulation représentée par une étape supplémentaire de préincubation à pH acide. Et il peut également être remarqué que les oocystes viables et donc potentiellement colorés par DAPI et non PI peuvent être estimés correctement si aucune préincubation n'est réalisée par la somme du nombre d'oocystes déterminés comme $DAPI^+PI^-$ et comme non colorés - non vides.

Pour la suite de l'étude le protocole incluant l'étape de préincubation sera pourtant retenu même s'il nécessite un allongement notable de l'expérimentation, car les lectures dans ces conditions sont nettement plus aisée de par la quasi absence d'oocystes non colorés et dont l'intégrité est assez difficilement identifiable pour un observateur non expérimenté.

C.II.3.- CONCLUSION :

La technique d'évaluation de la viabilité par inclusion/exclusion de DAPI et PI s'est montrée très facile d'utilisation. Elle permet d'obtenir une coloration très spécifique des oocystes viables et non viables. L'amélioration apportée par l'adjonction d'une étape de préincubation au protocole initial d'évaluation de la viabilité si elle n'est appréciable que par la qualité de la coloration obtenue et non pas par la modification réelle des résultats attendus, a conduit à choisir ce protocole pour la détermination de la viabilité des oocystes pour la suite de l'étude. La fiabilité de cette méthode n'a pu être testée au cours de cette étude en l'absence de résultats concrets obtenus pour le développement de *Cryptosporidium in vitro*, qui auraient permis d'accéder à des renseignements sur le caractère réellement infectieux des parasites. Il n'en demeure pas moins que la technique adoptée a démontré, selon Campbell *et al.*, 1992, une corrélation positive avec les techniques habituelles d'évaluation de la viabilité par dékystement *in vitro*, ce qui confirme sa fiabilité.

Détection de Cryptosporidium dans l'eau par floculation

D - DETECTION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU PAR FLOCULATION

En vue d'apprécier les performances du système pilote de microfiltration pour le traitement des eaux de surface, une étude préliminaire sur les méthodes d'isolement et de détection de Cryptosporidium dans l'eau a été réalisée.

Parmi les techniques expérimentées à ce jour, les méthodes de filtration sur cartouche et plus récemment de floculation ont été les plus sollicitées. Les techniques de filtration, bien que préconisées dans l'industrie de l'eau notamment au Royaume-Uni, en plus de leur caractère long et fastidieux ne permettent pas d'obtenir de bons rendements de récupération des oocystes (de 10% pour des eaux de rivières à 59% pour des eaux de distribution). Par contre les techniques de floculation plus récentes, semblent présenter de nombreux avantages de par leur caractère moins laborieux mais surtout de par les rendements satisfaisants qu'elles permettent d'obtenir de 68% à 79% pour des eaux de rivières et des eaux traitées. Ainsi la technique de floculation développée par Vesey et Slade, 1993, a fait l'objet d'une étude expérimentale approfondie. Cette technique implique une précipitation au carbonate de calcium, en milieu alcalin (pH 10) par utilisation de $CaCl_2$ 1M et de $NaHCO_3$ 1M.

Afin d'adapter ce protocole aux impératifs relatifs à la détection des oocystes en sortie de pilote et donc dans une eau par définition peu chargée en oocystes, différents protocoles ont été testés incluant l'augmentation du volume d'eau traitée . En vue d'évaluer la viabilité des oocystes en sortie du pilote de microfiltration, et face à l'effet toxique décelé sur les oocystes lors de la mise en oeuvre des traitements de détection par floculation mis au point par Vesey et Slade (Campbell et al., 1994), une série de protocoles employant différents agents floculants ont été testés en vue de l'évaluation de leur impact sur la viabilité des oocystes.

D.I.- PROTOCOLE GENERAL, PRINCIPE ET METHODES UTILISES :

D.I.1.- PRINCIPE :

Le processus de floculation repose sur deux phénomènes principaux :

⇨ tout d'abord une phase de coagulation qui correspond à une neutralisation des particules colloïdales (chargées négativement) par interactions électrostatiques avec des électrolytes et des polymères solubles (engendrés par la spéciation des sels de calcium ou d'aluminium introduits dans la suspension aqueuse en fonction du pH). L'ensemble des particules ainsi formées est toujours soluble.

⇨ Une deuxième phase est alors initiée représentant l'étape de floculation qui correspond à l'agrégation des particules colloïdales avec les polymères insolubles formés lors de l'augmentation du pH suivant toujours la spéciation des sels introduits au départ. Un filet se constitue qui rassemble les particules.

Ces deux phases nécessitent l'application d'une agitation dans la suspension afin d'augmenter la fréquence de collisions entre les colloïdes et les différents électrolytes et polymères initiant le processus de coagulation-floculation.

Le processus complet de coagulation - floculation se termine par une étape finale de sédimentation du floc qui permet de récupérer les particules agrégées et entraînées dans le floc.

Les phénomènes et les facteurs régissant et déterminant les processus de coagulation-floculation sont bien sûr les charges respectives portées par les électrolytes, les polymères et les colloïdes (la connaissance de l'évolution du potentiel zêta et donc de la charge de surface des parasites en fonction du pH de la suspension est donc particulièrement important), mais également leur spéciation en fonction des variations de pH. La quantité d'agents floculants introduite est également déterminante car un excès d'espèces cationiques dans la suspension à un certain pH peut conduire à la déstabilisation du floc qui prend une charge globale positive.

D.I.2.- PROTOCOLE GENERAL ET METHODOLOGIES EMPLOYEES :

Le protocole général suivi au cours de ce travail se décompose en deux grandes parties :

❒ Tout d'abord l'évaluation des rendements de récupération des oocystes à partir d'échantillons d'eaux ensemencés artificiellement pour les différentes modalités de floculation testées (Figure N°56).

❒ Ensuite la détermination de l'impact des différents protocoles de floculation testés sur la viabilité des oocystes isolés à partir des échantillons d'eaux traités (Figure N°57).

D.I.2.1.- Optimisation des rendements de récupération des oocystes par floculation :

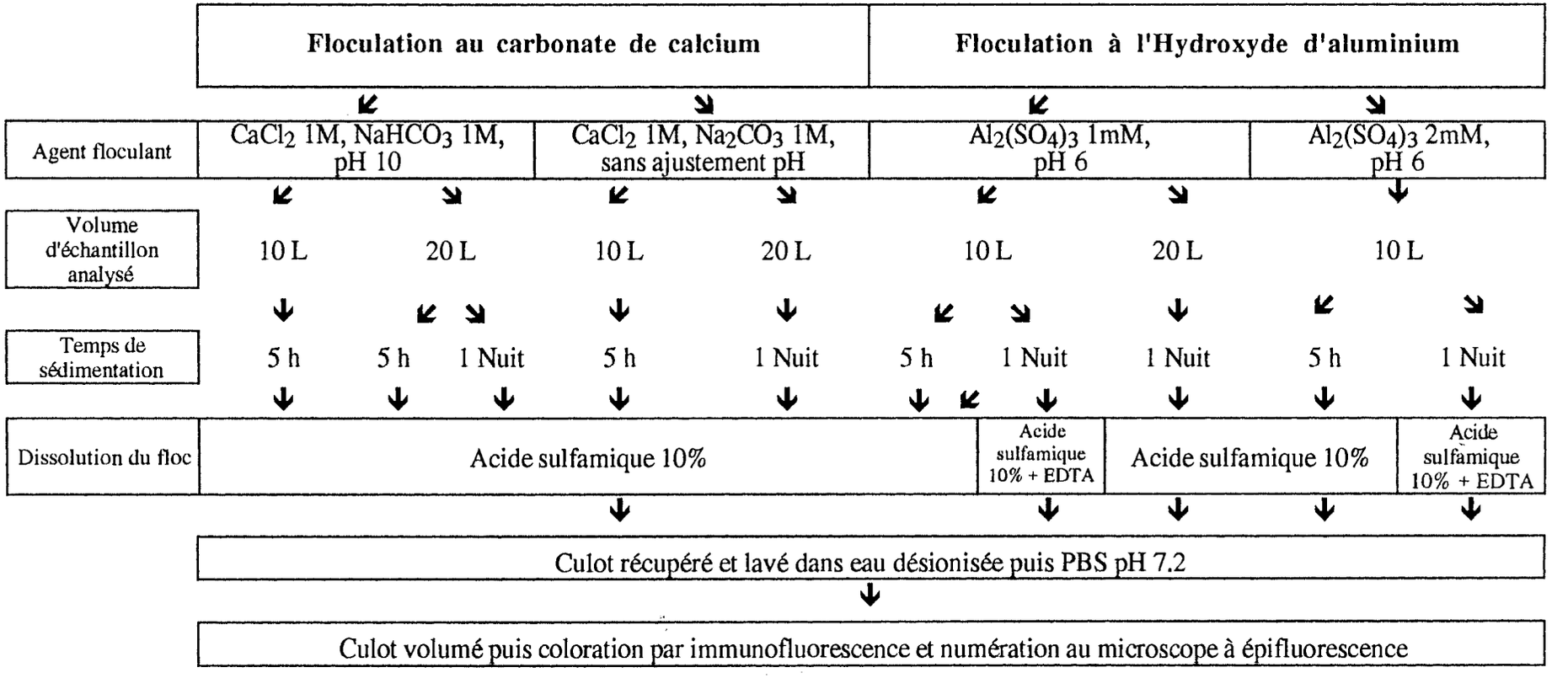
➢ *Protocole :*

Deux objectifs principaux ont été fixés au cours de cette partie de l'étude : L'évaluation et la comparaison des rendements de récupération des oocystes obtenus pour différents protocoles de floculation mais également l'optimisation de ces protocoles en vue du traitement de volumes d'échantillons de 20 litres à la différence des 10 litres habituellement analysés lors de l'application stricte du protocole de base de cette étude mis au point par Vesey *et al.*, 1993(a).

Les principaux protocoles de floculation testés se décomposent en deux grandes catégories reposant sur la formation soit d'un précipité de carbonate de calcium (protocole de base de Vesey *et al.*, 1993), soit d'hydroxyde d'aluminium.

Le protocole général utilisé au cours de ce travail est rapporté sur la figure N°56.

Figure N°56 : Protocole général utilisé lors des expériences d'optimisation des rendements de récupération des oocystes par floculation.



➢ *Méthodologies employées et objectifs de chaque série d'essai :*

➥ Floculation au carbonate de calcium :

❒ *Protocole de Vesey et al., 1993 (a) :*

La méthodologie employée est détaillée dans le chapitre Matériels et Méthodes § IV.2..

Les différentes modalités testées ont permis de déterminer le temps optimal de sédimentation relatif à l'analyse d'un volume d'échantillon de 20 l pour la floculation au carbonate de calcium.

❒ *Protocole employant $CaCl_2$ et Na_2CO_3 :*

La méthodologie employée dérive du protocole de Vesey *et al.*, 1993(a), décrit précédemment : les mêmes étapes du protocole sont suivies avec modification uniquement des réactifs employés, sachant que $NaHCO_3$ 1M est remplacé par Na_2CO_3 1M et que l'ajustement à pH 10 par NaOH 1N est supprimé.

Les différentes modalités testées ont permis d'évaluer les rendements de la technique pour l'analyse de volume d'échantillon de 10 et 20 L.

Pour les deux séries d'essai réalisées, l'analyse d'échantillons de 20 L a induit l'utilisation du double de la quantité d'agents floculants utilisée pour des volumes de 10L.

La comparaison des rendements de récupération obtenu pour chaque série a permis de déterminer le protocole de floculation au carbonate de calcium le plus performant.

➥ Floculation à l'hydroxyde d'aluminium :

La méthodologie générale est décrite au chapitre Matériels et Méthodes § IV.3..

Différentes modalités ont été testées afin de définir les conditions optimales pour obtenir les performances les plus intéressantes : elles regroupent l'évaluation de la quantité optimale d'agent floculant utilisée, le temps de sédimentation optimal pour un échantillon de 10 L, l'évaluation de l'impact de l'utilisation d'un agent complexant comme l'EDTA pour améliorer la limpidité du concentrat, et enfin l'adaptabilité à l'analyse d'échantillons de 20L.

❒ *Quantité d'agent floculant utilisée :*

L'utilisation de concentration de sulfate d'aluminium de 1 mM et 2 mM ont été testées pour le traitement d'échantillons de 10L d'eaux contaminées, pour un temps de sédimentation de 5h.

❒ *Temps de sédimentation :*

Après avoir fixé la quantité optimale d'agent floculant, des périodes de sédimentation de 5 h et 1 nuit ont été testées, pour l'analyse d'échantillons de 10 L d'eaux contaminées.

❒ *Utilisation d'un complexant :*

L'EDTA est un agent complexant qui a été utilisé au cours de la phase de dissolution du floc. Son utilisation permet d'éviter les phénomènes de reprécipitation d'hydroxyde d'aluminium dans le culot final du fait de la persistance de sels d'aluminium dissous après le premier lavage à l'eau désionisée et l'initiation d'une nouvelle phase de précipitation lors des lavages finaux réalisés dans du PBS à pH 7.2.

L'impact de cette étape supplémentaire sur les rendements de récupération de la technique a été évalué pour différentes doses d'agents floculants initialement introduites et pour des volumes d'échantillons de 10L et une sédimentation d'une nuit.

❒ *Adaptabilité à l'analyse d'échantillons de 20L :*

Après avoir fixé la concentration optimale d'agent floculant initialement introduit et le temps de sédimentation optimal, l'analyse d'échantillons de 20L a été réalisée et les rendements de récupération obtenus ont été comparés aux résultats obtenus pour le traitement d'échantillons de 10L dans les mêmes conditions.

➢ *Expression des résultats et calcul des rendements de récupération :*

Tous les essais ont été réalisés pour des contaminations artificielles de départ prédéfinies et par inoculation de suspension d'oocystes contenant de 10^2 à 10^3 oocystes pour chaque échantillons d'eaux à analyser. La teneur en oocystes des inoculums a été déterminée par dénombrement sur cellule de Thoma au microscope optique.

Le nombre d'oocystes initialement introduit dans chaque échantillon est dénommé Ni.

Les volumes des culots obtenus après chaque essai de floculation sont mesurés. Le volume total de culot est noté Vt.

Une fraction aliquote de ce culot, noté Vc, est ensuite filtrée et colorée selon le protocole de coloration par immunofluorescence indirecte décrit au chapitre Matériels et Méthodes § I.3.1.1.. Le volume de cette fraction analysé dépend de la turbidité du concentrat obtenu et de la potentialité de colmatage du filtre.

La totalité du filtre est ensuite observée au microscope à épifluorescence et les oocystes sont dénombrés. Le nombre d'oocystes dénombrés sur le filtre est noté Nf.

Le rendement de récupération de la méthode de floculation testée pour chaque essai est enfin déterminé grâce au calcul du pourcentage d'oocystes récupérés dans le culot de concentration par rapport au nombre d'oocystes initialement introduit dans l'échantillons d'eau analysé, selon la formule (a) :

Equation (a) :
$$\%R = \frac{Ni}{Vt \times (Nf / Vc)}$$

avec %R : rendement de récupération de la méthode pour l'essai réalisé ; Ni : Nombre

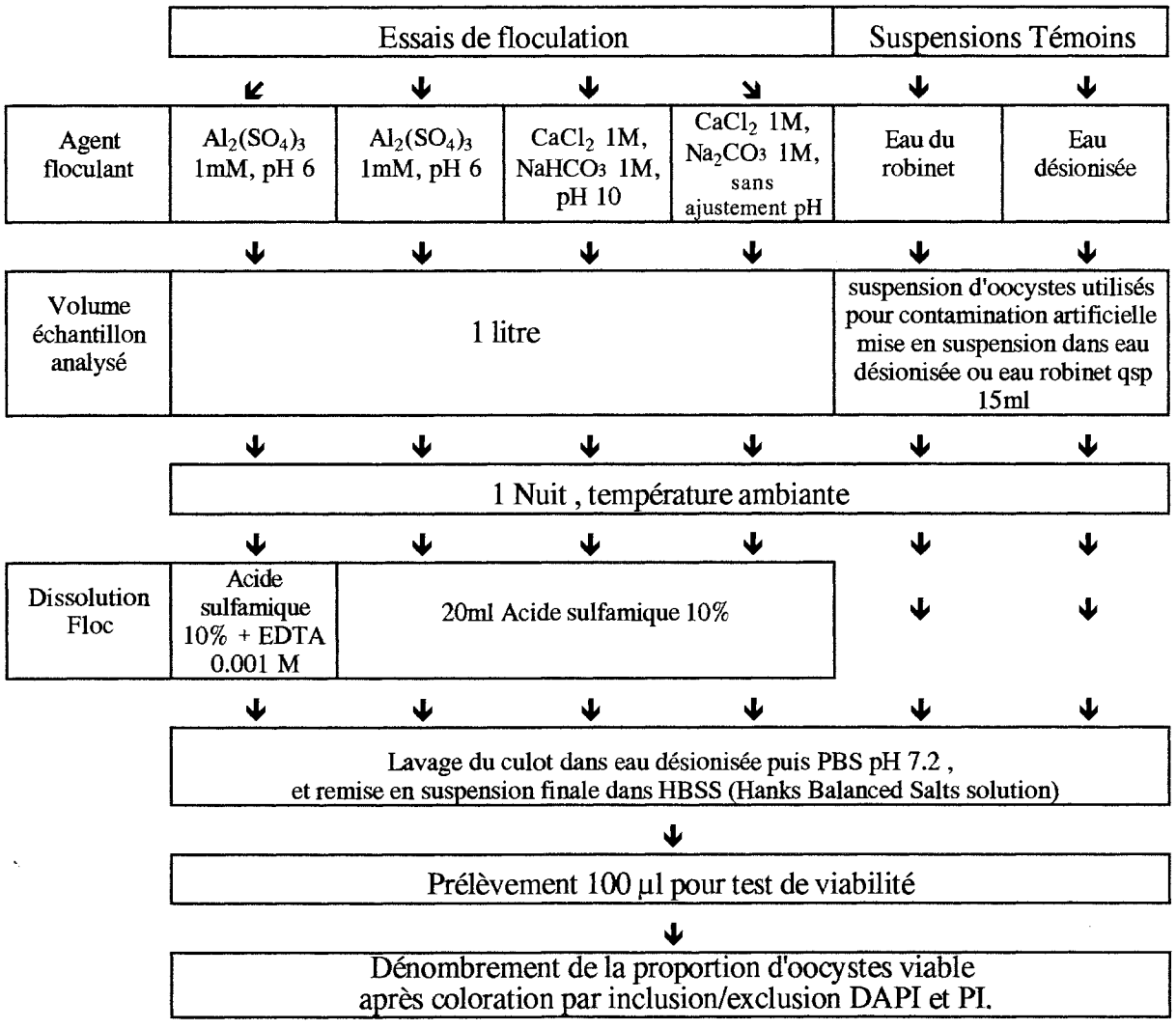
d'oocystes initialement introduit dans l'échantillon ; Vt : volume total de concentrat récupéré en µl ; Nf : Nombre d'oocystes dénombrés sur le filtre après coloration par immunofluorescence et Vc : volume de concentrat déposé sur le filtre en µl.

D.I.2.2.- Etude de l'impact des procédés de floculation sur la viabilité des oocystes concentrés :

➢ *Protocole :*

Le protocole général suivi au cours de cette partie de l'étude est défini dans la figure N°57.

Figure N°57 : Protocole général utilisé pour l'évaluation de l'impact des différents procédés de floculation sur la viabilité des oocystes.



Les différentes séries d'expériences réalisées ont permis d'étudier l'impact sur la viabilité des 4 grands protocoles de floculation précédemment testés regroupant : les deux

modalités de floculation au carbonate de calcium testé et optimisé ainsi que les deux modalités de floculation à l'hydroxyde d'aluminium.

Les deux témoins effectués ont permis d'estimer l'évolution de la viabilité des oocystes entre l'introduction dans l'échantillon et l'analyse en tenant compte uniquement des facteurs temps et milieu initial de suspension. Ces témoins permettent par comparaison avec les résultats obtenus pour les essais en floculation de ne considérer d'une façon effective que les effets spécifiques au traitement par floculation.

➢ *Méthodologies employées et objectifs de chaque série d'essai :*

Les méthodologies spécifiques employées regroupent les différentes techniques d'évaluation de la viabilité définies au chapitre C. A partir de chaque concentrat et de chaque suspension témoin récoltés en fin d'expérience, des tests de viabilité par inclusion/exclusion de DAPI et PI, incluant ou non une étape de préincubation en solution acidifiée, ont été réalisés (voir méthodologie employée chapitre Matériels et Méthodes § IV). Il faut remarquer que les résultats obtenus ne seront pas différenciés au cours de leur analyse, du fait de la corrélation positive obtenue entre les performances du test qu'il soit mené avec ou sans préincubation (voir chapitre C).

➢ *Expression des résultats :*

Suivant le protocole d'évaluation de la viabilité défini au chapitre précédent, la fraction de concentrat ou de suspension témoin ayant subi la coloration par DAPI et PI est observée sur cellule de comptage (Nageotte) au microscope à épifluorescence sous filtre UV et filtre vert mais également sous lumière blanche, et la proportion d'oocystes viables ($DAPI^+$ PI^- ou [$DAPI^+$ PI^- + non colorés, non vides] dans le cas d'un test de viabilité sans préincubation) est déterminée parmi 100 oocystes dénombrés au total pour chaque essai.

Pour chaque essai réalisé le pourcentage d'oocystes viables (%V) récupérés correspond donc à la proportion d'oocystes viables ainsi déterminés parmi 100 oocystes totaux dénombrés.

D.II.- RESULTATS ET DISCUSSION :

D.II.1.- OPTIMISATION DES RENDEMENTS DE RÉCUPÉRATION DES OOCYSTES PAR FLOCULATION :

D.II.1.1.- Floculation au carbonate de calcium :

Les rendements de récupération obtenus pour chaque essai sont rapportés dans le tableau N°36.

Tableau N°36 : Rendements de récupération obtenus pour les différentes modalités de floculation au carbonate de calcium.

Protocole utilisé			***Pourcentages de récupération des oocystes***	
Agent floculant	Sédimentation	Volume échantillon		
$CaCl_2$, $NaHCO_3$, pH 10	5 heures	10 L	54.3 %	62.6% ± 21.6
			93.6 %	
			58.6 %	
			43.8 %	
$CaCl_2$, $NaHCO_3$, pH 10	5 heures	20 L	12.3 %	23.2 % ± 10.4
			33 %	
			24.3 %	
$CaCl_2$, $NaHCO_3$, pH 10	1 nuit	20 L	83.3 %	62.2 % ± 25.6
			69.7%	
			33.7%	
$CaCl_2$, Na_2CO_3 sans ajustement pH	5 heures	10 L	12.6 %	34.3 % ± 17.8
			44.9 %	
			52.1 %	
			27.4 %	
$CaCl_2$, Na_2CO_3 sans ajustement pH	1 nuit	20 L	44.2 %	49.6 % ± 12.6
			64.05 %	
			40.6 %	

L'analyse des résultats présentés dans le tableau N°36 a été réalisée grâce à la comparaison des valeurs obtenues par utilisation d'un test t réalisé sur les rangs, en effet les échantillons de petites tailles ne permettant pas l'assimilation à une loi Normale, un test non paramétrique a été utilisé.

➢ *Optimisation de la période de sédimentation pour l'analyse d'échantillons de 20 L :*

Les résultats obtenus pour les essais réalisés à partir du protocole de floculation de Vesey et al, 1993(a), sur des échantillons de 20 L d'eau, ont permis de démontrer une différence significative au seuil de 5% (p.c.=0.02) entre les rendements obtenus pour des périodes de sédimentation de 5h et 1nuit. Une amélioration significative des rendements de récupération est donc obtenue lors de l'analyse d'échantillons contaminés de 20L par floculation au carbonate de calcium si le temps de sédimentation est de 1 nuit. L'explication de ce phénomène réside dans le fait que la vitesse de sédimentation du floc n'est pas modifiée lors de l'analyse d'échantillons de 20L par rapport à 10L mais la "hauteur d'eau" à parcourir pour atteindre le fond du récipient, où est récupéré le floc, est plus importante ce qui explique la période de sédimentation plus importante nécessaire pour le traitement de volume d'échantillon de 20L.

Pour la suite de l'étude les expériences de floculation au carbonate de calcium sur un volume d'échantillon de 20L seront donc réalisées pour une période de sédimentation de 1 nuit.

➢ *Adaptabilité à l'analyse d'échantillons de 20L :*

Pour chaque type d'agent floculant utilisé des essais sur 10L et 20L d'échantillons pour des périodes de sédimentation respectives de 5h et 1 nuit ont été réalisés. Aucune différence significative au seuil de 5% n'a pu être décelée entre les rendements de récupération obtenus pour l'analyse d'échantillon de 10 ou de 20 L que ce soit lors de l'utilisation du protocole incluant l'utilisation de $NaHCO_3$ (p.c.>0.9) ou Na_2CO_3 (p.c.=0.53).

Si l'on compare maintenant les résultats obtenus pour les deux types d'agents floculants employés (résultats obtenus pour 10L (5h) et 20L (1Nuit) confondus), une différence significative au seuil de 10% (p.c. = 0.08) est démontrée, suggérant que les rendements de récupération obtenus lors de l'utilisation du protocole de floculation au carbonate de calcium par ajout de $CaCl_2$ et $NaHCO_3$ à pH 10 déjà décrit par Vesey *et al.*, 1993(a), démontrent que celui-ci est le plus performant avec en moyenne plus de 62% de récupération des oocystes quel que soit le volume de l'échantillon analysé.

D.II.1.2.- Floculation à l'hydroxyde d'aluminium :

Le tableau N°37 regroupe les résultats obtenus pour les différentes modalités de floculation à l'hydroxyde d'aluminium testées.

Tableau N°37 : Rendements de récupération des oocystes obtenus après floculation des échantillons à l'hydroxyde d'aluminium.

Protocole utilisé				*Pourcentage de récupération des oocystes*		
Concentration Sulfate d'aluminium	Sédimentation	Volume échantillon	Dissolution Floc			
1 mM	5 heures	10 L	AS	51.8%	32.1% ± 18.4	
				17.5%		
				15.34%		
				43.9%		
2 mM	5 heures	10 L	AS	37.21%	35.2% ± 2.9	
				33.12 %		
1 mM	1 nuit	10 L	AS	63.3 %	51.2 % ± 12.1	
				51.3 %		
				39.1 %		
1 mM	1 nuit	10 L	AS + ajout EDTA	19 %	30.2% ±15.8	30.5% ± 9.6
				41.4 %		
2 mM	1 nuit	10 L	AS + ajout EDTA	27.2 %	30.8% ±5.2	
				34.5 %		
1 mM	1 nuit	20 L	AS	58%	60.25% ±23.3	
				84.6%		
				38.2%		

AS : acide sulfamique

L'analyse statistique et la comparaison des différents résultats ont nécessité l'emploi d'un test t sur les rangs pour les mêmes raisons que celles citées au paragraphe précédent.

➢ *Quantité d'agent floculant utilisée :*

La première série d'essais réalisée a permis d'évaluer l'influence de l'augmentation de la quantité d'agent floculant utilisé. Il est apparu que quelle que soit la quantité d'agent floculant utilisé, aucune différence significative au seuil de 5% (p.c.>0.9) n'a pu être mise en évidence entre les résultats obtenus. Pour la suite de l'étude des concentrations de 1mM en sulfate d'aluminium seront donc employées au cours du protocole de floculation.

➢ *Temps de sédimentation :*

Afin d'optimiser les rendements de récupération obtenus précédemment une augmentation de la période de sédimentation de 5h à 1nuit a été testée. Cette démarche a été mise en oeuvre sur la base de l'hypothèse envisageant que le floc d'hydroxyde d'aluminium n'avait pas forcément la même densité que celui de carbonate de calcium et donc un temps de sédimentation supérieur était peut être nécessaire à la récupération de la totalité du floc même pour un échantillon de 10L.

L'ensemble des résultats obtenus sur la base de 5 h de sédimentation pour 10L d'échantillons analysés (quelle que soit la dose de floculant, puisqu'elle n'influe pas sur les rendements dans les conditions testées) ont été comparés aux résultats obtenus pour des floculations réalisées pour 1nuit de sédimentation sur 10L.

Une légère différence a pu être décelée au seuil de 15% (p.c.=0.12) confirmant la nécessité d'une période de sédimentation d'1 nuit pour l'analyse d'un échantillon de 10L ce qui suggère l'existence potentielle d'une densité moins importante du floc d'hydroxyde d'aluminium par rapport au floc de carbonate de calcium pour lequel un temps de sédimentation de 5 h était suffisant. En pratique une stabilité du floc moins importante ou plutôt une remise en suspension plus facile avait d'ailleurs été remarquée lors de l'élimination du surnageant par aspiration à la surface du floc d'hydroxyde d'aluminium, ce qui confirmerait cette hypothèse.

➢ *Utilisation d'un complexant :*

Les résultats des expériences rapportés dans le tableau N°37 ont permis d'évaluer l'impact de l'utilisation de l'EDTA sur les rendements de récupération des oocystes par floculation.

Deux gammes de concentration d'agent floculant ont été testées afin d'évaluer pratiquement l'effet du complexant sur la reprécipitation de fraction de réactif non éliminée après lavage. Il faut préciser que l'emploi d'un complexant avait pour but d'éliminer toute trace de

fractions "reprécipitables" de réactifs après lavages qui de par la formation de cristaux à la surface des filtres gênaient quelque peu les observations au microscope.

Il a pu être remarqué que l'emploi d'EDTA n'a pas permis d'améliorer significativement la réalisation de l'examen puisque les cristaux potentiellement gênants n'ont pas été entièrement éliminé.

Quelles que soient d'ailleurs les concentrations de floculant employées aucune répercussion n'a été remarquée sur les rendements de récupération déterminés (au seuil de 5% aucune différence significative, p.c.>0.9).

Les résultats obtenus lors de l'emploi d'EDTA comparés à ceux déterminés dans des conditions similaires (soit sur 10L d'échantillons pour 1 nuit de sédimentation) sans ajout de complexant, ont permis de mettre en évidence une légère diminution des rendements de récupération au seuil de 10% (p.c.=0.067).

L'EDTA ne sera donc plus utilisé pour la suite des études.

➢ *Adaptabilité à l'analyse d'échantillons de 20L :*

Le protocole mis au point pour l'analyse des échantillons de 10L incluant l'utilisation de sulfate d'aluminium à pH 6 à une concentration d'1mM et une période de sédimentation d'1 nuit a été testé sur des volumes d'échantillons plus important à savoir 20L.

Les résultats obtenus pour 10L et 20L pour ce même protocole ont été comparés et il n'est apparu aucune différence significative au seuil de 5% (p.c.=0.85) entre les rendements de récupération obtenus dans les deux cas.

Le protocole défini pour l'analyse de 10L d'échantillons contaminés par floculation à l'hydroxyde d'aluminium pourra donc être employé avec un rendement moyen de récupération général supérieur à 55% même pour des échantillons de 20L.

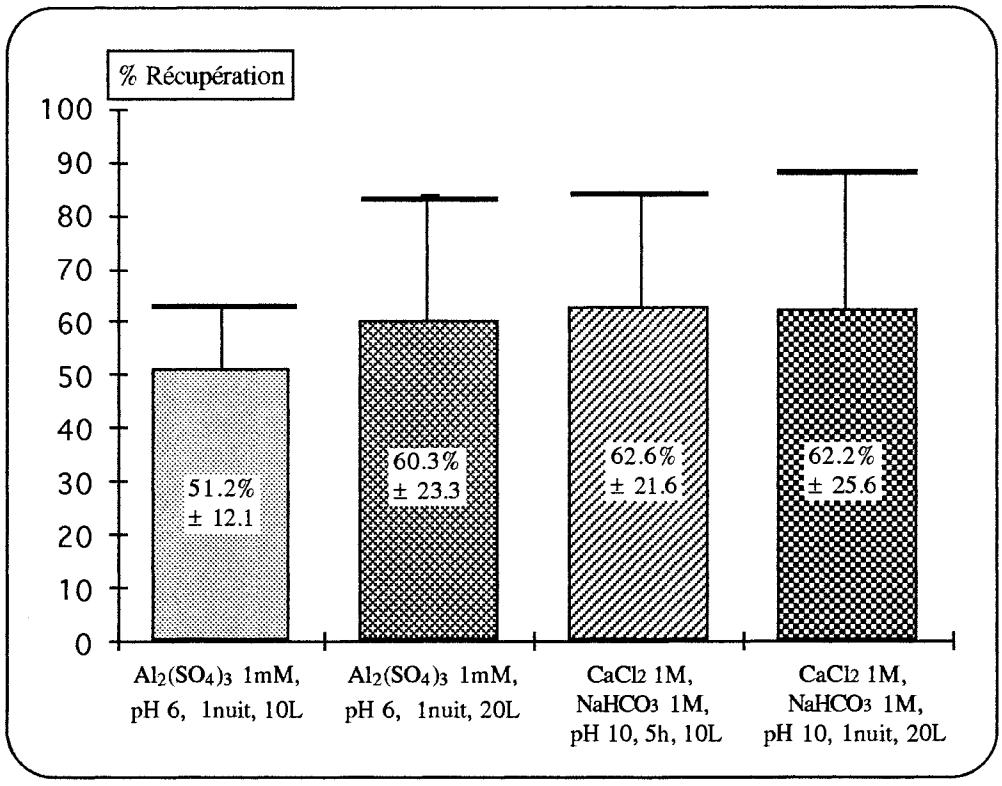
D.II.1.3.- Comparaison des deux grands modes de floculation définis :

Les résultats obtenus au cours de toutes les séries d'expériences réalisées d'une part avec floculation au carbonate de calcium et d'autre part à l'hydroxyde d'aluminium ont permis de définir les conditions optimales de réalisation de chaque protocole pour l'analyse d'échantillons de 10 et 20L.

Afin de déterminer parmi ces deux protocoles de floculation celui qui permet d'obtenir le meilleur rendement de récupération des oocystes, une comparaison statistique a été menée par analyse de variance sur les rangs entre les rendements de récupération obtenus pour l'analyse de 10 et 20L d'échantillons par floculation au carbonate de calcium et à l'hydroxyde d'aluminium.

Les rendements moyens obtenus pour chaque protocole sélectionné sont rassemblés sur la Figure N°58.

Figure N°58 : Rendements de récupération obtenus pour chaque protocole optimal sélectionné pour l'analyse d'échantillons de 10L et 20L d'eaux par floculation au carbonate de calcium et à l'hydroxyde d'aluminium.



Il apparaît qu'aucune différence significative n'a pu être décelée au seuil de 5% (p.c.=0.94) entre les rendements de récupération obtenus par floculation au carbonate de calcium ou au sulfate d'aluminium sur 10 ou 20L.

Vesey *et al.*, 1993(a), avaient d'ailleurs observé parmi 7 protocoles différents que seule la floculation à l'hydroxyde d'aluminium et au carbonate de calcium permettait l'obtention de rendements de récupération intéressants.

D.II.2.- ETUDE DE L'IMPACT DES PROCÉDÉS DE FLOCULATION SUR LA VIABILITÉ DES OOCYSTES CONCENTRÉS :

L'étude de l'inclusion/exclusion du DAPI et du PI ont permis de déterminer le pourcentage de viabilité des oocystes après concentration suivant les principaux protocoles de floculation précédemment testés.

Les deux séries d'essais réalisées sur des suspensions témoins d'oocystes en suspension soit dans de l'eau désionisée soit dans de l'eau du robinet ont permis de donner des éléments de référence permettant de caractériser l'impact exact du procédé même de floculation sans tenir compte de la diminution normale de la viabilité des oocystes relative au séjour prolongé dans l'eau à température ambiante.

Les résultats de l'étude de viabilité sont rassemblés dans le tableau N°38.

Tableau N°38 : Pourcentage d'oocystes viables déterminé dans les concentrats obtenus après traitement par floculation, suivant différents protocoles, à partir d'échantillons d'eaux contaminés par *Cryptosporidium*.

	Protocoles de floculation utilisés				Suspensions témoins	
	$CaCl_2$ 1M, $NaHCO_3$ 1M, 1 nuit, pH 10	$CaCl_2$ 1M, Na_2CO_3 1M, 1 nuit	$Al_2(SO_4)_3$ 1mM, 1 nuit, pH 6	$Al_2(SO_4)_3$ 1mM, 1 nuit, pH6 + dissolution AS + ajout EDTA	Eau désionisée 1 nuit T°C ambiante	Eau robinet 1 nuit T°C ambiante
Pourcentage d'oocystes viables (%V) dans chaque essai	34	44	56	42	71	ND
	42	52	61	46	76	66
	46	51	63	56	70	62
	50	52	62	40	ND	64
	53	46	66	61	56	50
	46	48	63	48	52	36
	40	37	53	61	77	67
	55	58	61	68	62	59
	32	52	42	ND	51	57
	ND	52	65	ND	57	54
%V moyen	44.2 ± 8	49.2 ± 5.8	59.2 ± 7.2	51.8 ± 9.6	63.6 ± 10.2	57.2 ± 9.73

Un test t réalisé sur les rangs n'a permis de déceler aucune différence significative entre le témoin réalisé en eau désionisée et le témoin réalisé en eau du robinet, ce qui laisse suggérer qu'aucun facteur kysticide assez puissant comme le chlore résiduel potentiellement présent n'a agi sur les oocystes.

Une analyse de variance sur les rangs a également permis de comparer les résultats obtenus pour les différents protocoles testés et les suspensions témoins.

Une différence significative a été déterminée au seuil de 5 % (p.c.=0.0001) entre les différentes séries de résultats analysées. Un test PSLD de Fischer sur les rangs a permis de

comparer les échantillons deux à deux et il apparaît globalement qu'il existe une différence significative au seuil de 5% entre les pourcentages de viabilité déterminés dans les suspensions témoins et ceux obtenus sur les concentrats ayant subi une floculation au carbonate de calcium (pour les deux protocoles testés). Par contre aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les suspensions témoins et les concentrats obtenus après floculation à l'hydroxyde d'aluminium (quel que soit le protocole utilisé).

Les procédés de floculation employant le carbonate de calcium auraient donc un impact sur la viabilité des oocystes détectés. Ce phénomène déjà remarqué par Campbell *et al.*, 1994, pourrait s'expliquer par l'augmentation très importante du pH de l'échantillon lors du procédé de floculation qui est réalisé à pH 10 (soit par ajustement de pH avec de la soude, soit uniquement du fait de l'addition du réactif de floculation en l'occurrence Na_2CO_3). Ainsi le temps de séjour des oocystes de 1 nuit dans ces conditions, du fait de la sensibilité des oocystes aux valeurs extrêmes de pH, a pu provoquer une augmentation significative de la mort des oocystes.

Les procédés de floculation à l'hydroxyde d'aluminium réalisé à pH 6 ne présentent pas quant à eux les mêmes inconvénients, si ce n'est la diminution brutale du pH à l'ajout du sulfate d'aluminium dans l'eau, mais l'exposition des oocystes à cette valeur extrêmement acide de pH ne semble pas influer sur la viabilité des oocystes, le temps d'exposition des oocystes était très court (de quelques minutes avant ajustement de pH pour provoquer la floculation).

Il faut remarquer que le test PSLD de Fischer laisse apparaître une différence significative entre les résultats obtenus avec les protocoles de floculation à l'hydroxyde d'aluminium suivant l'utilisation ou non de complexant (EDTA) pour aider à la dissolution totale du précipité. L'EDTA aurait donc un effet nocif sur les oocystes de *Cryptosporidium*. Ce facteur joue en faveur du choix réalisé dans le paragraphe précédent où le protocole n'incluant pas l'EDTA avait été préféré.

D.III.- CONCLUSION :

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de fixer les conditions opératoires optimales pour obtenir une méthode de détection performante des oocystes dans des échantillons d'eaux contaminés et ceci pour des volumes pouvant aller jusqu'à 20 litres.

Il apparaît en général que si le protocole optimal de floculation à l'hydroxyde d'aluminium , employant le sulfate d'aluminium 1mM à pH 6 pendant une nuit sur 20L d'échantillon, avec des rendements moyens supérieurs à 60%, ne permet pas d'obtenir de meilleurs performances que le protocole au carbonate de calcium, employant $CaCl_2$ 1M et $NaHCO_3$ 1M à pH 10 pour une sédimentation de 1nuit, avec des rendements moyens de

récupération supérieurs à 62%, il n'en demeure pas moins qu'il sera préféré pour la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau car il permet de ne pas modifier significativement la viabilité des oocystes détectés.

Ces deux procédés de floculation diffèrent d'une part en raison de la constitution chimique de leur floc mais également par le pH auquel ils sont réalisés. Mais si un pH de 10, employé pour la formation du floc de carbonate de calcium, doit favoriser l'adhésion au floc des oocystes, dont la charge négative est exacerbée à ce pH (voir chapitre B), il n'en demeure pas moins qu'à un pH de 6 la charge de surface des oocystes voisine de - 25 mV suffit encore largement à participer aux interactions avec le floc d'hydroxyde d'aluminium, ce qui se ressent dans les performances obtenues ici pour les deux modes de floculation. Par contre une exposition à un pH de 10 pendant une nuit contrairement à un pH de 6 conduit à la détérioration de la structure des oocystes qui sont sensibles à l'exposition prolongée à des valeurs extrêmes de pH. La diminution significative de la viabilité des oocystes dans les concentrats obtenus à partir du protocole de floculation au carbonate de calcium s'expliquerait donc par ce phénomène. Par contre il ne semblerait pas que cette augmentation très forte de pH endommagerait la structure antigènique de surface du parasite puisque les rendements de récupération ne sont pas modifiés.

Le protocole de floculation à l'hydroxyde d'aluminium ainsi qu'il est défini au chapitre Matériels et Méthodes § IV.3. sera donc utilisé pour la suite de l'étude et notamment afin de détecter les oocystes de *Cryptosporidium* en sortie filtrat du pilote de microfiltration mais également en sortie rétentat et notamment dans les concentrats traités par les eaux de lavages pour lesquels la viabilité des oocystes sera examinée.

Etude du système pilote de microfiltration

E - ETUDE DU SYSTEME PILOTE DE MICROFILTRATION

Les systèmes de microfiltration connaissent un essor important dans le domaine du traitement des eaux depuis quelques années. L'intérêt des entrepreneurs pour ces techniques réside notamment dans leur aptitude à clarifier et à décontaminer l'eau en une seule étape.

Afin d'évaluer l'efficacité de tels systèmes sur l'élimination de Cryptosporidium, un système pilote de microfiltration tangentielle a été testé.

L'étude de ce système s'est déroulée en deux étapes principales :

❒ *Tout d'abord, une étude systématique préalable qui a permis d'établir les performances maximales de la membrane et les conditions optimales de fonctionnement en terme d'hydraulique du système.*

❒ *La deuxième partie de l'étude a permis d'évaluer les performances du système pour l'élimination de Cryptosporidium dans le cas d'eaux contaminées ou non artificiellement. En parallèle, une étude de la viabilité des oocystes de Cryptosporidium dans les eaux de rejets de ces systèmes a été réalisées. En effet il apparaît important d'obtenir des informations sur le potentiel infectieux des concentrats rejetés après traitement dans l'environnement.*

E.I.- CHOIX DE L'ELEMENT FILTRANT ET DE DIFFERENTS AUTRES COMPOSANTS DU SYSTEME PILOTE :

E.I.1.- CHOIX DE L'ELEMENT FILTRANT :

Le choix du type de système a été réalisé selon tout d'abord les caractéristiques des installations utilisées actuellement dans l'industrie de l'eau (CGE, Lyonnaise des Eaux) et selon les matériaux mis à disposition par les entreprises commercialisant les systèmes de microfiltration pour laboratoire.

Trois caractéristiques principales du module doivent être sélectionnées :

- La composition du matériau utilisé
- La structure de la membrane
- La conception générale du module (géométrie de base de la membrane)

➢ *Choix du matériau filtrant :*

Deux grandes catégories de membranes sont retrouvées sur le marché : les membranes organiques et les membranes minérales.

Le choix de l'élément filtrant Céraflo en céramique (99,6% alpha-alumine (Al_2O_3)) réside tout d'abord dans une grande compatibilité chimique vis-à-vis des réactifs utilisés lors

des lavages : acides, bases concentrées, pH 1 à 14, hypochlorite de sodium,... Ces membranes associent également une très bonne résistance mécanique (haute pression en sens normal ou inverse de filtration, ou pour décolmatage à contre courant, pression maximum : jusqu'à 21 bars), une bonne résistance aux températures élevées (jusqu'à 200°C, ce qui apporte un intérêt dans notre cas uniquement au niveau du lavage) et leur fonctionnement n'est pas perturbé par les viscosités importantes.

Les propriétés hydrophiles, la non biodégradabilité de la membrane et sa durée de vie importante (plusieurs années) ont également contribué à la décision en faveur de ce type d'élément filtrant. Enfin, la nature de la membrane en alpha-alumine présente de faibles taux d'adsorption comparés par exemple aux terres de Diatomées.

Il faut également souligner que les membranes en oxyde d'aluminium sont caractérisées par des propriétés hydrophiles et sont chargées négativement. Les particules chargées négativement, comme les oocystes, devraient être confrontées à une répulsion électrostatique vis-à-vis de la membrane, ce qui limiterait les phénomènes d'adhésion à la membrane. De plus Lahoussine - Turcaud et al, 1990, ont remarqué que le colmatage des membranes par adhésion de composés organiques était plus important lors de l'utilisation de membrane de nature hydrophobe, comme avec le polysulfone, que lors de l'utilisation de membrane hydrophile, comme avec la céramique. Des liens hydrophobes pourraient donc augmenter l'accumulation de matériel à l'interface eau - membrane. Le choix d'une membrane hydrophile céramique chargée négativement se justifie donc notamment par sa potentialité à limiter les interactions avec les particules organiques en suspension dans l'eau et notamment les oocystes qui de par leur charge négative et la présence d'un certain caractère hydrophobe à leur surface offre un potentiel d'adhésion à de telle membrane assez restreint.

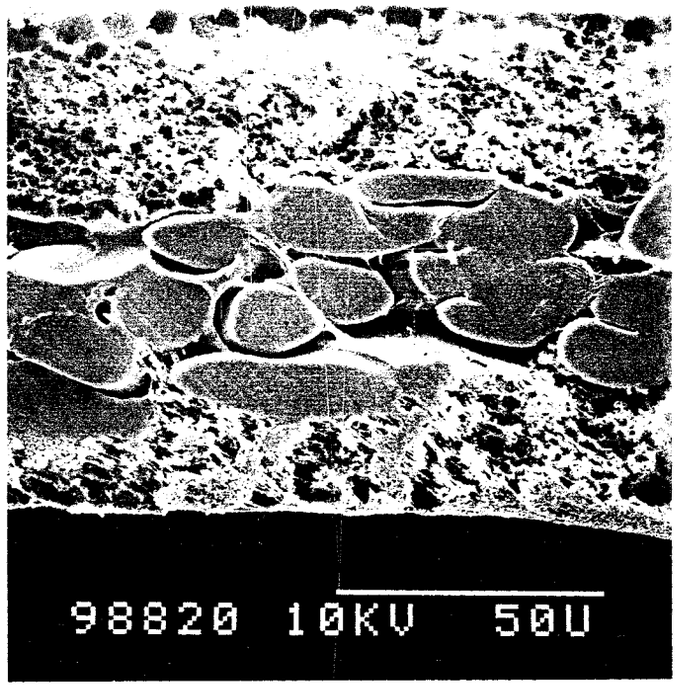
➢ *Choix de la structure membranaire :*

Trois types de structure membranaire sont disponibles : les membranes isotropiques, les membranes asymétriques et les membranes composites.

L'élément Ceraflo utilisé au cours de notre travail se situe dans la deuxième catégorie précitée et offre donc un maximum d'avantages que ce soit au niveau des lavages ou des prédispositions au colmatage. En effet, ces membranes asymétriques, constituées d'un seul matériau filtrant avec des pores de tailles plus importantes sur la face "perméat" par rapport à la face alimentation, permettent de retenir le matériel colmatant à la surface de la membrane.

L'élément est constitué d'un support poreux où des canaux de diamètres définis ont été percés. Une fine couche de céramique est déposée à l'intérieur de chaque canal (photographie N°6). Cette membrane est "cristallisée" en place permettant l'obtention de lien céramique-céramique extrêmement résistant.

Photographie N°6 : Photographie en coupe de la structure d'une membrane céramique CERAFLO en alpha-alumine réalisée en microscopie électronique.



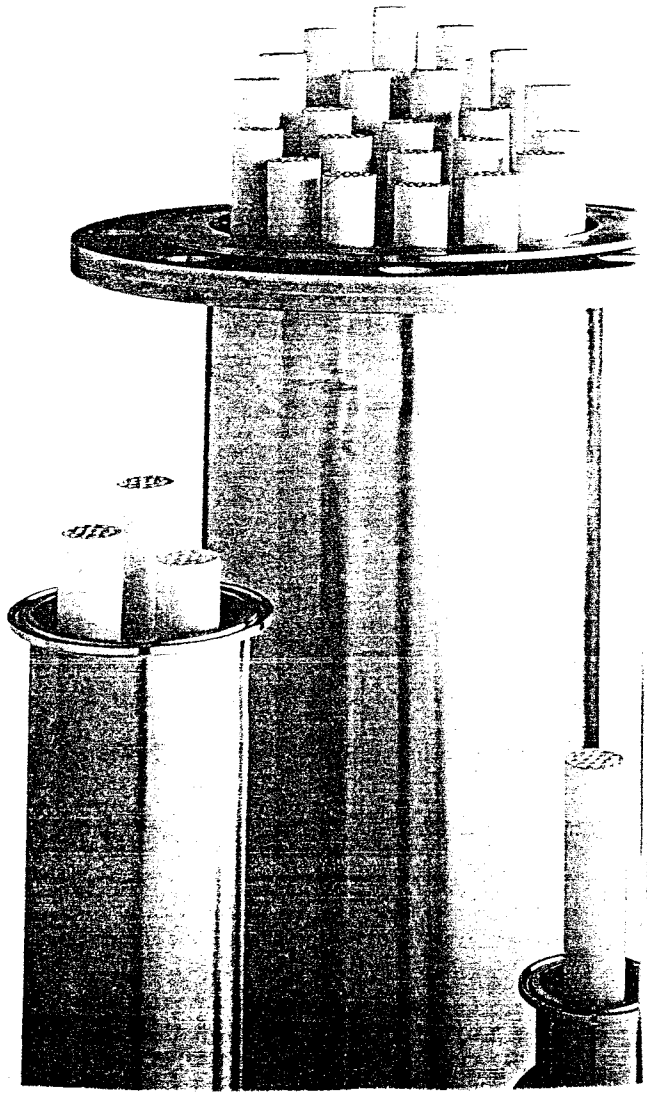
➢ *Conception générale du module :*

Les membranes d'ultra et de microfiltration sont commercialisées sous trois formes principales : les membranes planes, tubulaires ou sous forme de fibres creuses.

Les modules tubulaires sont constitués d'éléments cylindriques microporeux comportant des canaux de circulation du flux disposés coaxialement sur toute leur longueur. La surface interne des canaux est recouverte d'une membrane qui détermine la taille des pores de l'élément filtrant. Les avantages majeurs de ces modules résident dans leur grande compatibilité chimique et leur tolérance vis-à-vis des matières solides en suspension.

Le système Céraflo utilisé dans notre étude se présente sous forme de module tubulaire en céramique (Photographie N°7).

Photographie N°7 : Eléments tubulaires en céramique (Céraflo, Millipore) présentés dans leur carter en inox.



Notre choix a été déterminé par le faible encombrement du système, sa grande compatibilité chimique vis à vis notamment des réactifs du lavage, sa haute tolérance à l'encrassement, sa durée de vie importante mais également son coût moins important que les fibres creuses.

Ce système tubulaire est également avantageux de par le diamètre de la lumière des canaux de 2,7 mm qui ne nécessite que des pompes de faible capacité.

Il faut remarquer de plus que ce type de système est déjà exploité en industrie par exemple par la Compagnie Générale des Eaux à Saint-Maurice les Château Neuf (Saône-et-Loire) (Salvat et Leborgne, 1990) et par la CEGELEC à l'usine de MARQUES (Lahoussine-Turcaud et al, 1991).

E.I.2.- CHOIX DE DIVERS AUTRES COMPOSANTS DU SYSTEMES PILOTES :

Le descriptif général du système pilote est rapporté au chapitre Matériels et Méthodes § V.1.. Parmi les différents composants du système, outre l'élément filtrant dont le choix a été justifié précédemment, certains éléments ont fait l'objet d'attention particulière. Ainsi une pompe à lobe a été sélectionnée car elle permet de limiter l'abrasion mécanique des particules lors du passage du fluide à traiter. Ce paramètre permet de focaliser les résultats obtenus uniquement sur les contraintes liées au passage au travers du système membranaire étudié. Par contre l'une des contraintes relatives à l'utilisation de ce type de pompe est le tamisage de l'eau avant alimentation, ce qui permet d'éliminer les particules les plus grosses pouvant détruire l'intégrité de la surface des lobes définissant les performances et la régularité du débit fournie par la pompe.

Les tubulures et les joints utilisés dans la conception du système sont constitués respectivement en acier inoxydable et en téflon. Le choix de ces matériaux a été réalisé en fonction des contraintes imposées par les lavages réalisés à pH très acides ou très basiques.

Enfin des manomètres glycérinés ont été utilisés afin de permettre de limiter les incertitudes au niveau des mesures de pression.

La photographie N°8 présente l'aspect général et la conception de l'installation pilote mise au point et utilisée au laboratoire.

E.II.- REGLAGES ET MISE AU POINT DES CONDITIONS HYDRAULIQUES DE FONCTIONNEMENT OPTIMAL DU SYSTEME :

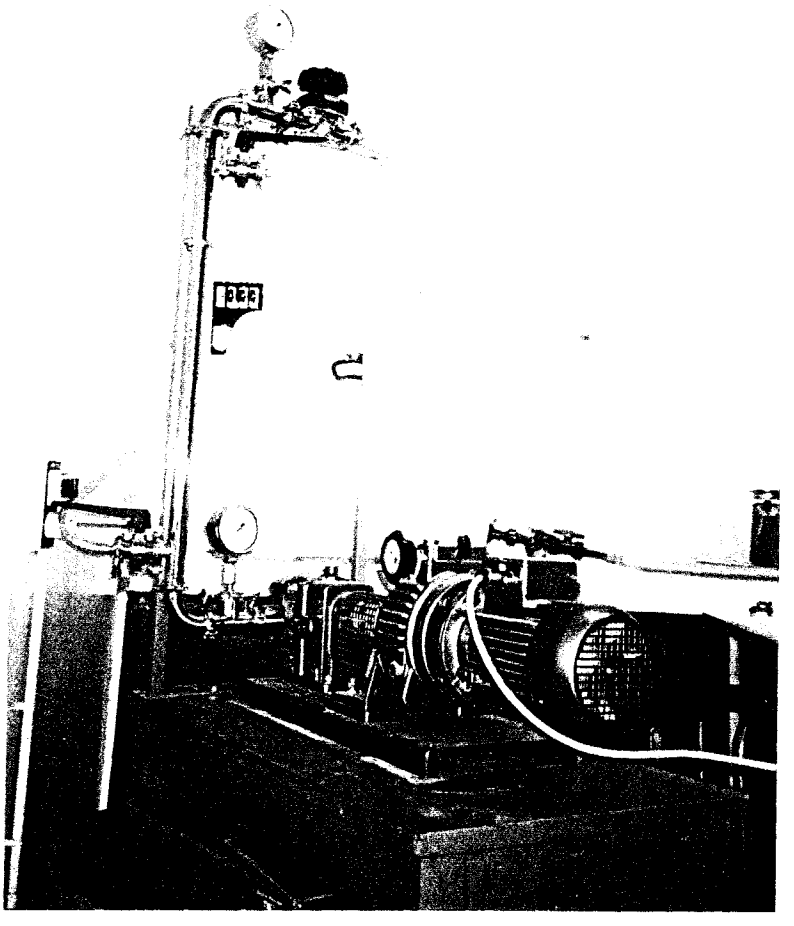
La mise en oeuvre du système pilote nécessite au préalable une étude systématique qui permet d'établir les performances maximales de la membrane. L'intérêt essentiel de l'étude systématique est de :

➢ Travailler dans des conditions opératoires réellement adaptées plutôt que dans des conditions moyennes (débits, pressions)

➢ Définir clairement les phases du process de filtration (économie de temps et de fluide)

➢ Qualifier une méthode de nettoyage

Photographie N°8 : Installation pilote utilisée en laboratoire.



E.II.1.- OPTIMISATION DES CONDITIONS HYDRAULIQUES DE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME :

L'objectif est de fixer le débit de régularisation et la pression transmembranaire (PTM) pour lesquels on obtient le meilleur débit filtrat allié à une rétention satisfaisante.

➢ *Processus théorique de réglages des différents paramètres hydrauliques :*

Pour cela, il faut dans un premier temps régler le système sur une PTM moyenne donnée par le fabricant de 2,1 bars à 25°C.

La PTM : pression transmembranaire correspond à la pression moyenne à laquelle est soumise la membrane.(voir chapitre Matériel et Méthode § V.4.)

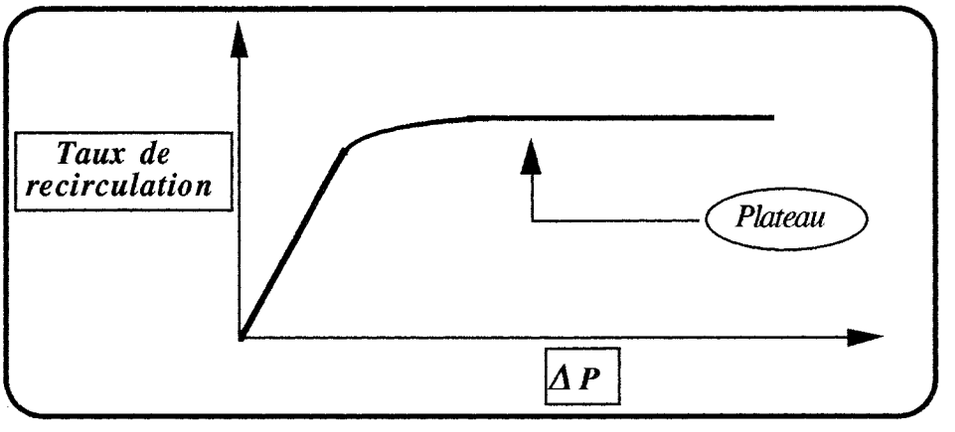
Dans le cas d'une PTM de 2,1 bars, le débit de la pompe doit être réglé pour obtenir une pression d'entrée voisine de 2,5 bars et la vanne de sortie telle que la pression en sortie soit

de 1,9 bars en moyenne. Une fois la pression transmembranaire réglée, le flux (débit, filtrat) est déterminé (dans notre cas, d'après les premiers essais : flux = 410, 25 l/h/m^2). Cette valeur correspondra à la valeur de perméabilité à l'eau initiale pour une membrane neuve.

Il est procédé ensuite au réglage du taux de recirculation optimal pour un ΔP (ΔP = $P_{entrée}$ - P_{sortie}) donné. Ce réglage est déterminé en fixant différents ΔP grâce aux modifications du débit de la pompe tout en conservant la sortie perméat fermée.

Une courbe théorique de ce type doit être obtenue :

Figure N°59 : Evolution du débit de recirculation en fonction de la différence de pression entrée - sortie rétentat.

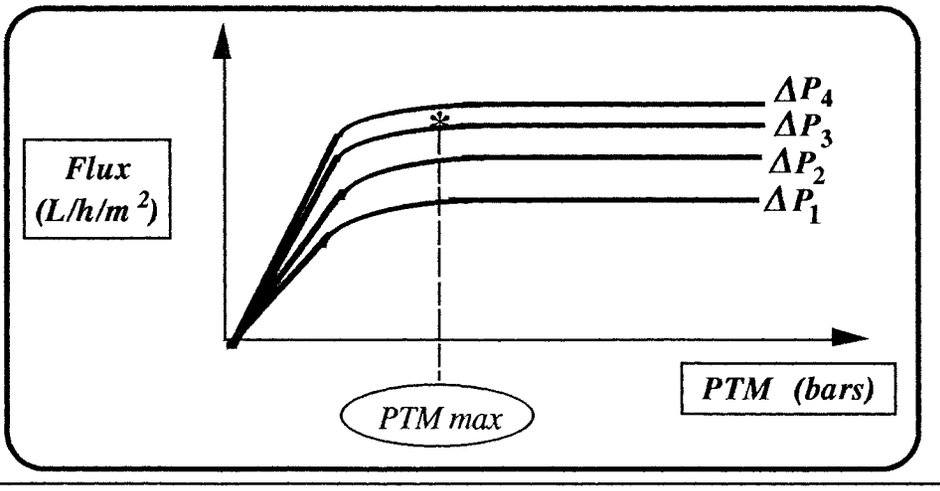


Lorsqu'un plateau est atteint, le taux de recirculation maximale est atteint, la PTM est alors réglée à 2,8-3,5 bars et le flux suivi pendant une heure.

Afin de vérifier les valeurs optimales obtenues, des mesures de flux sont réalisées en fonction de deux variables préréglées l'une après l'autre : le delta P et la PTM.

Un graphe Flux = f (PTM) est réalisé : il devrait se présenter théoriquement sous la forme suivante :

Figure N°60 : Evolution du flux filtrat en fonction de la Pression transmembranaire pour différentes ΔP.



Il est alors déterminé la pression transmembranaire optimale pour le flux optimal et le ΔP optimal (donc le débit de recirculation correspondant optimal). Cette PTM correspond au point (symbolisé *) à partir duquel il n'y a plus augmentation de flux sur le graphe précédemment tracé.

➢ *Application au système pilote utilisé :*

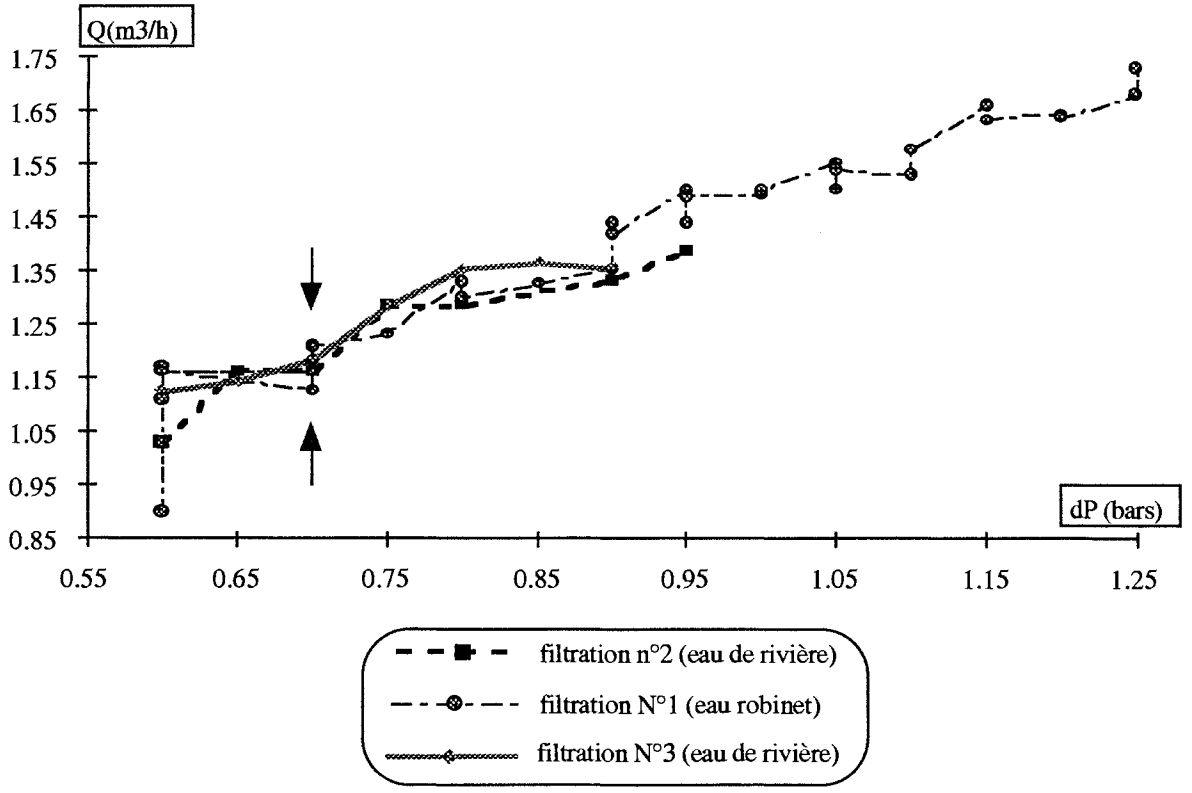
Une série de trois filtrations (l'une à partir d'eau de réseau et les deux autres à partir d'eaux de rivières) a été réalisée afin d'effectuer les divers réglages précédemment cités et de les adapter en fonction du fluide à traiter.

⇨ Réglage du taux de recirculation optimal :

Afin de déterminer le taux de recirculation optimal, l'évolution du débit de recirculation est suivie en fonction de la différence de pression entrée - sortie rétentat (ΔP).

La figure N°61 représente les résultats obtenus au cours des trois essais de filtration réalisés.

Figure N°61 : Détermination du taux de recirculation optimal en fonction de ΔP lors des trois filtrations préliminaires réalisées.



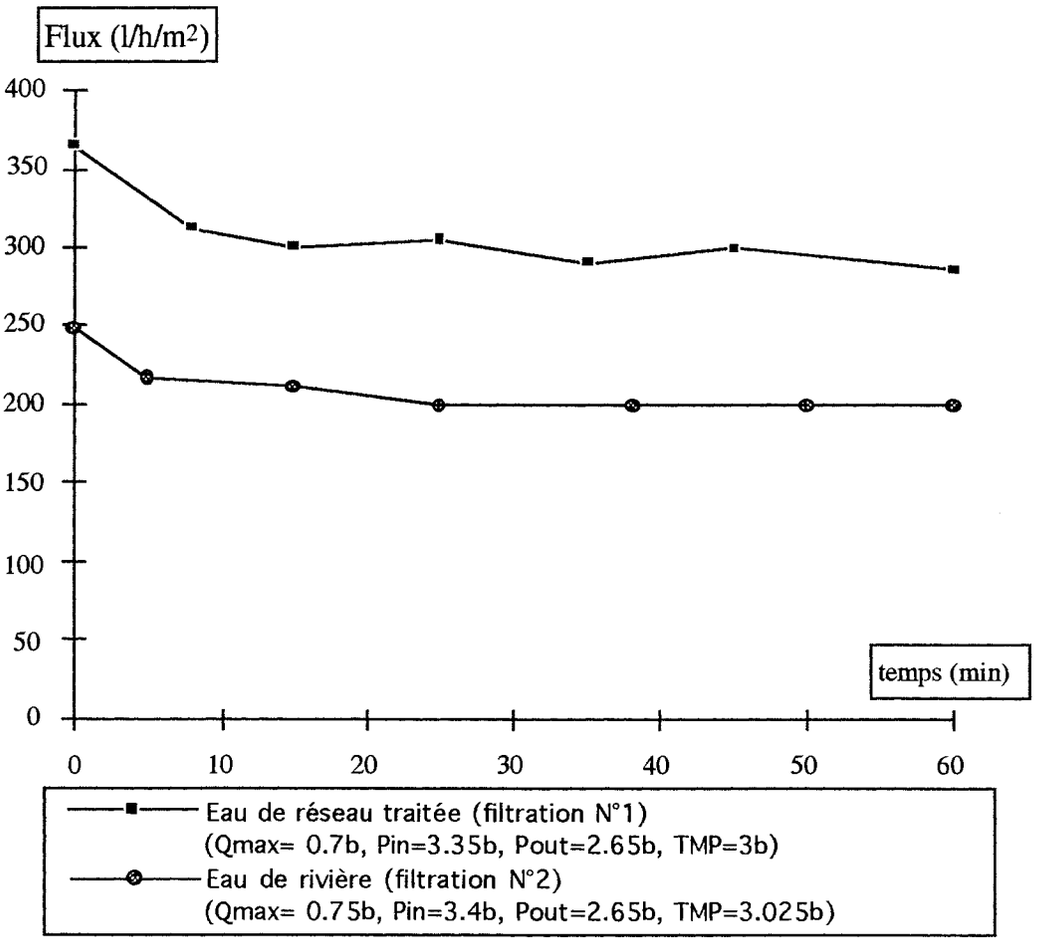
D'après la figure N°61, il apparaît qu'aucun plateau n'a pu vraiment être atteint ce qui signifie que pour les fluides traités ici, eau du robinet et eau de rivière, aucune limitation du système en matière de débit de recirculation n'est décelable. Le pilote pourrait donc sans

contrainte fonctionner avec un débit maximum pour une ΔP supérieure à 1.25. Bien sûr ces conditions de fonctionnement ne sont pas envisageables le pilote fonctionnant dans ces conditions en mode de recirculation totale et donc avec des potentialités de passage du fluide au travers de la membrane réduite. En effet si l'augmentation de la vitesse de circulation et donc du débit de recirculation permet d'accroître l'effet des contraintes de cisaillement à la surface de la membrane, en limitant alors les dépôts et colmatages de surface, plusieurs inconvénients sont remarqués : l'augmentation du débit de recirculation entraîne tout d'abord une diminution importante du rapport débit filtrat / débit de circulation, mais également une consommation énergétique importante (Salvat *et al.*, 1990).

Dans ces conditions et arbitrairement pour les deux premiers essais de filtration, le taux de recirculation a été fixé aux environs de 0.7 - 0.75 bar de ΔP (premier plateau potentiel sur la figure N°61).

L'évolution de flux filtrat a été suivie sur une période d'une heure dans ces conditions (Figure N°62) afin d'évaluer l'importance notamment des phénomènes de colmatage provoquant la réduction plus ou moins rapide du flux filtrat.

Figure n°62 : Evolution du flux filtrat pendant une heure lors de la filtration en eau de rivière et en eau de réseau pour un débit de recirculation maximal.



D'après la figure N°62 , il apparaît qu'aucune chute significative du flux filtrat n'est observée au bout d'une heure, avec un flux moyen stabilisé aux environs de 300 L/h/m2 en eau de réseau et de 200 L/h/m2 en eau de rivière. La chute de flux remarquée entre les deux essais de filtration témoigne par contre d'un certain encrassage de la membrane au fur et à mesure des essais (aucun lavage n'ayant été entrepris entre les différents essais réalisés lors des étapes de réglages du pilote). En effet une augmentation de la concentration initiale en particules (eau de rivière) ou en cours de fonctionnement provoque généralement une diminution du flux de perméat par colmatage de la membrane (Salvat et Leborgne, 1990).

⇨ Réglage de la pression transmembranaire optimale pour un flux filtrat optimal :

L'évolution du flux filtrat en fonction de la pression transmembranaire (PTM) pour différentes valeurs de ΔP est déterminée pour chaque essai réalisé en eau de rivière et de réseau (Figure N°63).

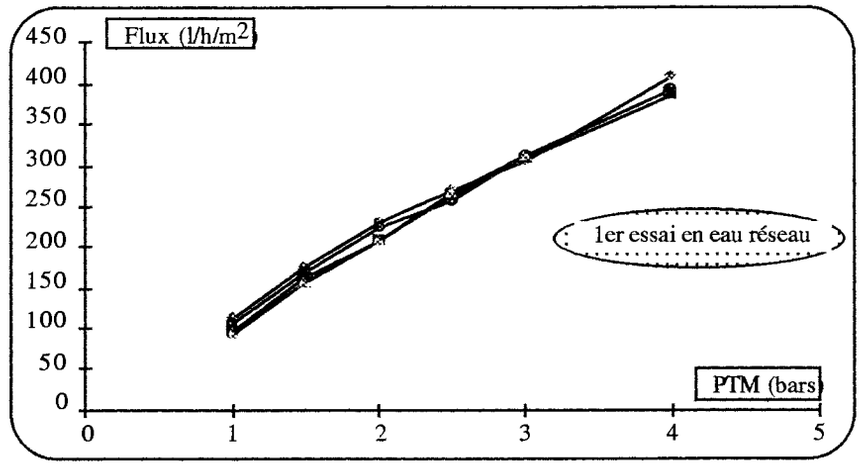
D'après les résultats obtenus au cours des trois essais réalisés, aucune limitation de flux en fonction de la PTM exercée n'apparaît quelque soit la ΔP exercée. Il semblerait donc que le fluide à traiter caractérisé par une faible charge en particules quelles que soient les conditions ne permettrait pas d'obtenir rapidement un colmatage en profondeur de la membrane qui serait limitant.

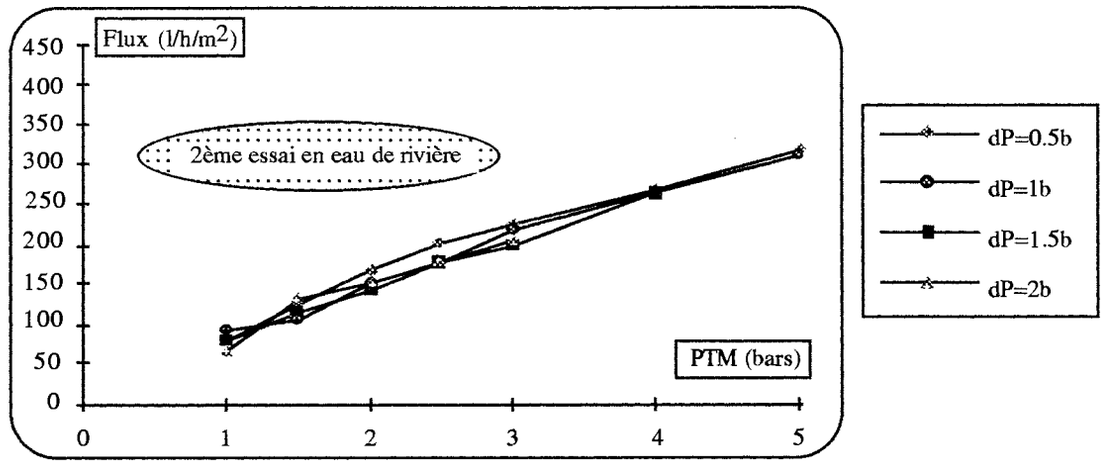
Théoriquement le pilote pourrait donc fonctionner à des pressions transmembranaires aussi élevées que 4 à 5 bars, mais il faut remarquer que dans ce cas de figure, le procédé de filtration se rapprocherait plus d'un mode frontal que d'un mode tangentiel, vu les très fortes pressions exercées à la surface de la membrane et dans ce cas le colmatage serait très important au bout de quelques heures de fonctionnement.

De plus il faut remarquer que l'énergie déployée pour le fonctionnement du système à de telle PTM, serait d'une part très importante et il en résulterait un surcoût de l'exploitation mais également une augmentation très importante de la température à l'intérieur du système et au niveau du fluide à traiter. Afin d'évaluer cet aspect du problème, des mesures de températures au niveau des sorties filtrat, rétentat et dans la cuve d'alimentation ont été réalisées pour plusieurs essais de filtration effectués à différentes ΔP et PTM.

La figure N°64 représente l'évolution de la température au niveau des trois prises d'essais (à savoir : filtrat, rétentat et cuve alimentation) au cours de la durée de chaque cycle de filtration réalisé dans différentes conditions de ΔP et PTM.

Figure N°63 : Evolution du flux filtrat en fonction de PTM pour différentes ΔP au cours des trois essais réalisés en eau de réseau ou de rivière.





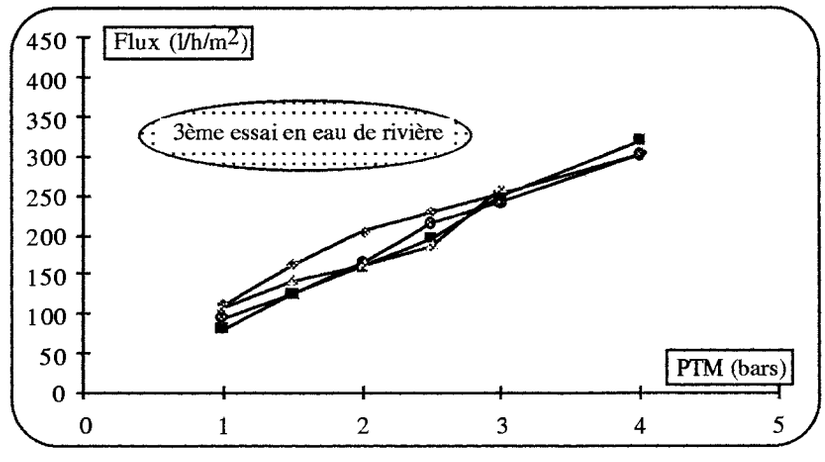
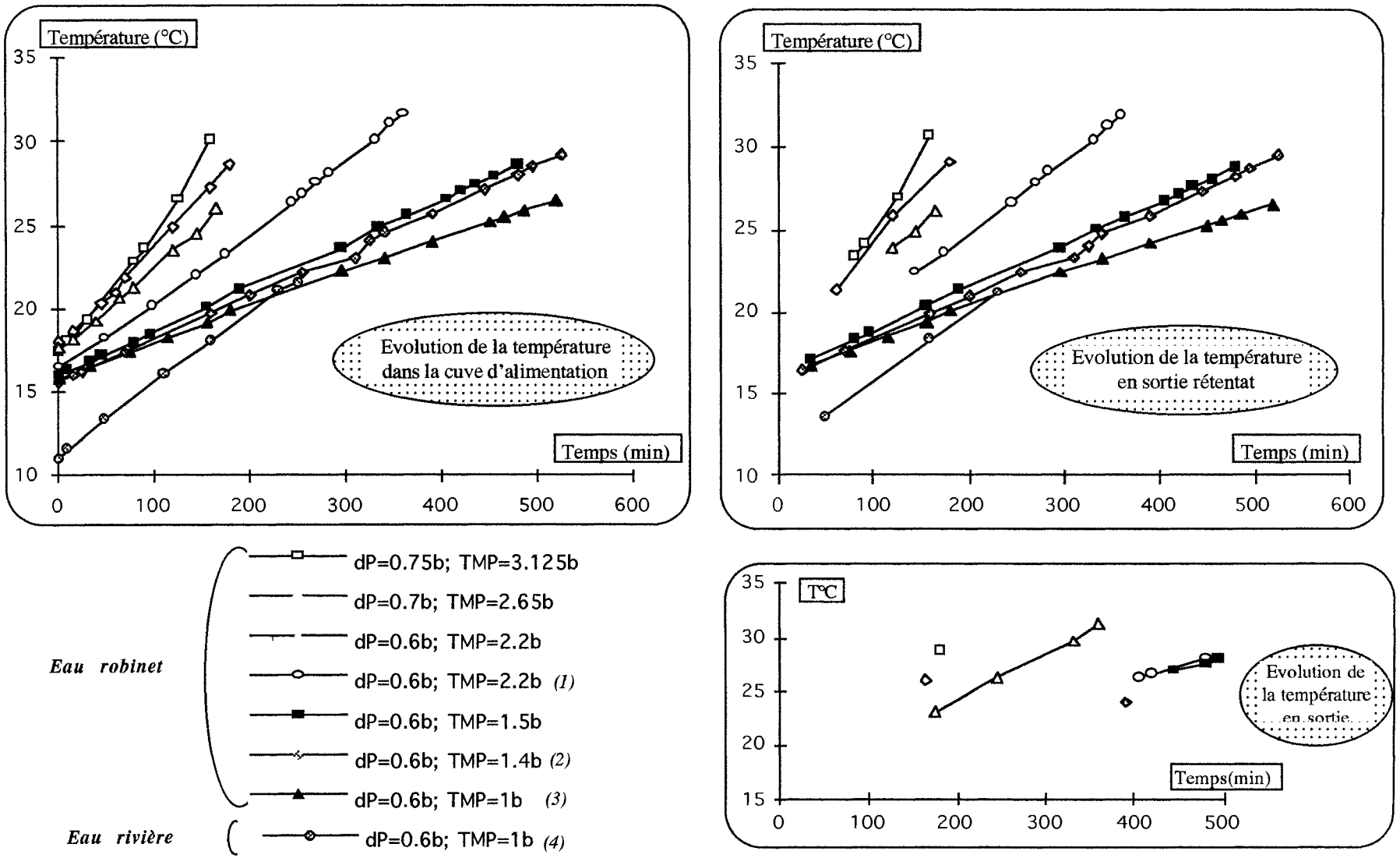


Figure N°64 : Evolution de la température au niveau du filtrat, du rétentat et de la cuve d'alimentation au cours de cycles de filtration réalisés dans différentes conditions de ΔP et PTM.



((*1*) Flux filtrat (Fx f.) : 166.7 l/h/m^2 ; (*2*) FX f.: 100 l/h/m^2, Q : 0.996 m^3/h ; (*3*) FX f. : 75.6 l/h/m^2, Q : 1.035 m^3/h ; (*4*) FX f. : 66.7 l/h/m^2, Q : 1.036 m^3/h.)

D'après les résultats obtenus, il apparaît que quelle que soit la ΔP appliquée (limitée à 0.6 et 0.75 bar, selon les précautions précédemment définies), l'augmentation de PTM provoque une augmentation de la température au niveau filtrat, rétentat et dans la cuve d'alimentation au cours du cycle de filtration. Ainsi pour une PTM voisine de 3 bars, la température en sortie du système atteint très rapidement 30°C précisément dès les 150 premières minutes du cycle de filtration. Par contre une diminution de la PTM jusqu'à 1 bar permet de réduire l'élévation de température aux environs de 25°C pour plus de 500 min de fonctionnement.

Dans ces conditions, et afin de limiter l'élévation de température qui pourrait notamment influer sur l'étude de la viabilité des oocystes au cours du process, mais également afin de limiter la consommation énergétique du système, la pression transmembranaire sera fixée à 1 bar pour la suite de l'étude.

Il faut également remarquer que si le facteur énergétique est privilégié par contre la diminution de la PTM à des valeurs de 1 bar conduit à la réduction du flux filtrat obtenu avec des valeurs allant de 166.7 L/h/m^2 pour une PTM de 2.4 bars à 75.6 L/h/m^2 pour une PTM de 1 bar (en eau de réseau). En eau de rivière un flux filtrat de 66.7 L/h/m^2 est obtenu, la diminution du flux par rapport aux valeurs obtenues pour l'eau de réseau s'expliquant par le colmatage plus important de la membrane dû à la charge en particules plus importante présente en eau de rivière.

Globalement même si un abattement du flux est démontré pour les plus faibles valeurs de PTM, le débit filtrat est encore assez intéressant et permet la filtration de volume important sur des périodes raisonnables. La PTM sera donc fixée à 1 bar , tandis que la ΔP sera fixée à 0.7 bar (en raison du premier plateau observé sur la figure N°61 et l'absence d'influence de ce paramètre sur l'évolution du flux en fonction de la PTM (figure N°63)) pour la suite de l'étude expérimentale.

Il faut également remarquer que les paramètres hydrauliques représentés par la PTM et la ΔP fixés respectivement à 1 bar et 0.7 bar sont en corrélation avec les valeurs conseillées et utilisées habituellement sur les systèmes industriels de traitement et au cours des travaux réalisés sur pilote en filtration tangentiel rapportés dans la bibliographie (Tableau N°39).

D'après les valeurs rapportées dans le tableau N°39, il apparaît que la pression transmembranaire exercée que ce soit au niveau de système pilote ou d'usine de traitement, dépasse rarement les 1.2 bars. Ainsi selon, Salvat et Leborgne, 1990, la pression membranaire devrait toujours être inférieure à 2.5 bars, pour éviter le risque de provoquer un colmatage des membranes "en profondeur" difficile à récupérer. Lahoussine - Turcaud *et al.*, 1991, ont également insisté sur ce point, remarquant que même si l'usine étudiée dans leurs travaux était conçue pour fonctionner sous 2 bars de PTM, il était préférable de diminuer celle ci de moitié pour ne pas favoriser un colmatage par compactage qui nécessiterait pour limiter le phénomène une vitesse de circulation plus élevée et moins économique énergétiquement. De plus ces

auteurs ont remarqué qu'une trop forte PTM favorisait la formation de bulles d'air qui risqueraient d'obstruer les pores de la membrane.

Tableau N°39 : PTM, vitesse de circulation et flux habituellement utilisés au cours des travaux réalisés sur les procédés de filtration tangentielle pour le traitement des eaux.

Système testé	Eaux traitées	Caractéristiques du module de filtration	PTM (bars)	Vitesse de circulation (m/s)	Flux filtrat	Références
Pilote (Amoncourt)	Eaux souterraines karstiques	membrane organique, 0.01µm	0.5-1.2	0.75-2.5	100 L/h/m^2	Bersillon *et al.*, 1989
		membrane minérale céramique, 0.2µm	1.2 1.2 0.5	0.71 1.40 0.5	ND	
Usine de traitement (St-Maurice-les-châteauneuf)	Eaux de sources	membrane minérale céramique tubulaire (Al_2O_3), 0.2µm, 121.6m^2	< 2.5	3 (196 m^3/h)	1m^3/h/m^2	Salvat et Leborgne, 1990
Pilote	Eaux de rivière	membrane organique (dérivé cellulose), fibres creuses, 100000D, 7.2m^2	0.4 à 1	ND	102 - 170 L/h/m2	Jacangelo *et al.*, 1991
Pilote + application usine (Marques)	Eaux souterraines karstiques	membrane minérale céramique tubulaire (Al_2O_3), 0.2µm, 60 m^2	1	5	1m^3/h/m^2	Lahoussine-Turcaud *et al.*, 1991
Usine de traitement (Douchy et Amoncourt)	Eaux souterraines karstiques	Douchy : membrane organique fibres creuses, 0.01µm, 800 m^2	0.4 - 1.2	0.75	10m^3/h	Anselme *et al.*, 1992
		Amoncourt: membrane organique fibres creuses, 0.01µm, 140m^2	0.5 - 1.2	0.9		
Pilote	Effluent secondaire de station d'épuration	membrane minérale multitubulaire, 0.2µm, 0.12 et 0.2 m^2	1.7 - 1.2	3 - 4	0.15 à 0.30 m^3/h/m^2	Pouet *et al.*, 1994
Pilote semi-industriel	Effluent d'eaux usées traitées par Bioréacteur	membrane céramique fibres creuses, 0.1µm, 1.1 m^2	1	ND	60 à 80 L/h/m^2	Trouve *et al.*, 1994

En ce qui concerne la vitesse de circulation utilisée au cours des différents travaux rapportés dans le tableau N°39, il apparaît qu'elle ne dépasse généralement pas des valeurs de 5 m/s. Ainsi selon Salvat et Leborgne, 1990, des valeurs moyennes de 3 m/s représenteraient un juste compromis entre les valeurs élevées permettant d'assurer un bon curage au niveau des

canaux de circulation et les faibles valeurs auxquelles correspondent de faibles coûts énergétiques. Si les valeurs de DP ne sont habituellement pas rapportées dans les travaux publiés, il semble d'après les valeurs de vitesse de circulation conseillées, que les valeurs de 0.7 bar fixées pour la suite de l'étude sur pilote correspondraient tout à fait au compromis envisagé par les différents auteurs.

E.II.2.- DEFINITION D'UN PROTOCOLE DE NETTOYAGE :

La maintenance des membranes est cruciale pour :

- Assurer une filtration efficace et reproductible
- Maintenir un système propre et sanitaire
- Réduire les effets du colmatage
- Garantir la longévité des modules

Ainsi les phases de nettoyage sont primordiales au cours du fonctionnement du système et il faut pouvoir vérifier l'efficacité de ces modes de lavage.

Pour cela, il est nécessaire de mesurer la valeur de la perméabilité à l'eau du système après chaque nettoyage. Celle-ci correspond dans notre cas à la valeur du flux mesuré à une PTM de 2,1 bars à 25°C. Cette valeur est à comparer à celle déterminée initialement sur la membrane neuve (voir § E.II.1.) qui sert de référence.

Pour considérer que le nettoyage est efficace, il faut après la première utilisation, retrouver au moins 80 % de la valeur référence, et pour les utilisations suivantes environ 95 % de la perméabilité après première utilisation. Les agents nettoyants habituellement utilisés dans les systèmes industriels sont :

- NaOH (0,5 à 3 %) afin d'éliminer les dépôts d'origine organique
- Acide citrique (0,5 %) ou nitrique (3 %) afin d'éliminer les dépôts d'origine minérale (Tazi-Pain *et al.*, 1992, Salvat et Leborgne, 1990).

Des décolmatages à contre courant utilisant des solutions d'hypochlorite sont également utilisés avant d'arriver au stade des lavages acides ou basiques. Ces décolmatages nécessitent un système de "backpulse" dont notre système n'est pas encore équipé.

Un procédé de nettoyage employant une séquence de décolmatage à la soude 2% puis à l'acide nitrique 2% a été employé et testé après la réalisation des séries d'essais préliminaires de filtration. Le protocole employé est détaillé au Chapitre Matériels et Méthodes § V.5.. Une phase de décontamination du système à l'eau javellisée a permis d'assurer l'élimination et la limitation de la prolifération des microorganismes à l'intérieur du système entre les différents cycles de filtration.

Le premier cycle de lavage complet, réalisé à la fin des séries de filtration préliminaires, a conduit à une mesure de la perméabilité à l'eau du système afin d'évaluer les performances du

protocole adopté. Afin d'apprécier l'encrassement du système une mesure de perméabilité à l'eau a également été effectuée avant lavage.

Le débit filtrat pour une "eau pure" (eau du robinet) a donc été mesuré dans les deux cas (avant et après lavage) pour une PTM de 2.1 bars (conditions prédéfinies au départ pour la perméabilité à l'eau cf. § V.4., chapitre matériels et méthodes).

Le flux déterminé dans ces conditions avant lavage était de 138 L/h/m^2 et après lavage de 658 L/h/m^2. Ces valeurs sont à comparer avec la valeur de perméabilité à l'eau initiale obtenue pour la membrane neuve : 410.25 L/h/m^2.

Il faut tout d'abord remarquer que la valeur obtenue après lavage est supérieure à la valeur initiale. L'explication de ce phénomène réside dans le fait que la membrane mise à disposition par le fournisseur était une membrane de démonstration dont l'encrassement de départ ne devait pas être négligeable, et donc la valeur de perméabilité de départ a pu être faussée.

Dans tous les cas, il apparaît que les séquences de lavage permettent de revenir à une perméabilité à l'eau supérieure à celle mesurée au départ, et donc le protocole choisi permet d'atteindre de très bonnes performances. L'encrassement de la membrane avant lavage de 66.4% supérieur à l'encrassement initial , a ainsi été réduit totalement après lavage.

Le procédé de nettoyage est donc validé et sera utilisé régulièrement au cours de la suite de l'étude.

E.III.- EVALUATION DES PERFORMANCES DU SYSTEME PILOTE POUR L'ELIMINATION DE CRYPTOSPORIDIUM DANS L'EAU :

L'efficacité du système pilote pour l'élimination de *Cryptosporidium* a été évaluée au cours de trois séries d'expériences distinctes :

- Une première série (série 1) permettant d'évaluer l'efficacité du système pour l'élimination de *Cryptosporidium* dans des eaux de rivières fortement contaminées (essais réalisés sur des échantillons de 200 L d'eaux de rivières contaminées artificiellement à raison de 10^5 oocystes /L en moyenne).

- Une seconde série (série 2) d'essais permettant d'évaluer l'efficacité dans les mêmes conditions mais également d'évaluer l'impact sur la viabilité des oocystes du traitement des concentrats par les eaux de lavages.

- Enfin une troisième série (série 3) d'essais réalisée sur des échantillons non contaminés artificiellement afin d'évaluer les performances du système sur des échantillons faiblement contaminés.

Au cours de tous les essais, les performances du système ont été suivies au niveau de trois paramètres principaux :

- Le suivi des performances hydrauliques du système au cours des cycles de filtration afin d'évaluer la prédisposition au colmatage du système.

- Le suivi des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon traité au niveau alimentation, filtrat et concentrat. Ces analyses ont permis d'évaluer les performances du système notamment sur l'élimination de la turbidité et des MEST, afin d'obtenir un élément de comparaison avec les résultats obtenus dans la bibliographie mais également afin d'apprécier les performances du système sous un autre angle que l'élimination des parasites.

- Enfin la détection de *Cryptosporidium* au niveau des trois phases : alimentation, filtrat et concentrat afin de suivre le devenir des oocystes au cours des cycles de filtration.

Le protocole général de l'expérimentation est décrit au Chapitre Matériels et méthodes § V.3.. L'ordre général de réalisation des différents essais et les caractéristiques respectives de chaque cycle de filtration sont décrits dans le tableau N°40.

Tableau N°40 : Descriptif général des différents essais de filtration réalisés au cours des trois séries d'expérimentation.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Essai 6	Essai 7	Essai 8	Essai 9
Contamination départ (oocystes/200L)	$1.23\ 10^7$	$1.95\ 10^7$	$2.93\ 10^7$	$2.48\ 10^7$	sans	sans	$3.81\ 10^7$	$3.81\ 10^7$	sans
durée du cycle (min)	345	410	460	400	335	475	580	580	570
Lavage	non	non	non	oui	non	non	oui	oui	non
Décontamination	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Détermination viabilité dans concentrat	oui	oui	oui	oui	non	non	oui	oui	non
Appartenance série	série 1	série 1	série 1	série 2	série 3	série 3	série 2	série 2	série 3

Les caractéristiques et l'ordre de réalisation des essais présentés dans le tableau N°40 sont particulièrement importants notamment pour la compréhension des phénomènes de colmatage non réversibles remarqués en fin d'expérimentation (voir § E.III.1.).

E.III.1.- PERFORMANCES HYDRAULIQUES DU SYSTEME PILOTE :

Au cours de tous les essais, les paramètres hydrauliques du système ont été fixés pour

la pression transmembranaire (TMP) à une valeur de 1 bar et pour ΔP (différence de pression entrée - sortie rétentat caractérisant le débit de recirculation) une valeur de 0.7 bar.

Pour chaque essai l'évolution du flux filtrat et de la température au cours du cycle de filtration a été déterminée, afin d'évaluer les performances hydrauliques du pilote dans les conditions testées (Figures N°65 (A, B et C)).

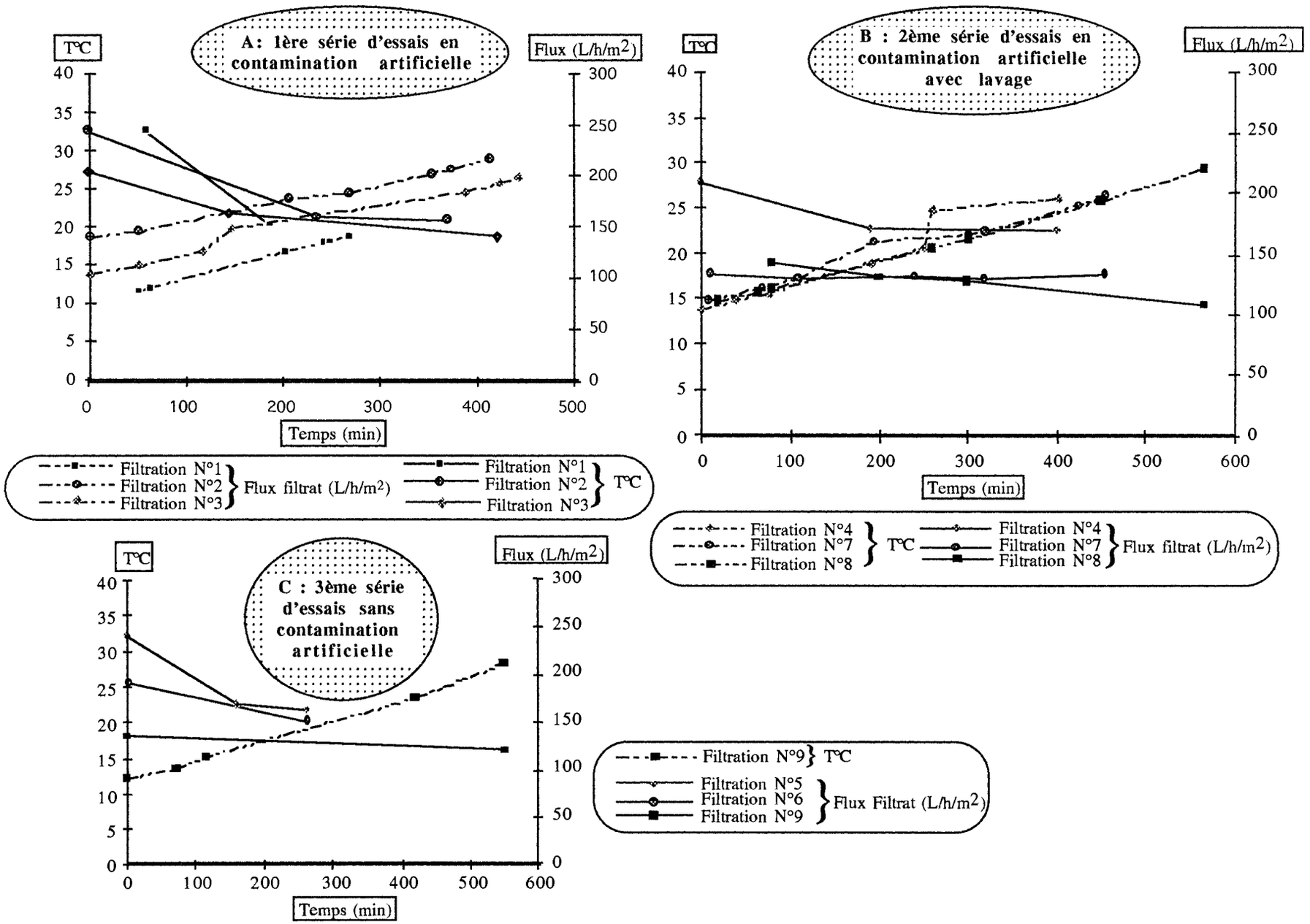
➢ *Evolution du flux filtrat* :

D'après les résultats présentés sur la figure N°65, il apparaît que le flux filtrat décroît tout au long du cycle de filtration à partir d'une valeur initiale voisine en moyenne de 200 L/h/m^2 et atteignant en fin de cycle de filtration (après 6 à 8 heures de fonctionnement) des valeurs moyennes de 100 à 150 L/h/m^2. Cette diminution du flux filtrat au cours des cycles de filtration témoigne d'un encrassement croissant de la membrane provoquant l'augmentation de la résistance au passage du fluide au travers de celle ci. Les profils assez semblables obtenus quelle que soit la nature de l'échantillon de départ (contamination artificielle ou non) ne laisse présager d'aucune responsabilité des oocystes dans les phénomènes de colmatage.

Il faut également remarquer que les valeurs de flux filtrat enregistrées au cours des différents cycles de filtration sont tout à fait dans la gamme de flux habituellement rapportés pour le traitement d'échantillons d'eaux sur des systèmes similaires et variant selon Trouve *et al.*, 1994 et Pouet *et al.*, 1994 de 60 à 300 L/h/m^2 (voir tableau N°39).

Il n'en demeure pas moins qu'un colmatage de la membrane est observé provoquant la chute du flux filtrat tout au long du cycle, et ceci malgré les contraintes de cisaillement qui limitent les dépôts de particules . Ainsi, même si dans la plupart des cas les cycles de lavage ou de décontamination ont permis entre chaque essai de rétablir un flux filtrat au départ du cycle de filtration toujours voisin de 200L/h/m^2, témoignant de l'efficacité des protocoles de nettoyage utilisés, il faut remarquer que les phases de lavage répétées entraînent un coût de production très élevé lors du fonctionnement en continu (période supérieure à 8 h en industrie). Une des alternatives à ce problème est l'utilisation de "backpulse" c'est à dire des contre-lavages en flux inverse réalisés par envoi sous pression du filtrat au travers de la membrane (de l'extérieur vers l'intérieur). Des phases de déconcentration peuvent également être ajoutées à ce procédé de décolmatage. En effet la rétention des particules dans la boucle de recirculation provoque un enrichissement progressif en matières en suspension et il est donc nécessaire (lors de fonctionnement en continu sur installation industrielle) de procéder régulièrement à des chasses de manière à déconcentrer la boucle et ainsi limiter le colmatage de la membrane (Salvat et Leborgne, 1990 ; Ben Aim *et al.*, 1993). Dans tous les cas, ces procédés de décolmatage ne dispensent pas de la nécessité après une certaine durée de fonctionnement de réaliser des nettoyages chimiques qui permettent de rendre aux membranes leurs capacités de filtration initiales (en terme de flux de perméat).

Figure N°65 : Evolution du flux filtrat et de la température au cours des différents cycle de filtration réalisés.



Pour les essais N°7, 8 et 9 réalisés en fin d'expérimentation, les valeurs de flux de départ n'ont pu être rétablies ce qui témoigne d'un encrassement de la membrane résistant aussi bien aux phases de décontamination qu'aux phases de décolmatages par l'acide et la soude.

Pour ces trois essais un colmatage irréversible de la membrane est suspecté. En effet les valeurs de flux filtrat au départ ne dépassent pas 150 L/h/m^2 et ne sont soumises au cours du cycle de filtration qu'à une décroissance très faible conduisant à des valeurs de flux filtrat voisines de 100L/h/m^2. Aucun changement potentiel n'étant intervenu dans la composition de l'échantillon de départ, le colmatage brusque et irréversible de la membrane ne semble pas être dû à des particules initialement présentes dans le fluide à traiter.

L'explication de ce phénomène peut par contre résider dans l'introduction d'un composé très colmatant en alimentation après le 6ème cycle de filtration réalisé ; et en effet il faut remarquer que le robinet disposé entre la cuve et la pompe d'alimentation a été consolidé par un joint de colle juste après le 6ème cycle de filtration, ce qui correspond tout à fait avec l'apparition des phénomènes de colmatage irréversible. Des résidus de cette colle ont donc pu entrer dans le système au cours des phases de rinçage du pilote précédent la mise en service du système pour le 7ème essai. La composition de cette colle est non définie mais sa texture est garantie pour résister à l'action d'agents corrosifs comme l'acide et la soude ce qui explique l'échec des phases de lavages réalisées pour décolmater le système. Il faut également signaler que l'hypothèse du colmatage de la membrane par de la colle a été confirmée lors du démontage du système pilote en fin d'expérience et plus précisément lors de l'examen du barreau en céramique sur lequel des lambeaux de joint de colle très importants ont été décelés.

➢ *Evolution de la température :*

Au cours de tous les cycles de filtration mis en oeuvre, la température mesurée au niveau de la cuve d'alimentation n'a jamais dépassé les 30°C. Cette température est tout à fait conforme au seuil de résistance des oocystes dans l'eau pour des périodes aussi courtes que les 8 heures maximum de filtration rapportées pour le traitement de 200 L d'eaux.

Le facteur température n'entrera donc pas dans les considérations relatives à l'impact du système sur la viabilité des oocystes.

E.III.2.- CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ECHANTILLONS ET IMPACT DE LA FILTRATION SUR CERTAINS DE CES PARAMETRES :

Les trois paramètres physico-chimiques principaux mesurés au cours de l'analyse des fractions filtrat, concentrat et alimentation pour chaque cycle de filtration sur pilote sont la turbidité, les matières en suspension totale et le carbone organique total. L'étude de l'évolution de ces paramètres en fonction des différentes fractions d'échantillons testées a permis d'évaluer les performances générales du système pilote.

Les deux autres paramètres physico-chimiques déterminés sont le pH et la conductivité des différentes fractions qui permettent de donner des informations sur les caractéristiques de surface du parasite au cours des différentes phases du process. La prédiction de la charge de surface et de l'hydrophobicité des oocystes suivant le pH et la conductivité de la suspension pouvant être réalisée d'après les résultats rapportés au chapitre B, des renseignements sur le comportement des oocystes et notamment sur leur adhésion et leur "décrochage" éventuel de la membrane au cours des lavages ont pu être déterminés.

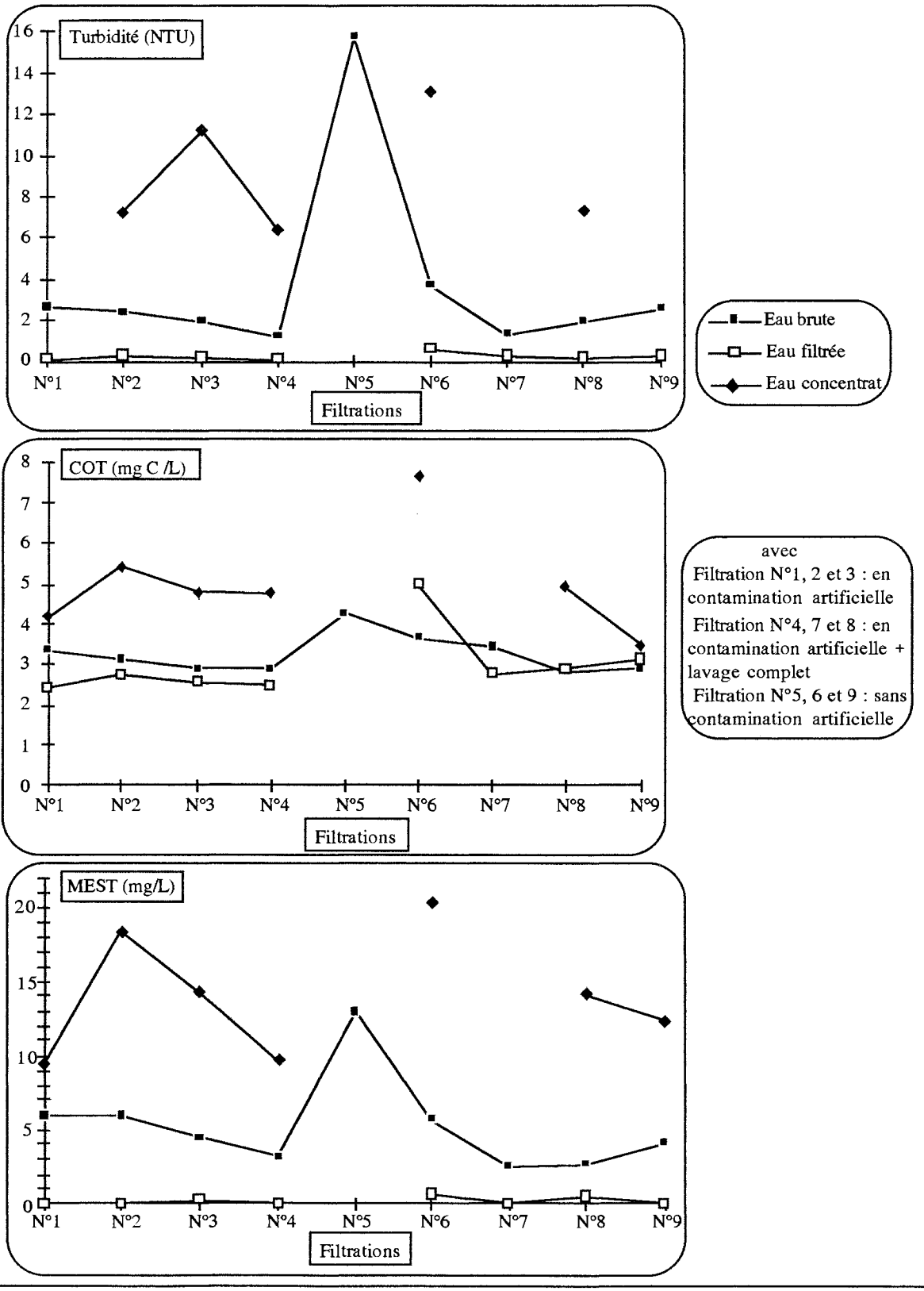
E.III.2.1.- Evolution des paramètres turbidité, MEST et COT au niveau alimentation, filtrat et concentrat au cours des cycles de filtration sur pilote :

La turbidité, les matières en suspension totale et le carbone organique total sont trois paramètres qui permettent d'évaluer l'abattement en particules dans le fluide filtré et le degré de concentration obtenu dans le rétentat après un cycle de filtration. L'évolution de ces trois paramètres au niveau alimentation, filtrat et concentrat permet donc d'évaluer la capacité de rétention du système de microfiltration (Figure N°66).

D'après la figure N°66, il apparaît que la turbidité en sortie filtrat est réduite à des valeurs variant de 0.12 à 0.59 NTU, soit un abattement moyen de 88.9% par rapport aux valeurs de turbidité relevées pour l'eau brute, et les matières en suspension totale varient de 0 à 0.6 mg/L, soit un abattement moyen de 95.3%. Il semble donc que le système permet d'obtenir avec des valeurs moyennes de turbidité et de MEST de 0.25 NTU et 0.18 mg/L une qualité physico-chimique très bonne de l'eau microfiltrée. Ces résultats sont en corrélation avec les valeurs rapportées par Salvat et Leborgne, 1990 qui ont relevé des turbidités résiduelles en moyenne de 0.2 NTU pour des eaux de sources traitées par microfiltration tangentielle sur membrane céramique de 0.2µm. Pouet *et al.*, 1994 ainsi que Ben Aim *et al.*, 1993 ont rapporté également des résultats identiques lors de l'étude des performances de système similaire pour le traitement d'eaux usées. Ainsi selon Ben Aim *et al.*, 1993, ce type de système permettrait de répondre dans une certaine mesure aux standards de qualité de l'eau de consommation notamment au niveau de la turbidité, pour laquelle les systèmes classiques de traitement sur filtre à sable ne garantissent pas toujours en continu des valeurs aussi faibles que 0.2 NTU.

Par contre, en ce qui concerne le carbone organique total des valeurs variant de 2.44 à 5 mg C /L sont relevées en sortie filtrat, ce qui ne témoigne d'un abattement que de 17.2 % par rapport à l'eau brute. Il faut remarquer à ce niveau que sur la figure 66, il apparaît que les valeurs de COT en sortie filtrat dépassent dans certains cas celles relevées pour l'eau brute ; l'explication de ce phénomène réside dans un problème de flaconnage des prélèvements qui a interféré, par relarguage de carbone dans l'échantillon, dans les mesures de COT réalisées. Les mesures réalisées pour ces trois prélèvements n'ont donc pas été prises en compte.

Figure N°66 : Evolution générale de la turbidité, de la teneur en matière en suspension totale (MEST) et du carbone organique total (COT) dans l'eau brute, l'eau filtrée et l'eau concentrée au cours des 9 filtrations dans l'ordre chronologique de réalisation.



Globalement avec des valeurs moyennes de 3 mg C / L en sortie filtrat contre 3.15 mg C / L dans l'eau brute, il apparaît que le système de traitement employé n'est pas très performant notamment pour l'élimination des fractions solubles dans les échantillons testés.

Cette constatation avait déjà été rapportée par Pouet *et al.*, 1994 ainsi que par Bersillon *et al.*, 1989 qui avaient également remarqué un abattement moyen de 20% du COT en sortie filtrat pour une installation utilisant un procédé d'ultrafiltration (0.01µm) tangentielle pour la production d'eau potable. Il apparaîtrait donc que la microfiltration et l'ultrafiltration seules ne seraient pas suffisantes pour éliminer les plus petites molécules comme par exemple les précurseurs des THM (Ben Aim *et al.*, 1993). Une alternative à ce problème pourrait être l'utilisation de charbon actif couplé à la filtration comme le suggèrent Anselme *et al.*, 1992. Ces auteurs proposent ainsi d'introduire du charbon actif en poudre (CAP) dans l'eau brute tout en gardant le même mode de fonctionnement du système. L'ajout de CAP ne modifie pas l'hydraulique du système, son rôle est d'éliminer les matières organiques dissoutes de faible masse moléculaire qui ne sont pas retenues par les membranes : pesticides, solvants, micropolluants occasionnels, précurseurs de la formation de sous produits de chloration et une partie du carbone organique dissous. L'adsorption sur le charbon des composés organiques responsables du colmatage irréversible limite de plus la fréquence des régénérations de la membrane. La porosité du gâteau de colmatage est également augmentée par la présence des particules de charbon actif, le décolmatage par les séquences de lavage est donc facilité. Ainsi, selon Anselme *et al.*, 1992, le couplage CAP et ultrafiltration permet d'obtenir un abattement du COT de 40 à 80% et une performance toujours plus importante que les procédés de filtration tangentiel appliqués seul.

Dans tous les cas une augmentation très nette de la turbidité, des MEST et du COT est observée dans le concentrat par rapport à l'eau brute, ce qui témoigne des performances de rétention du système.

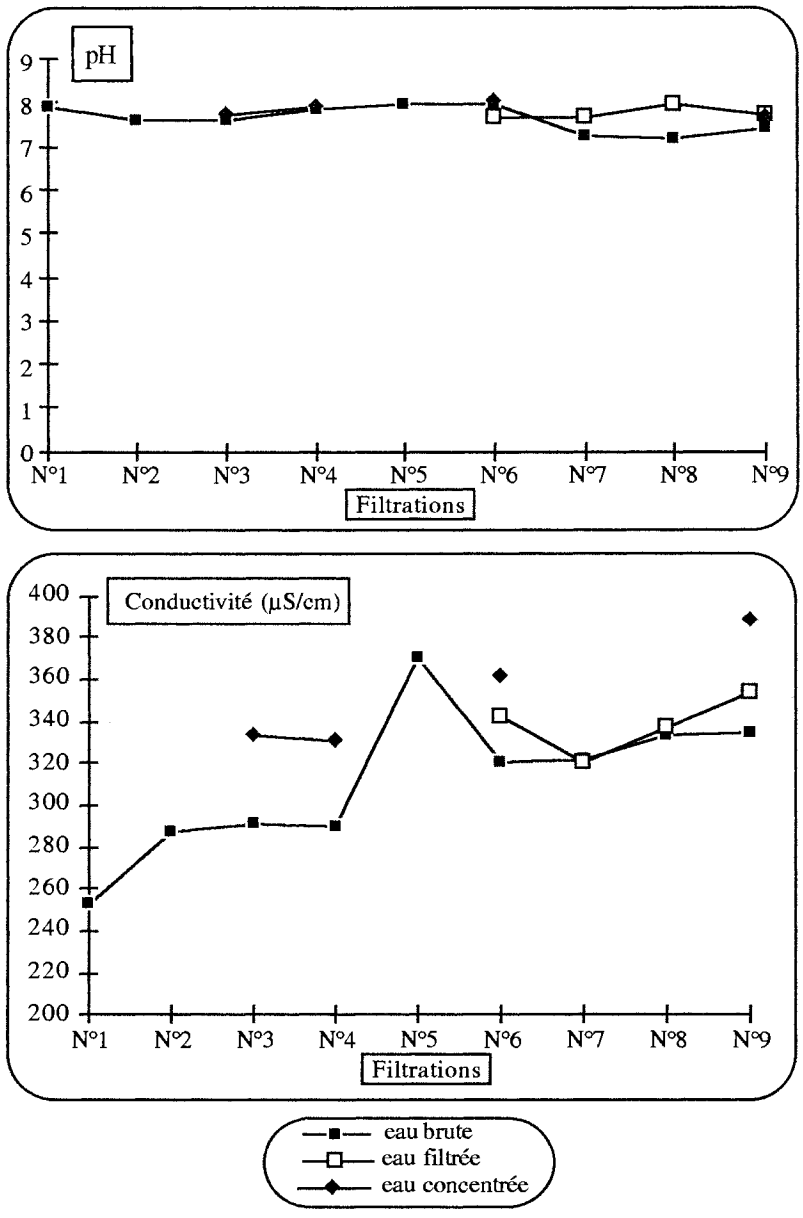
E.III.2.2.- Caractérisation du pH et de la conductivité des différentes fractions collectées :

Des mesures de pH et de conductivité ont été réalisées sur les différentes fractions eau brute, filtrat et rétentat pour les différents cycles de filtration réalisés (Figure N°67).

La définition des valeurs de ces paramètres a permis d'établir, grâce à l'étude préliminaire (chapitre B) sur l'évolution de la charge de surface et de l'hydrophobicité des oocystes de *Cryptosporidium* dans l'eau en fonction du pH et de la conductivité de la suspension, les caractéristiques de surface potentielles des oocystes dans les différentes phases du process de microfiltration.

Il apparaît ainsi sur la figure N°67, que le pH de la suspension demeure à peu près constant tout au long des cycles de filtration pour les différentes fractions étudiées avec des valeurs variant de 7 à 8.

Figure N°67 : Evolution générale du pH et de la conductivité dans l'eau brute, l'eau filtrée et l'eau concentrée au cours des 9 filtrations dans l'ordre chronologique de réalisation.



Par contre une certaine fluctuation de la conductivité est déterminée notamment dans l'eau brute selon les différents échantillons traités. Cette variation suit d'ailleurs l'aspect général des courbes obtenues en eau brute pour leur teneur en MEST ou leur turbidité (Figure N°66) et décrit les fluctuations relatives à la nature des échantillons dont les caractéristiques varient notamment suivant les chutes de pluie rapportées à la date de prélèvement en rivière.

D'une manière générale la conductivité dans les différentes fractions varie entre 250 et 390 µS/cm.

Pour cette gamme de pH (7 - 8) et de conductivité (250 - 390 µS/cm) et d'après les

résultats décrits au chapitre B, le caractère hydrophobe de *Cryptosporidium* ne dépasse pas 30% et sa charge de surface est comprise entre -25 et -27 mV. Dans ces conditions et de par les caractéristiques intrinsèques de la membrane, hydrophile et négativement chargée, les phénomènes d'adhésion des oocystes à la surface de celle ci doivent être très limités. Cette constatation est très favorable car elle conduit à envisager une diminution de la probabilité de passage des oocystes au travers de la membrane. En effet l'adhésion des oocystes à la membrane aurait pu favoriser et prédisposer par un effet cumulatif le passage des oocystes au travers de la membrane du fait de la plus grande probabilité de passage inhérente à la présence de quantité très importante d'oocystes à proximité de la barrière membranaire.

Il faut également constater ici que les valeurs de pH extrêmes utilisées lors des séquences de lavages permettent de pallier à tout phénomène d'adhésion des oocystes aux surfaces filtrantes puisque lors de la première phase de nettoyage à pH très basique les oocystes développent une charge de surface très négative (-35 mV à pH 12) entraînant l'augmentation des forces de répulsion vis-à-vis de la membrane et au cours de la deuxième phase le potentiel de surface des oocystes est neutralisé limitant toutes interactions électrostatiques éventuelles.

E.III.3.- ELIMINATION DE CRYPTOSPORIDIUM AU COURS DU PROCESS DE MICROFILTRATION :

L'élimination de *Cryptosporidium* au cours du process de microfiltration a été évaluée à deux niveaux : - Tout d'abord au niveau de l'abattement du nombre d'oocystes dans le filtrat permettant d'évaluer les performances du système pour l'élimination de *Cryptosporidium* dans l'eau traitée;

- Ensuite au niveau de la résistance des oocystes concentrés au traitement lui-même mais également aux solutions de lavages mélangées aux rejets.

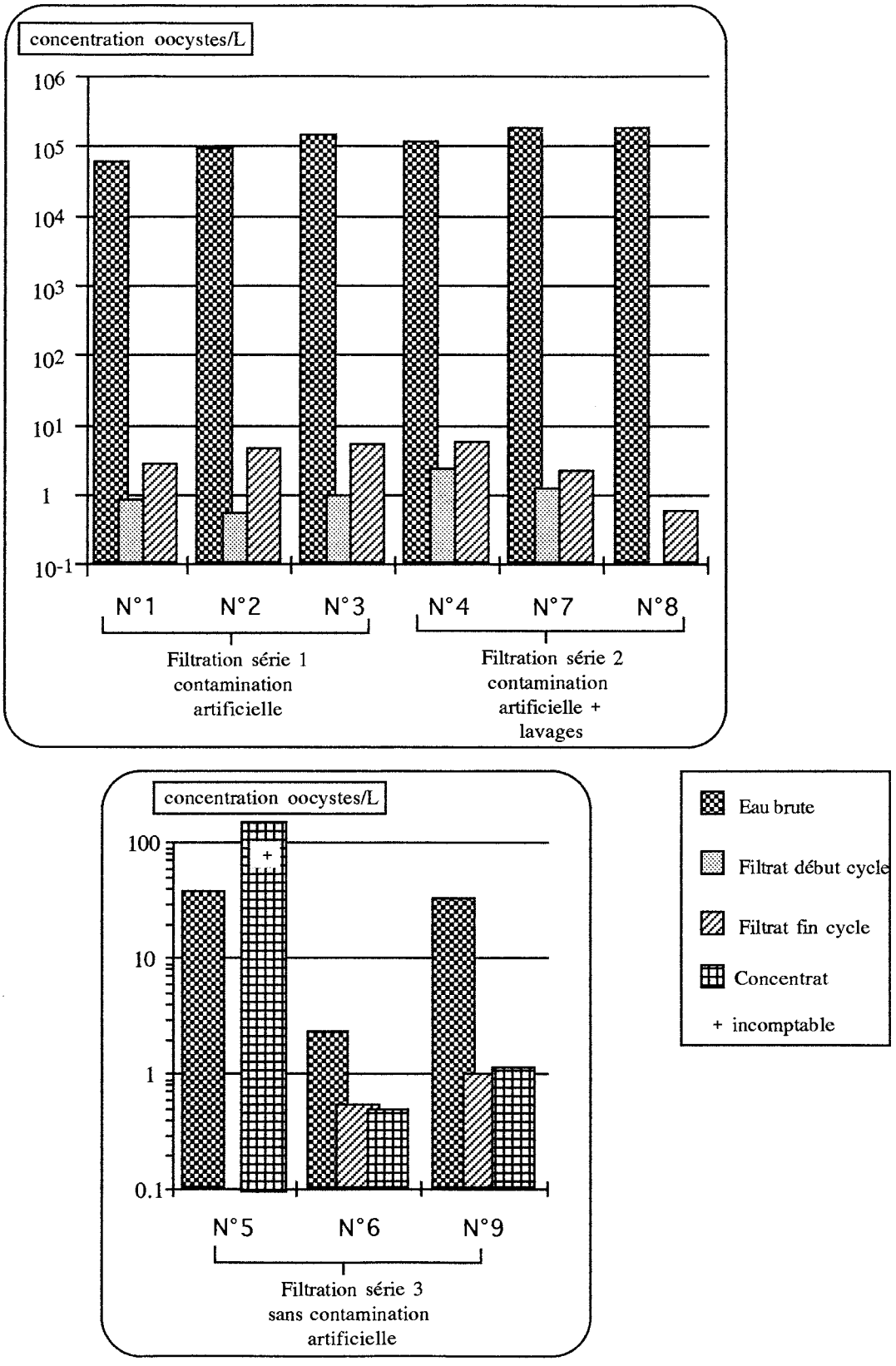
E.III.3.1.- Efficacité du système pilote pour l'élimination de Cryptosporidium dans l'eau traitée :

Parmi les 9 cycles de filtration mis en oeuvre, 6 ont permis d'évaluer la rétention des oocystes lors du traitement d'échantillons fortement contaminés (contamination artificielle à raison de 10^5 oocystes /L d'eau brute) et 3 ont permis d'apprécier les performances du système dans le cas d'une eau non dopée.

A partir d'échantillons de 20L prélevés en eau brute, filtrat et concentrat, la détection de *Cryptosporidium* a été réalisée, selon le protocole décrit au chapitre D, et mettant en oeuvre un protocole de concentration des oocystes par floculation puis identification après coloration par immunofluorescence indirecte (voir chapitre Matériels et Méthodes § V.3.2.2.).

Les résultats de l'analyse parasitologique des différentes fractions sont rapportés sur la figure N°68.

Figure N°68 : Evolution de la concentration en oocystes au cours du process de filtration pour chacun des 9 essais réalisés.



D'après la figure N°68, il apparaît que pour tous les essais réalisés en contamination artificielle un abattement très important de la quantité d'oocystes dans le filtrat est obtenu. Par contre il faut remarquer que dans tous les cas de filtrat analysé la présence d'oocystes a été détectée et généralement en plus grande quantité dans les prélèvement de filtrat réalisés en fin de filtration par rapport à ceux réalisés en début de cycle. Le passage de *Cryptosporidium* à travers le système a d'ailleurs été remarqué également lors de la série d'expérience réalisée sur des échantillons non contaminés artificiellement et présentant une très faible concentration en oocystes dans l'eau brute.

Cette présence d'oocystes détectée dans les filtrats indiquent que les oocystes ont pu passer à travers le système ou bien la présence d'une contamination extérieure avant analyse des prélèvement. La deuxième hypothèse semble la moins vraisemblable car en effet toutes les précautions de décontamination ont été prises avant la réalisation des prélèvements et des analyses parasitologiques : ainsi les bidons utilisés pour le prélèvement ont été javellisés et autoclavés avant utilisation et l'ensemble du système pilote a été systématiquement décontaminé grâce à une phase de lavage à l'hypochlorite de sodium entre chaque utilisation.

La présence de *Cryptosporidium* en sortie filtrat serait donc expliquée par un passage au travers du système membranaire. Or si l'on se réfère au seuil de coupure employé et garanti par le fabriquant, la membrane de microfiltration est caractérisée par une porosité de 0.2µm, ce qui ne permet pas dans des conditions normales le passage des oocystes caractérisés par un diamètre de 4 à 6 µm. Il faut pourtant noter que cette hypothèse ne peut être complètement écartée du fait de la haute déformabilité des oocystes capables selon plusieurs auteurs de passer, malgré leur taille, à travers des systèmes de filtration frontale d'une porosité de 1 à 3 µm (Drozd et Schwartzbrod, 1993 ; Rose, 1990). De même le passage de bactéries comme *Pseudomonas diminuta* ou de coliformes fécaux de tailles comprises entre 1 et 2 µm a été rapporté à travers des systèmes de microfiltration tangentielle sur membrane céramique de 0.2µm, identique aux membranes testées ici (Mandra *et al.*, 1995), ce qui démontre que des microorganismes de taille supérieure au seuil de coupure de la membrane sont potentiellement capables de franchir le système.

La troisième hypothèse relative au passage des oocystes dans les filtrats est la potentialité d'une fuite dans le système due à une défectuosité de la membrane ou encore au problème de fixation des joints assurant l'étanchéité du système (et donc la séparation filtrat / alimentation).

Ainsi plusieurs auteurs ont pu remarquer le passage de microorganismes tels que Giardia ou *Cryptosporidium* au travers de systèmes pilotes d'ultrafiltration ou de microfiltration tangentielle lors de problèmes d'étanchéité (Adham *et al.*, 1995) ou de rupture de fibre constituant la membrane (Jacangelo *et al.*, 1991) .

Il faut remarquer ici que cette hypothèse n'a pu être testée puisque aucun test d'intégrité de la membrane ou d'étanchéité du système n'a pu être réalisé en l'absence de valeurs de référence disponibles (problème fournisseur) pour la réalisation du test de point de bulle. (Le calibrage de

la porosité de la membrane à l'aide de billes de latex n'a pu également être réalisé, du fait de la destruction de la membrane (colmatage irréversible) après réalisation de ce test).

Néanmoins cette troisième hypothèse reste la plus probable, car d'après les résultats rapportés sur la figure N°68, il apparaît que les filtrats prélevés en fin de cycle de filtration présentent des concentrations plus élevées en oocystes que dans les filtrats prélevés en début de cycle. Une fuite éventuelle dans le système pourrait expliquer ce phénomène, en effet la probabilité de passage des oocystes serait normalement accrue en fin de cycle dans ce cas puisque la concentration en oocystes dans le fluide alimentant le système membranaire est beaucoup plus importante en fin de cycle du fait de la recirculation du concentrat.

Il faut également souligner que la dernière série de filtration réalisée sans contamination artificielle et donc avec des concentrations en oocystes de départ en eau brute très faibles, a permis de mettre également en évidence le passage des oocystes au travers du système, ce qui conforte encore l'hypothèse d'une fuite dans le système puisque même avec une très faible quantité d'oocystes potentiellement présente à la surface de la membrane, ce qui réduit les chances théoriques de passage des oocystes grâce à leur déformabilité potentielle, ceux ci sont capables de la franchir. La seconde information apportée par l'examen des prélèvements réalisé sur la troisième série d'essai est la détection d'oocystes dans les prélèvements de concentrats à des concentrations identiques à celle rapportée pour le perméat et donc moins importantes que celles initialement prévues, ce qui témoigne d'une éventuelle adhésion des oocystes au niveau de certains éléments du système. Ainsi selon les caractéristiques des oocystes décrites précédemment, ces phénomènes d'adhésion seraient plus probablement constatés au niveau des raccords de tuyaux en PVC ou de la cuve en polyéthylène. En effet ces deux types d'éléments sont constitués de matériaux hydrophobes ce qui peut engendrer des phénomènes d'adhésion par liaison hydrophobe avec les oocystes, pour lesquels une certaine hydrophobicité de surface a été détectée.

Plus globalement à partir des concentrations en oocystes déterminées dans les filtrats au cours des différents cycles, l'abattement de *Cryptosporidium* au cours du process de microfiltration a pu être déterminé (Tableau N°41).

Globalement une élimination supérieure à 99.995% des oocystes est obtenue après filtration au cours des séries d'essais réalisées en contamination artificielle, ce qui représente un abattement moyen supérieur à 4.8 Log, ce qui correspond aux résultats obtenus par Adham *et al.*, 1995 sur des systèmes identiques pour des concentrations en eau brute de départ variant de 10^4 à 10^5 oocystes / L.

Ce type de procédé permettrait d'égaler les performances obtenues selon Schuler *et al.*, 1991 et Timms *et al.*, 1995, de 99.99 à 99.997% d'élimination des oocystes pour les procédés de filtration lente sur sable.

Les plus faibles rendements d'élimination obtenus pour la troisième série d'essai sont à mettre en relation avec les problèmes présumés d'étanchéité ou de défaillance du système membranaire testé.

Tableau N°41: Elimination en pourcentage et abattement en log des oocystes au cours du process de microfiltration.

			Pourcentage d'élimination des oocystes dans le filtrat par rapport à l'eau brute (%)	Abattement obtenu par filtration en log
Série 1 en contamination artificielle	Filtration N°1	D	99.999	4.8
		F	99.995	4.3
	Filtration N°2	D	99.999	5.2
		F	99.995	4.3
	Filtration N°3	D	99.999	5.2
		F	99.996	4.4
Série 2 contamination artificielle + lavage	Filtration N°4	D	99.998	4.7
		F	99.995	4.3
	Filtration N°7	D	99.999	5.2
		F	99.999	4.9
	Filtration N°8	D	>99.9997	>5.5
		F	99.9997	5.5
Série 3 sans contamination artificielle	Filtration N°5	F	>98.8	>1.9
	Filtration N°6	F	76.97	1
	Filtration N°9	F	97.1	>1.5

D : prélèvement filtrat réalisé en début cycle filtration ; F : prélèvement en fin de cycle

E.III.3.2.- Etude de la viabilité des oocystes au niveau des rejets de concentrat du pilote :

Des tests de viabilité, par étude de l'inclusion/exclusion de colorants fluorogéniques, ont été réalisés sur les oocystes provenant des concentrats obtenus à partir des 2 premières séries de filtration.

Afin d'évaluer l'impact du traitement par microfiltration seule (série 1) ou combiné au traitement des concentrats par les solutions de lavage (série 2), les tests réalisés pour chaque concentrat ont été couplés à un test de viabilité réalisé sur deux suspensions témoins contenant des oocystes non traités. Ces deux suspensions témoins sont constituées d'une part par une suspension d'oocystes purifiés à partir de selles de veaux grâce au protocole de base défini chapitre A (témoin A) et correspondant à la suspension d'oocystes ayant servi pour inoculer l'eau brute lors des essais de filtration, et d'autre part par une suspension d'oocystes ayant subi une double purification (témoin B) afin de rassembler les conditions auxquelles ont été soumis les oocystes en dehors du process de filtration (voir chapitre Matériels et Méthodes § V.3.2.2.).

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau N°42.

Tableau N°42 : Pourcentage de viabilité des oocystes détectés dans les différents concentrats et dans les deux suspensions témoins A et B.

		Pourcentage d'oocystes viables (%)		
	Traitement des rejets par solution de lavage	Témoin A	Témoin B	Concentrat
Filtration 1	non	47	36	34
Filtration 2	non	47	36	32
Filtration 3	non	59	46	49
Filtration 4	oui	59	46	22
Filtration 7	oui	59	46	22
Filtration 8	oui	59	46	17

Les résultats rapportés dans le tableau 42 ont été comparés par analyse de variance sur les rangs puis les échantillons ont été comparés deux à deux par test PSLD de Fischer.

Il apparaît au seuil de 5 % (p.c.=0.001 par ANOVA) que les résultats des tests de viabilité obtenus pour le témoin A, le Témoin B et les deux séries de filtration sont significativement différents.

Une différence significative a pu être mise en évidence notamment entre les résultats obtenus pour le témoin A et le témoin B, ce qui démontre une influence du double traitement de purification et donc des réactifs utilisés lors de ce protocole sur la viabilité des oocystes.

Par contre si aucune différence significative au seuil de 5 % n'a pu être démontrée entre le témoin B et les résultats obtenus pour les concentrats non traités par les solutions de lavage, laissant présager que le process de microfiltration lui même n'a pas d'impact sur la viabilité des oocystes concentrés, les résultats de la deuxième série d'essai témoignent d'une différence significative avec le témoin. Le traitement des concentrats avant rejet successivement par les solutions basiques et acides utilisées au cours des procédés de décolmatage des filtres permettrait donc un abattement significatif (>50% en moyenne par rapport au témoin B), même s'il n'est pas complet, de la viabilité et donc du potentiel infectieux des oocystes relargués dans l'environnement. Le traitement des rejets par ce système permettrait de limiter les risques toujours éventuels de contamination ultérieure , compte tenu du fait que les concentrats habituellement rejetés en rivière sans traitement ou réinsufflés dans le cycle en alimentation sont très chargés en oocystes donc représentent une source potentielle de contamination.

Conclusion

CONCLUSION

Face aux épidémies croissantes de cryptosporidioses d'origine hydrique relevées ces dernières années, mais également face à l'incapacité des systèmes de potabilisation classiques pour prévenir ce risque, l'élimination de *Cryptosporidium* dans les eaux ainsi que l'évaluation et la mise en oeuvre de nouvelles filières de traitement incluant des systèmes tels que la microfiltration tangentielle semblent aujourd'hui indispensables.

Les systèmes de microfiltration tangentielle connaissent un essor important dans le domaine du traitement des eaux depuis quelques années. L'intérêt pour ces techniques réside notamment dans leur aptitude à clarifier et à décontaminer l'eau en une seule étape. Dans ce cadre, notre travail a permis d'évaluer l'efficacité de tels systèmes pour l'élimination de *Cryptosporidium* dans l'eau grâce à l'étude d'un système pilote en laboratoire.

La réalisation de cette étude s'est déroulée en 5 grandes parties :

➢ La première partie du travail a permis de définir une méthode de purification des oocystes permettant d'une part d'obtenir de bons rendements de récupération, et ainsi pouvoir être appliquée lors de la détection de *Cryptosporidium* dans des échantillons environnementaux très peu chargés en oocystes, et d'autre part permettant d'allier à ces rendements un haut degré de pureté des suspensions en fin d'expérimentation afin de pouvoir accéder à des renseignements spécifiques sur les caractères intrinsèques du parasite.

Le protocole plébiscité, parmi les différentes méthodes testées, pour la clarification des échantillons d'eaux après concentration, inclut une séparation sur formol - éthyl acétate suivie d'une flottation sur chlorure de sodium. Il permet d'obtenir des rendements moyens de récupération des oocystes de 36 % .Ce protocole de purification pourra également être envisagé notamment pour la préparation de suspensions d'oocystes semi-purifiées nécessaires lors de la confection d'inoculum pour les contaminations artificielles d'échantillon.

Par contre, si une séparation sur FEA couplée à une étape de flottation sur NaCl permet de récupérer les plus grandes quantité d'oocystes à partir d'échantillons de selles contaminées naturellement , elle ne garantit pas un degré de purification suffisant pour pouvoir envisager d'étudier les caractéristiques intrinsèques du parasite isolé.

L'utilisation d'un protocole de purification en trois phases, incluant une séparation finale sur gradient de saccharose, permet par contre d'allier un degré de purification des suspensions très intéressant et le regroupement d'une quantité d'oocystes encore assez élevée avec la concentration de 4 10^8 oocystes en moyenne par litre de selles soumis à purification. Aucune

différence significative n'a pu être mise en évidence entre les résultats obtenus pour l'emploi d'un gradient de saccharose simple ou d'un gradient de saccharose-phénol. Dans ces conditions, le gradient de saccharose a été choisi en raison de sa simplicité de réalisation.

➢ La seconde partie de l'étude a permis de définir les caractéristiques de surface des oocystes. La détermination de l'hydrophobicité et de la charge de surface (potentiel Zéta) du parasite ont permis d'appréhender les phénomènes d'adhésion des oocystes aux particules en suspension ou aux surfaces filtrantes qui interviennent notamment au cours des procédés de microfiltration mais également au cours des procédés de floculation employés pour la concentration de *Cryptosporidium* à partir d'échantillons d'eaux.

D'un point de vue méthodologique, si la technique microélectrophorétique mise en oeuvre pour la détermination du potentiel Zéta d'une particule colloïdale est bien définie, en revanche, un éventail assez vaste de méthodes est proposé pour l'évaluation de l'hydrophobicité des cellules microbiennes. Ce travail a donc permis dans un premier temps de qualifier une méthode adaptée pour la détermination de l'hydrophobicité de *Cryptosporidium*. Une adaptation du test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures (Rosenberg *et al.*, 1980) a permis d'évaluer l'hydrophobicité de surface de *Cryptosporidium* grâce à la détermination du pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane par dénombrement systématique des oocystes dans la phase aqueuse.

Dans un deuxième temps l'impact de certains facteurs environnementaux comme le pH ou la force ionique sur les propriétés de surface du parasite, a été déterminé.

Globalement les oocystes ont démontré un faible taux d'adhésion à l'octane (seulement 20% en moyenne), laissant suggérer que *Cryptosporidium spp* n'était pas caractérisé par des propriétés hydrophobes très marquées.

Un potentiel zéta de -25 mV à pH 6 - 6.5 a été déterminé pour des oocystes en suspension dans de l'eau désionisée.

Des mesures de potentiel zéta et d'hydrophobicité ont été réalisées en fonction du pH et de la force ionique ou de la conductivité du milieu. Une hydrophobicité maximum a été rapportée pour les valeurs extrêmes de pH, avec 40% d'adhésion à l'octane. Il a ainsi été démontré que la force ionique (estimée par la conductivité du milieu) pouvait influencer les propriétés hydrophobes du parasite.

Les oocystes ont également été caractérisés par une charge de surface pH-dépendante, avec un potentiel zéta variant de 0 à pH 2.5 jusqu'à des valeurs négatives extrêmes de -35 mV pour des pH basiques. Par contre l'évolution de la charge de surface de *Cryptosporidium* en fonction de la conductivité du milieu est très faible.

La connaissance des propriétés hydrophobes et de la charge de surface du parasite a permis d'obtenir des informations très importantes, qui interviendront notamment au niveau du choix des traitements de floculation employés pour la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau

mais également dans le choix des membranes de filtration et des agents nettoyants utilisés au cours de l'étude sur pilote de microfiltration.

➢ Les troisième et quatrième parties de l'étude ont été consacrées à la définition d'un protocole d'évaluation de la viabilité des oocystes et à la qualification d'une méthode de détection des oocystes dans l'eau.

❒ Parmi les deux techniques d'évaluation de la viabilité testées, seule la technique par inclusion / exclusion de DAPI et PI mise au point par Campbell *et al.*, 1992, a permis d'obtenir de bons résultats grâce à la coloration spécifique des oocystes viables et non viables sur la base de leur intégrité structurale.

Par contre, au cours de tous les essais réalisés visant à obtenir un développement de *Cryptosporidium* sur culture cellulaire, aucun résultat n'a pu permettre d'affirmer l'obtention d'un cycle de développement complet des oocystes sur cellules $CACO_2$. Dans tous les cas le développement de *Cryptosporidium* sur culture cellulaire ne semble pas très adapté dans les conditions actuelles de réalisation, à la mise en évidence du pouvoir infectieux de faibles quantités d'oocystes, comme celles décelées dans des échantillons environnementaux (au cours des expériences réalisées ici et plus généralement dans la bibliographie des quantités d'oocystes ou de sporozoïtes aussi élevées que 10^5 à 10^6 sont utilisées pour inoculer les cellules). Globalement, les difficultés rencontrées au cours de ce travail pour la mise en culture de la lignée cellulaire $CACO_2$, en plus de la lourdeur des protocoles utilisés, incite à envisager et à recommander en l'état actuel des connaissances d'autres techniques moins astreignantes et plus performantes pour la mise en évidence de la viabilité des oocystes.

La technique d'évaluation de la viabilité par inclusion/exclusion de DAPI et PI a donc été choisie notamment pour déterminer l'impact des techniques de concentration sur la viabilité des oocystes détectés à partir d'échantillons d'eaux mais également pour évaluer le potentiel infectieux des rejets des systèmes de microfiltration.

❒ Une étude sur les méthodes de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau a ensuite été réalisée. Les différents protocoles testés incluaient tous un procédé de concentration des oocystes par floculation. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis de fixer les conditions opératoires optimales pour obtenir une méthode de détection performante des oocystes dans des échantillons d'eaux contaminés et ceci pour des volumes pouvant aller jusqu'à 20 litres.

Parmi les différents protocoles testés, les protocoles employant respectivement le sulfate d'aluminium 1mM à pH 6 pendant une nuit sur 20L d'échantillon ou $CaCl_2$ 1M et $NaHCO_3$ 1M à pH 10 pour une sédimentation de 1nuit, ont permis d'obtenir les meilleurs rendements avec respectivement 60 et 62% de récupération des oocystes. Le protocole utilisant une floculation à l'hydroxyde d'aluminium sera pourtant préféré car il ne modifie pas la viabilité des oocystes détectés contrairement au protocole de floculation au carbonate de calcium.

Ces deux procédés de floculation diffèrent d'une part en raison de la constitution chimique de leur floc mais également par le pH auquel ils sont réalisés. Mais si un pH de 10, employé pour la formation du floc de carbonate de calcium, doit favoriser l'adhésion au floc des oocystes, dont la charge négative est exacerbée à ce pH (voir chapitre B), il n'en demeure pas moins qu'à un pH de 6 la charge de surface des oocystes voisines de - 25 mV suffit encore largement à participer aux interactions avec le floc d'hydroxyde d'aluminium, ce qui se ressent dans les performances obtenues ici pour les deux modes de floculation. Par contre une exposition à un pH de 10 pendant une nuit contrairement à un pH de 6 conduit à la détérioration de la structure des oocystes qui sont sensibles à l'exposition prolongée à des valeurs extrêmes de pH. La diminution significative de la viabilité des oocystes dans les concentrats obtenus à partir du protocole de floculation au carbonate de calcium s'expliquerait donc par ce phénomène. Par contre il ne semblerait pas que cette augmentation très forte de pH endommagerait la structure antigénique de surface du parasite puisque les rendements de récupération ne sont pas modifiés.

Le protocole de floculation à l'hydroxyde d'aluminium a donc été utilisé pour la suite de l'étude et notamment afin de détecter les oocystes de *Cryptosporidium* en sortie filtrat du pilote de microfiltration mais également en sortie rétentat et notamment dans les concentrats traités par les eaux de lavages pour lesquels la viabilité des oocystes a été examinée.

➢ La dernière partie de l'étude a enfin permis de tester les performances du système pilote de microfiltration tangentielle sur l'élimination de *Cryptosporidium*.

Le système qui a été choisi est un procédé utilisant la microfiltration tangentielle sur membrane céramique tubulaire (oxyde d'aluminium) caractérisée par une porosité de 0.2µm. Le choix du type de système a été réalisé selon tout d'abord les caractéristiques des installations utilisées actuellement dans l'industrie de l'eau (CGE, Lyonnaise des Eaux) et selon les matériaux mis à disposition par les entreprises commercialisant les systèmes de microfiltration pour laboratoire. Les membranes céramiques tubulaires ont été plébiscitées également du fait de leur propriété hydrophile, de leur non biodégradabilité ainsi que d'une grande compatibilité chimique (notamment avec les solutions acides et basiques utilisées au cours des lavages) et également sa durée de vie importante. Il faut ici préciser que le choix d'une membrane hydrophile céramique chargée négativement se justifie donc notamment par sa potentialité à limiter les interactions avec les particules organiques en suspension dans l'eau et notamment les oocystes qui de par leur charge négative et la présence d'un certain caractère hydrophobe à leur surface offre un potentiel d'adhésion à de telle membrane assez restreint.

❒ Une étude systématique a tout d'abord été réalisée à partir d'échantillons d'eau de réseau non contaminés ; elle a permis d'établir les conditions optimales de fonctionnement en terme d'hydraulique du système. Il est ainsi apparu que si aucune limitation due à la viscosité ou

au pouvoir colmatant du fluide traité n'a pu être déterminée, la pression transmembranaire ainsi que le débit de recirculation ont été fixés à des valeurs assez restreintes (PTM=1bar, ΔP=0.7bar) afin de limiter l'élévation de température au niveau du système qui pourrait notamment influer sur l'étude de la viabilité des oocystes au cours du process, mais également afin de limiter la consommation énergétique du système. Il faut également remarquer que les paramètres hydrauliques représentés par la PTM et la ΔP fixés ici sont en corrélation avec les valeurs conseillées et utilisées habituellement sur les systèmes industriels de traitement et au cours des travaux réalisés sur pilote en filtration tangentiel rapportés dans la bibliographie. Ces faibles valeurs de PTM permettent ainsi selon différents auteurs (Salvat et Leborgne, 1990; Lahoussine - Turcaud *et al.*, 1991) de limiter le colmatage en profondeur des membranes au cours du fonctionnement du pilote en continu tandis que les valeurs de ΔP choisies représentent un juste compromis entre les valeurs élevées permettant d'assurer un bon curage du système au niveau des canaux de circulation et les faibles valeurs auxquelles correspondent de faibles coûts énergétiques.

Le procédé de nettoyage du système qui a été plébiscité ici est caractérisé quant à lui par une séquence de décolmatage à la soude 2% et à l'acide nitrique 2%. Ces valeurs de pH extrêmes utilisées lors des séquences de lavages permettent notamment de pallier à tout phénomène d'adhésion des oocystes aux surfaces filtrantes puisque lors de la première phase de nettoyage à pH très basique les oocystes développent une charge de surface très négative (-35 mV à pH 12) entraînant l'augmentation des forces de répulsion vis-à-vis de la membrane et au cours de la deuxième phase le potentiel de surface des oocystes est neutralisé limitant toutes interactions électrostatiques éventuelles.

❒ Après avoir fixé ces différents paramètres de fonctionnement, les performances du système, pour le traitement d'eaux de rivière contaminées par *Cryptosporidium*, ont été évaluées en terme d'abattement des oocystes dans l'eau filtrée mais également au niveau des caractéristiques physico-chimiques obtenues en sortie du système.

Il est tout d'abord apparu que le système permettait d'obtenir une eau filtrée caractérisée par de très faibles turbidités, en moyennes 0.25 NTU, ainsi que des très faibles teneurs en matières en suspension, en moyenne 0.18 mg/l. Par contre un abattement uniquement de 17% en moyenne du COT a été obtenu, ce qui témoigne du fait que le système de filtration employé n'est pas très performant notamment pour l'élimination des fractions solubles dans les échantillons testés. Une alternative à ce problème pourrait résider dans l'utilisation de charbon actif en poudre couplé à la microfiltration comme le suggèrent Anselme *et al.*, 1992. Ce procédé pourrait en effet représenter un intérêt notamment pour éliminer les matières organiques dissoutes de faible masse moléculaire non retenues par les membranes mais également pour limiter la fréquence des régénérations du système grâce à l'adsorption des composés organiques

responsables du colmatage irréversible et de l'augmentation de la porosité du gâteau de colmatage.

En ce qui concerne la rétention des oocystes de *Cryptosporidium* par le système de microfiltration testé, une élimination supérieure à 99.995% des oocystes est obtenue après filtration au cours des séries d'essais réalisées en contamination artificielle, ce qui représente un abattement moyen supérieur à 4.8 Log, et ce qui correspond aux résultats obtenus par Adham *et al.*, 1995 sur des systèmes identiques pour des concentrations en eau brute de départ variant de 10^4 à 10^5 oocystes / L.

Ce type de procédé permettrait donc d'égaler les performances obtenues selon Schuler *et al.*, 1991 et Timms *et al.*, 1993, de 99.99 à 99.997% d'élimination des oocystes pour les procédés de filtration lente sur sable.

La détection de la présence d'oocystes dans tous les échantillons filtrés a par contre laissé suggérer l'hypothèse d'un problème d'étanchéité ou de défaillance du système membranaire utilisé, la seconde hypothèse envisagée étant le passage des oocystes au travers des pores de la membrane de par la déformabilité importante présumée du parasite. Malheureusement nous n'avons pu trancher entre ces deux hypothèses, aucun test d'intégrité de la membrane ou d'étanchéité du système n'ayant pu être réalisé en l'absence de valeurs de référence disponibles (problème fournisseur) pour la réalisation du test de point de bulle.

Pour terminer ce travail, l'évaluation du potentiel infectieux des rejets du système a été réalisée par étude de l'inclusion/exclusion de colorants fluorogéniques sur les oocystes isolés à partir des concentrats récupérés en sortie perméat du système qui ont été traités ou non par les solutions de lavage.

Il s'est ainsi avéré d'après les résultats obtenus que le système de microfiltration n'avait aucun impact en lui-même sur la viabilité des oocystes concentrés mais que le traitement des rejets par les solutions de lavage pouvait par contre offrir une opportunité dans ce domaine puisqu'un abattement moyen de 50% de la viabilité avait été décelé dans ce cas. Le traitement des rejets par ce système permettrait donc de diminuer le potentiel infectieux des oocystes relargués dans l'environnement et ainsi de limiter les risques toujours éventuels de contamination ultérieure , compte tenu du fait que les concentrats habituellement rejetés en rivière sans traitement ou réinsufflés dans le cycle en alimentation sont très chargés en oocystes et donc représentent une source potentielle de contamination.

Globalement les résultats obtenus au cours de cette étude laissent présager d'une efficacité très importante des systèmes de microfiltration pour l'élimination de *Cryptosporidium*, mais il faut signaler que des travaux complémentaires visant tout d'abord à vérifier l'intégrité du système testé seraient nécessaires et de plus une amélioration des performances du procédé pour l'élimination des fractions solubles par addition de charbon actif en poudre en entrée du système pourrait être envisagée.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Adham S.S., Jacangelo J.G., Lainé J.M. et Trussel R.R., 1995**, Removal of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* muris, bacteria et MS2 virus by low pressure membrane processes, p1-10, in Workshop on separation of microorganisms from water and wastewater, IAWQ - IWSA Joint Specialist Group on Particle Separation, Ives K.J. et Bernhardt H. Eds, 30 oct - 1 Nov 1995, Amsterdam, The Nederlands.

- **Aij T., Flanigan T., Marshall R., Kaetzel C. and Aikawa M., 1991**, Ultrastructural study of asexual development of *Cryptosporidium parvum* in a Human Intestinal cell line, J. Protozool., 38(6), s82-84.

- **Anderson B.C., 1982**, Cryptosporidiosis in Idaho lambs : natural and experimental infections, J. Am. Vet. Med. Ass., 181, 151-153.

- **Anderson B.C., 1985**, Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp., Am. J. Public Health, 75, 1433-1434.

- **Angus K.W., Hutchison G. et Munro H.M.C., 1985**, Infectivity of a strain of *Cryptosporidium* found in the guinea pig (Cavia Porcellus for guinea pig) mice and lambs, J. Comp. Pathol., 95, 151-165.

- **Anonyme, 1996**, *Cryptosporidium* and enteric disease : a case in point, ASM News, 62 (1), 14.

- **Anselme C., Chevalier M.R., Mazounie P. et Malleviale J., 1992**, Applications industrielles de l'ultrafiltration pour la production d'eau potable. Bilan de fonctionnement des installations. Perspectives d'évolution, TSM - L'Eau, 9, 403-408.

- **Armon R., Greenberg Z. et Shelef C., 1995**, *Giardia Lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in surface waters of Israel, and their clinical prevalence of the period 1923-1991, pp76-79, in Protozoan Parasites and Water, Betts W.B., Casemore D., Fricker C., Smith H. et Watkins J. Eds, The Royal Society of Chemistry Publisher, Cambridge.

- **Audic J.M., Fujita Y. et Faup G.M., 1986**, Le couplage boues activées - membrane : une réalité au Japon, TSM - L'Eau, 6, 297-300.

- **Awad-El-Kariem F.M., Warhurst D.C. et McDonald V., 1994**, Detection and species identification of *Cryptosporidium* oocysts using a system based on PCR and endonuclease restriction, Parasitol., 109, 19-22.

- **Badenoch J., 1990**, *Cryptosporidium* in water supplies, Report of the group of experts, department of environment, department of health, Her Majesty's Statonery Office (HMSO), London.

- **Barer H.R. et Wright A.E., 1990**, A review - *Cryptosporidium* in water, Lett. Appl. Microbiol., 11, 271-278.

- **Baxby D., Blundell N. et Hart C.A., 1984**, The development and performance of a sample sensitive method for the detection of the *Cryptosporidium* oocysts in faeces, J. Hyg., 92, 317-323.

- **Baxby D. et Blundell N., 1988**, Recognition and laboratory characteristics of an atypical oocyst of *Cryptosporidium*, J. Infect. Dis., 158 (5), 1038-1045.

- **Beauvais B., Sarfari C., Derouin F., Garin Y.J.F., Larivière M. et Deletoile P., 1989**, Evaluation comparative de deux méthodes de dépistages des oocystes de *Cryptosporidium* dans les feces humaines, Ann. Biol. Clin., 47, 45-46.

- **Ben Aim R., Liu M.G. et Vigneswaran S., 1993**, Recent development of membrane processes for water and waste water treatment, Wat. Sci. Tech., 27 (10), 141-149.

- **Bersillon J.L., Anselme C., Malleviale J., Aptel P. et Fiessinger F., 1989**, L'ultrafiltration appliquée au traitement de l'eau potable : le cas d'un petit système, L'Eau, L'Industrie, Les Nuisances, 130, 61-64.

- **Blewett D.A., 1988**, Disinfection and oocysts, in : Cryptosporidiosis, Proc. 1st Int. Workshop, Edinburg 1988, Angus K.W. et Blewett D.A. Eds, 107-115.

- **Blewett D.A., Whright S.E., Casemore D.P., Blooth N.E. et Jones C.E., 1993**, Infective dose size studies on *Cryptosporidium parvum* using gnotobiotic lambs, Wat. Sci. Tech., 27, (3-4), 61-64.

- **Bonnin A. et Camerlynck P., 1989**, Cryptosporidiose humaine, Aspects épidémiologiques et cliniques, Med. Mal. Infect., 19, 35-41.

- **Bourée P., 1987**, La cryptosporidiose, Encycl. Med. Chir. (Paris) 7, 1987, 8084 A^{10},.

- **Buraud M., Forget E., Favennec L., Bizet J., Gobert J.G. and Deluol A.M., 1991**, Sexual stage development of *Cryptosporidium* in the CACO-2 Cell line, Infect. Immun., 59(12), 4610-4613.

- **Campbell I., Tzipori S., Hutchison G. et Angus K.W., 1982**, Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts, Vet. Rec., 111, 414-415.

- **Campbell A.T., Robertson L.J. et Smith H.V., 1992**, Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts : correlation of in vitro excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes, Appl. Env. Microb., 58 (11), 3488-3493.

- **Campbell A., Robertson L. et Smith H., 1993**, Novel methodology for the detection of *Cryptosporidium parvum* : a comparison of cooled charge couple devices (CCD) and flow cytometry, Wat. Sci. Tech., 27 (3-4), 89-92.

- **Campbell A.T., Robertson L.J., Smith H.V., Girdwood R.W.A. , 1994**, Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts concentrate by calcium carbonate floculation, J. Appl. Bact., 76, 638-639.

- **Campbell A.T., Robertson L.J., Snowball M.R. et Smith H.V., 1995**, Inactivation of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by ultraviolet irradiation, Wat. Res., 29 (11), 2583-2586.
- **Carrington E.G. et Smith H.V., 1995**, The occurence of *Cryptosporidium* spp. oocysts in surface waters and factors influencing their levels, with particular reference to the United Kingdom, pp57-62, in Protozoan Parasites and Water, Betts W.B., Casemore D., Fricker C., Smith H. et Watkins J. Eds, The Royal Society of Chemistry Publisher, Cambridge.
- **Casemore D.P., 1990**, Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis, Epidem. Infect., 104, 1-28.
- **Casemore D.P., 1995**, The problem with protozoan parasites, p10-18, in Protozoan Parasites and Water, Betts W.B., Casemore D., Fricker C., Smith H. et Watkins J. Eds, The Royal Society of Chemistry Publisher, Cambridge.
- **Casemore D.P., Armstrong M. et Sands R.L., 1985**, Laboratory diagnostic of cryptosporidiosis, J. Clin. Pathol., 38, 1337-1341.
- **Chapman P.A. et Rush B.A., 1990**, Efficiency of sand filtration for removing *Cryptosporidium* oocysts from water, J. Med. Microbiol., 32, 243-245.
- **Chrisp C.E., Reid W.C., Rush H.G., Suckow M.A., Bush A. et Thomann M.J., 1990**, Cryptosporidiosis in guinea pigs : an animal model, Infect. Immun., 58, 674-679.
- **Crabtree K.D., Ruskin R.H., Shaw S.H. et Rose J.B., 1996**, The detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in cistern water in the U.S. Virgin Islands, Wat. Res., 30 (1), 208-216.
- **Current W.L., 1987**, *Cryptosporidium* its biology and potential for environmental transmission, Critic. Rev. Env. Control, 17, 21-51.
- **Current W.L., 1988**, cité par Smith H.V. et Rose J.B., 1990, Waterborne Cryptosporidiosis, p 146-153, in *Cryptosporidium* in Water Supplies, Report of the group of experts, HMSO, London.
- **Current W.L. and Haynes T.B., 1984**, Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture, Science, 224, 603-605.
- **Current W.L. et Reese N.C., 1986**, A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice, J. Protozool., 33 (1), 98-108.
- **Current W.L. et Blackburn B.L., 1990**, In cryptosporidiosis of man and animals, Dubey J.P., Speer C.A. et Fayer R. Eds, Boca Raton, Fla : CRC Press.
- **Current W.L. et Garcia L.S., 1991**, Cryptosporidiosis, Clin. Microbiol. Rev., 4, 325-358.

- **D'Antonio R.G., Winn R.E., Taylor J.P., Justafon T.P., Current W.L., Rhodes M.M., Gary G.W. et Zajac R.A., 1985**, A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts, Ann. Intern. Med., 103, 886-888.
- **Datry A., Danis M. and Gentilini M., 1989**, Developpement complet de *Cryptosporidium* en culture cellulaire : Applications, Med. Sci., 5, 762-766.
- **Dawson D.J., Maddocks M., Roberts J. and Vidler J.S., 1993**, Evaluation of recovery of *Cryptosporidium parvum* oocysts using membrane filtration, Lett. Appl. Microbiol., 17, 276-279.
- **Dawson D.J., Furness M.L., Maddocks M., Roberts J. et Vidler J.S., 1994**, the impact of catchment events on levels of *Cryptosporidium* and *Giardia* in raw waters, Am. Wat. Wks Ass. Seminar, Watershed management and control of infectious organisms, New York, 20 juin 1994.
- **Directives de qualité pour l'eau de boisson, OMS, 1994**, Recommandations volume 1, Aspects Microbiologiques : 2.1. Facteurs importants, p8.
- **DoE / SCA (Department of Environment / Standing Commitee of Analysts), 1990**, Isolation and identification of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts and free living pathogenic amoebae etc., Methods for the Examination of Water and Associated Materials, London / HMSO.
- **Drozd C., Bonville M.C., Lahoussine - Turcaud V. et Schwartzbrod J., 1993**, Methodes de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau : Revue et application au laboratoire, J. Fr. Hydr., 24 (2), 173-190.
- **Dumon H., Herin P., Gilly S., Franck J., Gambarelli F. et Quilici M., 1990**, Diagnostic biologique des parasitoses opportunistes, Feuil. Biol., 31 (173), 27-34.
- **Dupont H., 1990**, cité dans Study shows parasite more dangerous, World Water and Environmental Engineering, juin 1994, 7.
- **Edwards D.D., 1993**, Troubled waters in Milwaukee, ASM News, 59 (7), 342-345.
- **Enriquez V., Rose J.B., Enriquez C.E. et Gerba C.P., 1995**, Occurence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in secondary and tertiary wastewaters effluents, p84-86, in Protozoan Parasites and Water, Betts W.B., Casemore D., Fricker C., Smith H. et Watkins J. Eds, The Royal Society of Chemistry Publisher, Cambridge.
- **Ernest J.A., Blackburn B.L., Lindsey D.L. et Current W.L., 1986**, Infection dynamics of *Cryptosporidium parvum* (apicomplexa : Cryptosporiidae) in neonatal mice (Mus Musculus), J. Parasitol., 72, 796-798.
- **Fayer R., 1994**, Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, Appl. Env. Microbiol., 60 (8), 2732-2735.
- **Fayer R., 1995**, Effect of sodium hypochlorite exposure on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts for neonatal Balb/C mice, Appl. Env. Microbiol., 61 (2), 844-846.

- **Fayer R. et Leek R.G., 1984**, The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature and time on in vitro excystation of *Cryptosporidium*, J. Protozool., 31 (4), 567-569.

- **Fayer R., Perryman C.E. et Riggs M.W., 1985**, Factors contributing to clinical illness in calves experimentally infected with a bovine isolate of *Cryptosporidium*, Proc. Hel. Soc. Wash., 52, 64-70.

- **Fayer R., Guidry A. et Blagburn B.L., 1990**, Immunotherapeutic efficacy of bovine colostral immunoglobulins from a hyperimmunized cow against cryptosporidiosis in neonatal mice, Infect. Immun., 58, 2962-2965.

- **Fichtenbaum C.J., Ritchie D.J. et Powdery W.G., 1993**, Use of paromomycin for treatment of cryptosporidiosis in patients with AIDS, Clin. Infect. Dis., 16, 298-300.

- **Filkorn R., Wiedenmann A. et Botzenhart K., 1994**, Selective detection of viable *Cryptosporidium* oocysts by PCR, Zbl. Hyg., 195, 489-494.

- **Finch G.R., Daniels C.W., Black E.K., Schaefer III F.W. et Belosevic M., 1993(a)**, Dose response of *Cryptosporidium parvum* in outbread neonatal CD_1 mice, Appl. Env. Microbiol., 59 (11), 3661-3665.

- **Finch G.R., Black E.K., Gyurek L. et Belosevic M., 1993(b),** Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity, Appl. Env. Microbiol., 59 (12), 4203-4210.

- **Flanigan T.P., Aji T., Marshall R., Soave R., Aikawa M. and Kaetzel C., 1991**, Asexual development of *Cryptosporidium* within a differentiated human enterocyte cell line, Infect. Immun., 59(1), 234-239.

- **Fogel D., Isaac-Renton J., Guasparini R., Moorehead W. et Ongerth J., 1993**, Removing *Giardia* and *Cryptosporidium* by slow sand filtration, JAWWA, Nov 93, 77-84.

- **Fripp P.J., Bothma M.T. et Crewe-Brown H.H., 1991**, Four years of cryptosporidiosis at GaRankuma hospital, J. Infect., 23, 93-100.

- **Garcia-Rodriguez J.A., Martin-Sanchez A.M., Canutblasco A. et Garcia-Luis E.J., 1990**, The prevalence of *Cryptosporidium* species in children in day care centers and primary schools in Salamanca (Spain) : an epidemiological study, Eur. J. Epidemiol., 6 (4), 432-435.

- **Geller S ., 1983**, Statistique, édit. Masson, Paris, 4ème édition, p. 217.

- **Girdwood R.W.A., 1995**, Some clinical perspectives on waterborne parasitic protozoa, p3-9, in Protozoan Parasites and Water, Betts W.B., Casemore D., Fricker C., Smith H. et Watkins J. Eds, The Royal Society of Chemistry Publisher, Cambridge.

- **Goodwin M.A. et Brown J., 1994**, Incidence of respiratory cryptosporidiosis in Georgia broilers : 1987-92, Avian Dis., 38, 358-360.

- **Gregory J. et Pugh H.J., 1995**, Deposition and adhesion of *Cryptosporidium* oocysts on surfaces, p19-26, in Workshop on separation of microorganisms from water and wastewater, IAWQ - IWSA Joint Specialist Group on Particle Separation, Ives K.J. et Bernhardt H. Eds, 30 oct - 1 Nov 1995, Amsterdam, The Nederlands.

- **Grimason A.M., Smith H.V., Thitou W.N., Smith P.G., Jackson M.H. et Girdwood R.W.A., 1993**, Occurence and removal of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in Kenyan waste stabilisation ponds, Wat. Sci. Tech., 27 (3-4), 97-104.

- **Gut J., Petersen C., Welson R. and Leech J., 1991,** *Cryptosporidium parvum* : in vitro cultivation in Madin-Darby Canine Kidney Cells, J. Protozool., 38, s 72-73.

- **Hall T., Pressdee J., Greogy R. et Murray K., 1995**, *Cryptosporidium* removal during water treatment using dissolved air flotation, Wat. Sci. Tech., 31 (3-4), 125-135.

- **Harp J.A., Chen W. et Harmsen A.G., 1992**, Resistance of severe combined immunodeficient mice to infection with *Cryptosporidium parvum* : the importance of intestinal microflora, Infect. Immun., 60 (9), 3509-3512.

- **Hayes E.B., Matte T.D., O'Brien T.R., McKinley T.W., Logdson G.S., Rose J.B., Ungar B.L.P., et Word D.M., 1989**, Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply, N. Engl. J. Med., 320 (21), 1372-1376.

- **Heine J., 1982**, Eine einfache Nachweis-methode für Kryptosporidien im Kot. Zbl. Vet. Med. B., 29, 324-327.

- **Heine J., Moon H.W., Woodmansee et Pohlenz J.F.L., 1985**, Experimental tracheal and conjonctival infections with *Cryptosporidium* sp. in pigs, Vet. Parasitol., 17, 17-25.

- **Henriksen S.A. et Pohlenz J.F.L., 1981**, Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique, Acta Vet. Scand., 22, 594-596.

- **Hill M.J., James A.M. and Maxted W.R., 1963**, Some physical investigations of the behaviour of bacterial surfaces. X. The occurence of lipids in the streptococcal cell wall, Biochim. Biophys. Acta, 75, 414-424.

- **Hills B.A., 1984**, Surfactant as release agent opposing the adhesion of tumor cells in determining malignancy, Med. Hypotheses, 14, 99-110.

- **Hjerten S., Rosengren J. and Pahlman S., 1974**, Hydrophobic interaction chromatography. The synthesis and the use of some alkyl and aryl derivatives of agarose, J. Chromatogr., 101, 281-288.

- **Hughes J.M., 1993**, Infectious diseases transmitted by drinking water in the United States : perspectives of the Center for Disease Control and Prevention, in "Safety of Water Disinfection : Balancing chemical and microbial risks, Craun F.G. Ed., ILSI Press, Washington D.C..

- **Hunter P.R., 1994**, Drinking - water - associated disease outbreaks, Microbiol. Europe, 2 (6), 8-12.

- **Hutton P., Ashbolt N., Vesey G. et Walker J., 1995**, *Giardia* and *Cryptosporidium* in the aquatic environment of Sydney, Australia, pp71-75, in Protozoan Parasites and Water, Betts W.B., Casemore D., Fricker C., Smith H. et Watkins J. Eds, The Royal Society of Chemistry Publisher, Cambridge.

- **Isaac-Renton J.L., Fogel D., Stibbs H.H. et Ongerth J.E., 1987**, *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water, Lancet, 4, 973-974.

- **Itakura C., Goryo M. et Umemura T., 1984**, Cryptosporidial infection in chickens, Avian Pathol., 13, 487-499.

- **Ives K., 1990**, Part II - Paper VIII : *Cryptosporidium* and water supplies : treatment processes and oocysts removal, p178-182, in *Cryptosporidium* in water supplies, Report of the group of experts, department of environment, department of health, Her Majesty's Statonery Office (HMSO), London.

- **Jacangelo J.G., Lainé J.M., Carns K.E., Cummings E.W. et Malleviale J., 1991**, Low-pressure membrane filtration for removing *Giardia* and microbial indicators, JAWWA, sept 91, 97-106.

- **Jackson A.R.B., 1962**, Excystation of *Eimeria* arlongi (Marotel, 1905); stimuli from the host sheep, Nature (Lond.), 194, 847-849.

- **Janoff E.N. et Reller E.B., 1987**, *Cryptosporidium* species, a protean protozoan, J. Clin. Microbiol., 25 (6), 967-975.

- **Jeffery J., 1991**, *Cryptosporidium* and water supply - a brief review with special reference to the report of the Badenoch Commitee, J. Water SRT - Aqua, 40 (2), 110-115.

- **Joce R.E., Bruce J., Kiely D., Noah N.D., Dempster W.B., Stalker R., Gumsley P., Chapman P.A., Norman P., Watkins J., Smith H.V., Price T.J. et Watts, 1991**, An outbreak of Cryptosporidiosis associated with a swimming pool, Epidem. Infect., 107, 497-508.

- **Johnson D.W., Pieniazek N.J., Griffin D.W., Misener L. et Rose J.B., 1995**, Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water-samples, Appl. Env. Microbiol., 61 (11), 3849-3855.

- **Jokipï A.M.M., Hemila M. et Jokipï L., 1985**, Prospective study of acquisition of *Cryptosporidium*, *Giardia Lamblia*, and gastrointestinal illness, Lancet, 8, 487-489.

- **Joseph C., Hamilton G., O'Connor M., Nicholas S., Marshall R., Stanwell-Smith R., Sims R., Ndawula E., Casemore D., Gallaher P. et Harnett P., 1991**, Cryptosporidiosis in the Isle of Thanet : an outbreak associated with local drinking water, Epidem. Infect., 107, 509-519.

- **Kennedy G.A., Kreitner G.L. et Strafuss A.C., 1977**, Cryptosporidiosis in three pigs, J. Am. Vet. Med. Ass., 170, 348-350.

- **Ketelaars J.S., Medema G., Van Breman L.W.C.A., Van der Kooij D., Nobel P.J. and Nuhn P., 1994**, Occurence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the River Meuse and removal in the Biebosh storage reservoirs (The Netherlands), In Abstract IAWQ 17th Biennal Internationnal Conference, Budapest, 24-30 juin 1994.
- **Kjellberg S., Lagercrantz C. and Larsson T., 1980**, Quantitative analysis of bacterial hydrophobicity studied by the binding of dodecanoïc acid, FEMS Microbiol. Lett., 7, 41-44.
- **Korich D.G., Mead J.R., Madorf M.S., Sinclair N.A. et Sterling C.R., 1990**, Effects of ozone, chlorine, dioxide, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocysts, Appl. Env. Microbiol., 56 (5), 1423-1428.
- **Kwa B.H., Moyad M., Pentella M.A. et Rose J.B., 1993**, A nude mouse model as in vivo infectivity assay for Cryptosporidiosis, Wat. Sci. Tech., 27 (3-4), 65-68.
- **Lahoussine - Turcaud V., Wiesner M.R., Bottero J-Y. et Malleviale J., 1990**, Coagulation pretreatment for ultrafiltration of a surface water, JAWWA, Dec 90, 76-81.
- **Lahoussine-Turcaud V., Jaffres B., Colombel P. et Saulnier A., 1991**, La microfiltration couplée à la floculation : application à la potabilisation des eaux souterraines en terrain karstique, L'Eau, L'Industrie, Les Nuisances, 146, 30-33.
- **Langlais B., Perrine D., Joret J.C. et Chenu J.P., 1990**, The CT value concept for evaluation of disinfection process efficiency ; particular case of ozonation for inactivation of some protozoan : free living amoeba and *Cryptosporidium*, In New Developments : Ozone in water and wastewater treatment, Proceedings of the international ozone association spring conference, 27-29 Mars 1990, Shreveport, La. International Ozone Association, Pan American Commitee, Norwalk, Conn..
- **Langlais B., Joret J.C., Perrine D., Chenu J.P. et Legardinier J.C., 1991**, Inactivation par l'ozone de *Cryptosporidium*, protozoaire parasite transmissible par l'eau. Essais de laboratoire mettant en oeuvre un modèle biologique, TSM - L'Eau, 4, 197-199.
- **Laxer M.A., Timblin B.K. et Patel R.J.,1991**, DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction, Am. J. Trop. Med. Hyg., 45, 688-694.
- **Le Chevallier M.W., Norton W. et Lee R.G., 1989**, Distribution of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface water, Amer. Wat. Wks. Ass., Water Quality Technology Conference, Nov 89, Philadelphia, cité par Badenoch, 1990, p170.
- **Le Chevallier M.W., Norton W.D. et Lee R.G., 1990**, Evaluation of current treatment pratices for removal of indigenous waterborne parasites, Abstract of the 90th Annual Meeting Program Commitee, 10, 251.
- **Le Chevallier M.W., Norton W.D. et Lee R.G., 1991**, *Giardia* et *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies, Appl. Env. Microbiol., 57 (9), 2617-2621.

- **Le Chevallier M.W. et Norton W.D., 1992**, Examining relationships between particle counts, *Giardia*, *Cryptosporidium*, and turbidity, JAWWA, 84, 54.
- **Leland D., McAnulty J., Keene W. et Stevens G., 1993**, A cryptosporidiosis outbreak in a filtered-water supply, JAWWA, 85 (6), 34-42.
- **Lemeteil D., Roussel F., Favennec L., Ballet J.J. et Brasseur P., 1993**, Assessment of candidate anticryptosporidial agents in an immunosuppressed rat model, J. Infect. Dis., 167, 766-768.
- **Lengerich E.J., Addiss D.G., Marx J.J., Ungar B.L.P. et Juranek D.D., 1993**, Increased exposure to Cryptosporidia among dairy farmers in Wisconsin, J. Infect. Dis., 167, 1252-1255.
- **Levine N.D., 1984**, Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa), J. Protozool., 31 (1), 94-98.
- **Levine N.D., Corliss J.P., Cox F.E. et al, 1980**, A newly revised classification of the protozoa, J. Protozool., 27, 37-58.
- **Lindahl M., Faris A., Wadstrom T. and Hjerten S., 1981**, A new test based on "salting out" to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells, Biochim. Biophys. Acta, 677, 471-476.
- **Lorenzo-Lorenzo M.J., Ares-Mazas M.E., Villacorta-Martinez de Maturana I. et Duran-Oreiro D., 1993**, Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, J. Parasitol., 79 (1), 67-70.
- **Lumb R., Lauser J.A. et O'Donoghe P.J., 1988**, Electrophoretic and immunoblot analysis of *Cryptosporidium* oocysts, Immun. Cell. Biol., 66, 369-376.
- **Madore M.S., Rose J.B., Gerba C.P., Arrowood M.J. et Sterling C.R., 1987**, Occurence of *Cryptosporidium* in sewage effluents and selected surface waters, J. Parasitol., 73, 702-705.
- **Mandra V., Baudin I. et Anselme C., 1995**, Les techniques séparatives par membranes : procédé de disinfection, TSM - L'Eau, 3, 219-227.
- **Mathan M.M., Venkatesan S., George R., Mathew M. et Mathan V.I., 1985**, *Cryptosporidium* and diarrhoea in southern indian children, Lancet, Nov 1985, 1172-1175.
- **McAnulty J.M., Fleming D.W. et Gonzalez A.H., 1994**, A community - wide outbreak of crytosporidiosis associated with swimming at a wave pool, JAMA, 272 (20), 1597-1600.
- **Mc Keenzie W.R., Hoxie N.J., Proetor M.E., Gradus M.S., Blain K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addis D.G., Fox K.R., Rose J.B. et Davis J.P., 1994,** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply, N. Engl. J. Med., 331 (3), 161-167.

- **Mead J.R., Arrowood M.J., Current W.L. et Sterling C.R., 1988**, Field inversion gel electrophoretic separation of *Cryptosporidium* spp. chromosome-sized DNA, J. Parasitol., 74, 366-369.

- **Millard P.S., Gensheimer K.F., Addiss D.G., Sosin D.M., Beckett G.A., Houck-Jankoski A. et Hudson A., 1994**, An outbreak of cryptosporidiosis from fresh - pressed apple cider, JAMA, 272 (20), 1592-1596.

- **Miller R.A., Brondson M.A. et Morton W.R., 1990**, Experimental cryptosporidiosis in a primate model, J. Infect. Dis., 161, 312-315.

- **Miller D.G. and Carrington E.G., 1991**, *Cryptosporidium* in drinking water - Survey of occurence, Report FR 0226 - Matlow, Bucks : Foundation for Water Research.

- **Miller D.G. et Carrington E.G., 1992**, A survey of *Cryptosporidium* oocysts in surface and groundwaters in the UK, by the National *Cryptosporidium* Survey Group, J. Instit. Wat. Env. Manag., 6 (6), 697-703.

- **Montiel A. et Welte B., 1992**, La desinfection, Rapport interne SAGEP.

- **Moon H.V. et Bemrick W.J., 1981**, Fecal transmission of calf cryptosporidia between calves and pigs, Vet. Pathol., 18, 248-255.

- **Moore A.C., Herwaldt B.L., Craun G.F., Calderon R.L., Highsmith A.K. et Juranek D.D., 1994**, Waterborne disease in the United States, 1991 and 1992, JAWWA, 86 (2), 87-99.

- **Mtambo M.M.A., Nash A.S., Blewett D.A. et Whright S., 1992**, Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens, Vet. Parasitol., 45, 49-57.

- **Murdoch D.A., Bloss D.E. et Glover S.C., 1993**, Successful treatment of cryptosporidiosis in an AIDS patient with letrazuril, AIDS, 7 (9), 1279-1280.

- **Musial C.E., Arrowood M.J., Sterling C.R. and Gerba C.P., 1987**, Detection of *Cryptosporidium* in water by using polypropylene cartridge filters, Appl. Env. Microbiol., 53, (4), 687-692.

- **Naciri M., Yvoré P. et Levieux D., 1984**, Cryptosporidiose du chevreau. Influence de la prise du colostrum. Essais de traitements. In : Colloque International sur les maladies de la chèvre, INRA, Niort, France, 9-11 oct, 465-471.

- **Naciri M., Mancassola R., Répérant J.M. and Yvoré P., 1994**, Analysis of humoral immune response in chickens after inoculation with *Cryptosporidium baileyi* or *Cryptosporidium parvum*, Avian Dis., 38, 332-338.

- **Newman R.O., Wuhib T., Lima A.A.M., Guerrant R.L. and Sears C.L., 1993(a)**, Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in Northeastern Brazil, Am. J. Trop. Med. Hyg., 49 (2), 270-275.

- **Newman R.D., Jaeger K.L., Wuhib T., Lima A.A.M., Guerrant R.L. et Sears C.L., 1993(b)**, Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts, J. Clin. Microbiol., 31 (8), 2080-2084.
- **Nichols G. et Thom B.T., 1985**, Food poisoning caused by *Cryptosporidium* : a load of tripe, p3, in Communicable Disease Surveillance Center, London, vol 17.
- **Nichols G.L., Mc Lauchlin J. et Dhanraj S., 1991**, A technique for typing *Cryptosporidium* isolates, J. Protozool., 38 (6), s237-239.
- **Nime F.A., Burek J.D., Page D.L., Holsher M.A. et Yardley J.H., 1976**, Acute in enterocolis in a human bury infected with the protozoan *Cryptosporidium*, Gastroenterology, 70, 592-598.
- **Nina J.M.S., McDonald V., Dyson D.A., Catchpole J., Uni S., Iseki M., Chiodini P.L. et McAdam K.P.W.J., 1992 (a)**, Analysis of oocysts wall and sporozoïte antigens from three *Cryptosporidium* species, Infect. Immun., 60 (4), 1509-1513.
- **Nina J.M.S., Mc Donald V., Deer R.M.A., Whright S.E., Dyson D.A., Chiodini P.L. et Mc Adam K.P.W.J., 1992 (b)**, Comparative study of the antigenic composition of oocysts isolates of *Cryptosporidium parvum* from different hosts, Parasit. Immun., 14 (2), 227-232.
- **Nyberg P.A. et Hammond D.M., 1964**, Excystation of *Eimeria* bovis and other species of bovine coccidia, J. Protozool., 11, 474-480.
- **Ongerth J.E., 1989**, In F.G. Craun et Sykora J.L. Eds, The taxonomy, detection, epidemiology and waterborne control of *Cryptosporidium*, Recommandations of a workshop held on January 10-11, 1989.
- **Ongerth J.E. and Stibbs H.H., 1987**, Identification of *Cryptosporidium* in river water, Appl. Env. Microbiol., 53, (4), 672-676.
- **Ortega-Mora L.M., Troncoso J.M., Rojo-Vazquez F.A. et Gomez-Bautista M., 1992**, Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts, Infect. Immun., 60 (8), 3442-3445.
- **Ouchi K. and Akiyama H., 1971**, Non foaming mutants of sake yeasts : Selection by cell agglutination method and by froth flotation method, Agric. Biol. Chem., 7, 1024-1032.
- **Parker J.F.W., Greaves G.F. et Smith H.V., 1993**, The effect of ozone on the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts and a comparison of experimental methods, Wat. Sci. Tech., 27 (3-4), 93-96.
- **Parker J.F.W. et Smith H.V., 1993**, Destruction of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by sand and chlorine, Wat. Res., 27 (4), 729-731.
- **Parker J.F.W., Smith H.V. et Girdwood R.W.A., 1994**, Survey of Loch Lommond to assess the occurence and prevalence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and their likely impact on human health, Report N° FR0409, Foundation for Water Research, Marlow, Bucks.

- **Peeters J.E., Charlier G.J. et Dussart P., 1986**, Pouvoir pathogène de *Cryptosporidium* sp. chez les lapereaux avant et après sevrage, Proc. 4ème Journées de la recherche cunicole, Paris, 10-11 Dec., Comm. N°37.

- **Peeters J.E., Mazas E.A., Masschelein W.J., Villacorta-Martinez de Maturana I. et Debacker E., 1989**, Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts, Appl. Env. Microbiol., 55 (6), 1519-1522.

- **Perrine D., Georges P. et Langlais B., 1990**, Efficacité de l'ozonation des eaux sur l'inactivation des oocysts de *Cryptosporidium*, Bull. Acad. Natl. Med., 174, 845-850.

- **Perryman L.E., Riggs M.W., Mason P.H. et Fayer R., 1990**, Kinetics of *Cryptosporidium parvum* sporozoïte neutralization by monoclonal antibodies immune bovine serum and immune colostrum, Infect. Immun., 58, 257-259.

- **Petersen C., 1993**, Cellular biology of *Cryptosporidium parvum*, Parasitol. Today, 9 (3), 87-91.

- **Pouet M.F., Grasmick A., Homer F., Nauleau F. et Cornier J.C., 1994**, Tertiary treatment of urban wastewater by cross flow microfiltration, Wat. Sci. Tech., 30 (4), 133-139.

- **Pozio E., Angeles Gomez Morales M., Mancini Barbieri F. et La Rosa G., 1992**, *Cryptosporidium* : different behaviour in calves of isolates of human origin, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 86, 636-638.

- **Public Health Laboratory Service Study Group, 1990**, Cryptosporidiosis in England and Wales : Prevalence and clinical and epidemiological features, B.M.J., 300, 774-777.

- **Rakusan T.A., Juneja H.J. et Fleischmann W.R., 1989**, Spiramycin is not effective in treating *Cryptosporidium* diarrhea in Infants : Results of a double-blind randomized trial, J. Infect. Dis., 159 (1), 131.

- **Ransome M.E., Whitmore T.N. et Carrington E.G., 1993**, Effect of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum*, Wat. Suppl., 11, 75-89.

- **Rasmussen K.R. et Healey M.C., 1992**, Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice, Infect. Immun., 60 (4), 1648-1652.

- **Rasmussen K.R., Martin E.G. et Healey M.C., 1993**, Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*, J. Parasitol., 79 (3), 364-370.

- **Reducker D.W., Speer C.A. et Blixt J.A., 1985 (a)**, Ultrastructural changes in the oocysts wall during excystation of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa, Eucoccidiorida), Can. J. Zool., 63 (8), 1892-1896.

- **Reducker D.W., Speer C.A. and Blixt J.A., 1985(b)**, Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoïtes as revealed by high resolution scanning electron microscopy, J. Protozool., 32(4), 708-711.

- **Reed G.B. et Rice C.E., 1931**, The behaviour of acid-fast bacteria in oil and water systems, J. Bacteriol., 22, 239-.

- **Reuvewy S., Mizhrahi A., Kotler M. and Freeman A., 1983**, Factors effecting cell attachment, spreading and growth on derivatized microcarriers. II. Introduction of hydrophobic elements, Biotechnol. Bioeng., 25, 2969-2980.

- **Richardson A.J., Frankenberg R.A., Buck A.C., Selkon J.B., Colbourne J.S., Parsons J.W. et Mayon-White R.T., 1991**, An outbreak of waterborne cryptosporidiosis in Swindon and Oxfordshire, Epidemiol. Infect., 107, 485-495.

- **Ritchie L.S., 1948**, An ether sedimentation technique for routine stool examination, Bull. US Army Med. Dept., 8, 326-.

- **Roach P.D., Olsen M.E., Whitley G. et Wallis P.M., 1993**, Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada, Appl. Env. Microbiol., 59, 67-73.

- **Robert B., Ginter A., Antoine H., Collard A. et Coppe P., 1990**, Diagnosis of bovine cryptosporidiosis by an enzyme-linked immunosorbent assay, Vet. Parasitol., 37, 1-8.

- **Robertson L.J., Campbell A.T. et Smith H.V., 1992**, Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures, Appl. Env. Microbiol., 58 (11), 3494-3500.

- **Robertson L.J. et Smith H.V., 1992**, *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Part I : Current perspective and present technologies, Europ. Microbiol., Nov/Dec 1992, 20-29.

- **Robertson L.J., Campbell A.T. and Smith H.V., 1993**, In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*, Parasitol., 106, 13-19.

- **Robertson L.J., Smith H.V. et Paton C.A., 1995**, Occurence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in sewage influent in six sewage treament plants in Scotland and prevalence of cryptosporidiosis and *Giardia*sis diagnosed in the communities served by those plants, p47-52, in Protozoan Parasites and Water, Betts W.B., Casemore D., Fricker C., Smith H. et Watkins J. Eds, The Royal Society of Chemistry Publisher, Cambridge.

- **Rodgers M.R., Flanigan D.J. et Jakubowski W., 1995**, Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference, Appl. Env. Microbiol., 61 (10), 3759-3763.

- **Rosales M.J., Mascaro C. and Osuna A., 1993**, Ultrastructural study of *Cryptosporidium* development in Madin-Darby Canine Kidney Cells, Vet. Parasitol., 45, 267-273.

- **Rose J.B., 1988**, Occurence and significance of *Cryptosporidium* in water, JAWWA, 80, 53-58.

- **Rose J.B., 1990**, Occurence and control of *Cryptosporidium* in drinking water, p294-321, in Drinking Water Microbiology, McFeters Ed, Springer Verlag, New York, 1990.
- **Rose J.B., Cifrino A., Madore M.S., Gerba C.P., Sterling C.R. et Arrowood M.J., 1986**, Detection of *Cryptosporidium* from wastewater and freshwater environments, Wat. Sci. Tech., 18, 233-239.
- **Rose J.B., Landeen L.K., Riley K.R. et Gerba C.P., 1989**, Evaluation of immunofluorescence techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from environmental samples, Appl. Env. Microbiol., 55 (12), 3189-3196.
- **Rose J.B. et Gerba C.P., 1991**, Assessing potential health risks from viruses and parasites in reclaimed water in Arizona and Florida, USA, Wat. Sci. Tech., 23, 2051-2088.
- **Rose J.B., Gerba C.P. et Jakubowski W., 1991**, Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*, Environ. Sci. Technol., 25, 1393-1400.
- **Rosenberg M., 1991**, Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon : Water interface. Crit. Rev. Microbiol., 18(2), 159-173.
- **Rosenberg M., Gutnick D. and Rosenberg E., 1980**, Adherence of bacteria to hydrocarborns : a simple method for measuring cell surface hydrophobicity, FEMS Microbiol. Lett., 9, 29-33.
- **Rosenberg M., Perry A., Bayer E.A., Gutnick D.L., Rosenberg E. and Ofek I., 1981**, Adherence of acinetobacter calcoaceticus RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane, Infect. Immun., 33, 29-33.
- **Rosenberg M. and Kjelleberg S., 1986**, Hydrophobic interactions : Role in bacterial adhesion, Adv. Microb. Ecology (Marshall KC. ed.), vol 9, 353-393, Plenum publishing corporations, New-York.
- **Rosenblatt J.E. et Sloan L.M., 1993**, Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens, J. Clin. Microbiol., 31 (6), 1468-1471.
- **Rossi P., Pozio E. et Besse M.G., 1990**, Cryopreservation of *Cryptosporidium* sp. oocysts, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 84, 68.
- **Roullet R., 1985**, Epuration et recyclage des eaux usées dans les immeubles par combinaison réacteur biologique / modules d'ultrafiltration, Documentation technique de la société Techsep, groupe Rhône-Poulenc.
- **Rush B.A., Chapman P.A. and Ineson R.W., 1990**, A probable waterborne outbreak of cryptosporidiosis in the Sheffield area, J. Med. Microbiol., 32, 239-242.
- **Salvat O. et Leborgne R., 1990**, L'usine de microfiltration tangentielle par membranes de Saint-Maurice-Les -Châteauneuf (Syndicat du Sornin), TSM - L'Eau, 10, 495-501.
- **Schuler F.P., Ghosh M.M. et Gopalan P., 1991**, Slow sand and diatomaceous earth filtration of cysts and other particulates, Wat. Res., 25 (8), 995-1005.

- **Sheather A.L., 1923**, The detection of intestinal protozoa and mange parasites by flotation technique, J. Comp. Pathol. Ther., 36, 266-275.
- **Shields P.A. and Farrah S.R., 1983**, Influence of salts on electrostatic interactions between poliovirus and membrane filters, Appl. Env. Microbiol., 45, 526-531.
- **Siddons C.A., Chapman P.A. et Rush B.A., 1992**, Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in faeces and environmental samples, J. Clin. Pathol., 45, 479-482.
- **Smith H.V., 1990**, Environmental aspect of *Cryptosporidium* species : a review, J. Royal Soc. Med., 83, 629-631.
- **Smith H.V., 1992**, *Cryptosporidium* and Water : a review, J. Instit. Wat. Env. Manag., 6, 443-451.
- **Smith H.V., 1995**, Emerging technologies for the detection of protozoan parasites in water, p108-114, in Protozoan Parasites and Water, Betts W.B., Casemore D., Fricker C., Smith H. et Watkins J. Eds, The Royal Society of Chemistry Publisher, Cambridge.
- **Smith H.V., Girdwood R.W.A., Patterson W.J., Hardie R., Green L.A., Benton C., Tulloch W., Sharp J.C.M. et Forbes G.I., 1988**, Waterborne outbreak of cryptosporidiosis, Lancet, Dec 24/31, 1484.
- **Smith H.V., Patterson W.J., Hardie R., Greene L.A., Benton C., Tulloch W., Gilmour R.A., Girdwood R.W.A., Sharp J.C.M. et Forbes G.I., 1989(a)**, An outbreak of waterborne cryptosporidiosis caused by post-treatment contamination, Epidem. Infect., 103, 703-715.
- **Smith H.V., Smith A.L., Girdwood R.W.A., et Carrington E.G., 1989(b)**, The effect of free chlorine on the viability of *Cryptosporidium* spp. oocysts, Water Research Centre, Medmenham, Bucks, UK, 1989, WRc publication no PRU 2023-M.
- **Smith H.V., Mc Diarmid A., Smith A.L., Hinson A.R. et Gilmour R.A., 1989(c)**, An analysis of staining methods for the detection of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water-related samples, Parasitol., 99, 323-327.
- **Smith H.V. et Rose J.B., 1990**, Part II - Paper VII, Waterborne Cryptosporidiosis, p146-153, in *Cryptosporidium* in Water Supplies, Report of the group of experts, HMSO, London.
- **Smith H.V., Smith P.G., Girdwood R.W.A., et Grimason A.M., 1992**, (cité par Grimason et al, 1993), Mechanisms and optimisation for the removal and destruction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in Kenyan waste stabilisation ponds, Overseas Development Administration, ODA Research Scheme R4486.
- **Smith H.V., Robertson L.J. et Ongerth J.E., 1995**, Cryptosporidiosis and *Giardia*sis : Impact of waterborne transmission, J. Water SRT - Aqua, 44 (6), 258-274.

- **Stadterman K.L., Sninsky A.M., Sykora J.L. et Jakubowski W., 1995**, Removal and inactivation of *Cryptosporidium* oocysts by activated sludge treatment and anaerobic digestion, Wat. Sci. Tech., 31 (5-6), 97-104.
- **Sterling C.R. et Arrowood M.J., 1986**, Detection of *Cryptosporidium* infections using a direct immunofluorescent assay, Pediatr. Infect. Dis. J., 5, 5139-5142.
- **Sterling C.R., Korich D.G., Mead J.R., Madore M.S. et Sinclair N.A., 1989**, Chlorine and ozone inactivation of *Cryptosporidium* oocysts, Am. Wat. Wks. Ass., Water Quality Technology Conference, Nov 89, Philadelphia.
- **Stibbs H.H. et Ongerth J.E., 1986**, Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears, J. Clin. Microbiol., 24, 517-521.
- **Tangermann R.H., Gordon S., Wiesner P. et Kreckman L., 1991**, An outbreak of cryptosporidiosis in a day - care center in Georgia, Am. J. Epidem., 133 (5), 471-476.
- **Tazi - Pain A., Faivre M. et Bourbigot M.M., 1992**, Comparaison des techniques membranaires pour le traitement des eaux de surface chargées en matières organiques : perspectives d'évolution, TSM - L'Eau, 9, 411-415.
- **Tighe S., 1995,** Communication personelle citée par Rodgers et al, 1995.
- **Tilley M., Upton B.L., Blackburn B.L. et Anderson B.C., 1990**, Identification of outer oocyst wall proteins of three *Cryptosporidium* (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) species by ^{125}I surface labeling, Infect. Immun., 58, 252-253.
- **Timms S., Slade J.S. et Fricker C.R., 1995**, Removal of *Cryptosporidium* by slow sand filtration, Wat. Sci. Tech., 31 (5-6), 81-84.
- **Trouve E., Urbain V. et Manem J., 1994**, Treatment of municipal wastewater by a membrane bioreactor : results of a semi-industrial pilot scale study, Wat. Sci. Tech., 30 (4), 151-157.
- **Tsai S.S., Ho L.F., Chang C.F. et Chu R.M., 1983**, Cryptosporidiosis in domestic birds, Chinese J. Microbiol. Immunol., 16, 307-313.
- **Tyzzer E.E., 1907**, A sporozoan found in the pectic glands of common mouse, Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 5, 12-13.
- **Tzipori S., 1983**, Cryptosporidiosis in animals and humans, Microbiol. Rev., 47, 84-96.
- **Tzipori S., Angus K.W., Gray E.W. et Campbell I., 1980**, Vomiting and diarrhea associated with cryptosporidial infection, N. Engl. J. Med., 303, 818-.
- **Tzipori S., Mc Cartney E., Lawson G.H.K., Rowland A.C. et Campbell I., 1981(a)**, Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*, Res. Vet. Sci., 31, 358-368.
- **Tzipori S., Angus K.W., Campbell I. et Cjerihew L.W., 1981(b)**, Diarrheoa du to *Cryptosporidium* infection in artifically reared lambs, J. Clin. Microbiol., 14, 100-105.

- **Tzipori S., Smith M., Halpin C., Angus K.W., Sherwood D. et Campbell I., 1983**, Experimental cryptosporidiosis in calves : clinical manifestation and pathological findings, Vet. Rec., 112, 116-120.

- **U.S. Department of Health and Human Services, 1994**, *Cryptosporidium* infections associated with swimming pools - Dane County, Wisconsin, 1993, Morbidity and Mortality Weekly Report, 43 (31), 561-563.

- **Ungar B.L.P. , 1990** , Cryptosporidiosis in humans (Homo sapiens) , in Cryptosporidiosis in man and animals, Dubey J.P., Speer C.A. et Fayer R. Eds, Boca Raton, Fla : CRC Press, 1990.

- **Upton S.J. et Current W.L., 1985**, The species of *Cryptosporidium* (C. Apicomplexa : Cryptosporidiida) infecting mammals, J. Parasitol., 71 (5), 625-629.

- **Upton S.J., Tilley M.E., Marchin L. et Fina L.R., 1988**, Efficacy of pentaiodide resin desinfectant on *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) oocysts in vitro, J. Parasitol., 74 (4), 719-721.

- **Van Leenwen P., Lawrence A. et Hausman D., 1991**, An outbreak of cryptosporidial infection amongst children in Adelaïde, Med. J. Australia, 154 (10), 708-709.

- **Van Oss C.J. and Gillman C.F., 1972**, Phagocytosis as a surface phenomena. I. Contact angles and phagocytosis of non-opsonized bacteria, Res. J. Reticuloendothel. Soc., 12, 283-292.

- **Vesey G. et Slade J., 1991**, Isolation and identification of *Cryptosporidium* from water, Wat. Sci. Tech., 24, 165-167.

- **Vesey G., Slade J.S. et Fricker C.R., 1991**, Taking the eye strain out of environmental *Cryptosporidium* analysis, Lett. Appl. Microbiol., 13, 62-65.

- **Vesey G., Slade J.S., Byrne M., Shepherd K. and Fricker C.R., 1993(a)**, A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water, J. Appl. Bact., 75, 82-86.

- **Vesey G., Slade J.S., Byrne M., Shepherd K., Dennis P.J. et Fricker C.R., 1993(b)**, Routine monitoring of *Cryptosporidium* oocysts in water using flow cytometry, J. Appl. Bact., 75, 87-90.

- **Vesey G., Fricker C.R., Veal D.A. and Ashbolt N.,1994**, Novel approaches to the concentration and the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water, IAWQ 17th Biennial International Conference, 24-29 july 1994, Budapest, Hungary, Conference Preprint Book 3, 216-223.

- **Villacorta-Martnez de Maturana I., Ares Mazas M.E., Duran-Oreiro D. et Lorenzo-Lorenzo M.J., 1992**, Efficacy of activated sludge in removing *Cryptosporidium parvum* oocysts from sewage, Appl. Env. Microbiol., 58 (11), 3514-3516.

- **Watzl B., Huang D.S., Alak J., Parban H., Jenkins E.M. et Watson R.R., 1993**, Enhancement of resistance to *Cryptosporidium parvum* by pooled bovine colostrum during murine retroviral infection, Am. J. Trop. Med. Hyg., 48 (4), 519-523.
- **Weber R., Bryan R.T., Bishop H.S., Wahlquist S.P., Sullivan J.J. et Juranek D.D., 1991**, Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens : Evidence for low sensitivity of current diagnostic methods, J. Clin. Microbiol., 29 (7), 1323-1327.
- **Weber R., Bryan R.T. et Juranek D.D., 1992**, Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens, J. Clin. Microbiol., 30 (11), 2869-2873.
- **Webster K.A., Pow J.D.E., Giles M., Catchpole J. et Woodward M.J., 1993**, Detection of *Cryptosporidium parvum* using a specific polymerase chain reaction, Vet. Parasitol., 50, 35-44.
- **Whitmore T.N. et Carrington E.G., 1993**, Comparison of methods for recovery of *Cryptosporidium* from water, Wat. Sci. Tech., 27 (3-4), 69-76.
- **Whitmore T.N. et Robertson L.J., 1995**, The effect of sewage sludge treatment processes on oocysts of *Cryptosporidium parvum*, J. Appl. Bact., 78, 34-38.
- **Wiandt S., 1994**, Devenir des kystes de *Giardia s.p.* dans les eaux usées épurées par lagunage et étude expérimentale des effets de facteurs abiotiques environmentaux sur leur survie, Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier.
- **Woodmansee D.D., 1987**, Studies of in vitro excystation of *Cryptosporidium* from calves, J. Protozool., 34, 398-402.
- **Xiao L. et Herd R.P., 1994**, Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves, Veterin. Parasitol., 55, 257-262.

GLOSSAIRE

% A : pourcentage d'adhésion des oocystes à l'octane.
$CACO_2$: lignée cellulaire de cancer colique humain.
COD : carbone organique dissous.
COT : carbone organique total (mgC/L).
DAPI : 4',6 diamino-2-phénylindole.
$DAPI^+$: oocystes ayant intégré le DAPI.
$DAPI^-$: oocystes n'ayant pas intégré le DAPI.
DIC Normarski : microscope à contraste d'interférence différentiel.
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay.
FEA : séparation sur une solution de formol et une solution d'éthyl acétate.
FITC : isothiocyanate de fluorescéine.
HBSS : Hanks balanced salts solution.
IF : immunofluorescence.
M.F. : microfiltration.
MEM : milieu essentiel minimum.
MEST : matières en suspension totales (mg/L).
NTU : unité d'expression de la turbidité (nephelometric turbidity unit).
O.M.S. : Organisation Mondiale pour la Santé.
PBS : phosphate buffer saline, tampon phosphate.
PCR : polymerase chain reaction, réaction de polymérisation en chaîne.
PI : iodure de propidium.
PI^+ : oocystes ayant intégré le PI.
PI^- : oocystes n'ayant pas intégré le PI.
SDS : sodium dodécyl sulfate.
SWTR : Service of Water Treatment Rule.
Test AMH : test d'adhésion microbienne aux hydrocarbures.
TMP : pression transmembranaire.
U.F. : ultrafiltration.
ΔP : différence de pression entre l'entrée et la sortie rétentat du système de filtration.

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE NANCY INTERUNIVERSITAIRE

Publications et Communications

PUBLICATIONS

• C. Drozd, M.C. Bonville, V Lahoussine-Turcaud et J. Schwartzbrod. 1993. Méthodes de détection de *Cryptosporidium* dans l'eau : Revue et application à l'analyse d'eaux usées au laboratoire. **Journal Français d'Hydrologie.** 24 (2), 173-190.

• Drozd C. and J. Schwartzbrod. 1996. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of *Cryptosporidium parvum.* **Applied and Environmental Microbiology.** 62 (4). 1227-1232.

• Drozd C. and J. Schwartzbrod. Study of Cryptosporidium surface hydrophobicity. *Soumis dans* ***Zentralblatt für Hygiene*** *(à paraître).*

• Drozd C. and J. Schwartzbrod. Detection of Cryptosporidium in water by floculation and determination of the viability of the concentrated oocysts. *Soumis dans* ***Water Science and Technology*** *(à paraître).*

COMMUNICATIONS

• Drozd C. et J. Schwartzbrod. 1993. Influence de la structure de *Cryptosporidium* sur l'efficacité de différents systèmes de potabilisation et en particuliers les membranes de microfiltration.
Séminaire Adhésion - Agrégation des Microorganismes, NANCY, mars 1993.

• Drozd C. et J. Schwartzbrod. 1993. Comparaison des techniques de détection de *Cryptosporidium* dans différents types d'eaux.
Colloque de l'Association Pharmaceutique Française pour l'Hydrologie , NANCY, mai 1993.

• Drozd C. et J. Schwartzbrod. 1994. Evaluation of *Cryptosporidium* surface hydrophobicity.
IAWQ 17th Biennal Conference, Water Quality International, BUDAPEST , juillet 1994.

• Drozd C. et J. Schwartzbrod. 1995. Optimisation des méthodes de détection de Cryptosporidium dans l'eau par floculation.
4ème congrès de la Société Française de Microbiologie, TOURS, mai 1995.

• Drozd C. et J. Schwartzbrod. 1996. Removal of Cryptosporidium from river water by crossflow microfiltration : a pilot-scale study
IAWQ, Health Related Water Microbiology, Symposium 1996, Majorque.

université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

Nom, Prénom : D R O Z D Céline

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 1.07.96. Pour/n°38

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

Jean Pierre FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1
24-30, rue Lionnois B.P.3069 54013 Nancy cedex
Tél : 83 32 81 81 Fax : 83 32 95 90

RESUME

Cryptosporidium est un protozoaire intestinal responsable de diarrhées profuses provoquant une mortalité importante chez les personnes immunodéprimées. Son mode principal de transmission est l'eau contaminée. Ainsi en avril 1993 à Milwaukee (USA) une épidémie de cryptosporidiose d'origine hydrique a provoqué la contamination de 400 000 personnes. La fréquence et surtout l'amplitude de telles épidémies montrent bien que les systèmes de traitement classiques ne garantissent pas une sécurité totale en approvisionnement d'eau potable. Dans ce contexte l'adéquation de nouveaux systèmes de traitement d'eaux potables, comme les procédés de micro et d'ultrafiltration, pour l'élimination de *Cryptosporidium*, doit être évaluée.

L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer l'efficacité des systèmes de potabilisation employant les procédés de microfiltration tangentielle pour l'élimination de *Cryptosporidium* à partir d'eaux de surface.

La première partie du travail a permis de définir une méthode de purification des oocystes pouvant être appliquée lors de la détection de *Cryptosporidium* dans des échantillons environnementaux très peu chargés en oocystes, et d'autre part permettant d'obtenir un haut degré de pureté des suspensions en fin d'expérimentation afin de pouvoir accéder à des renseignements spécifiques sur les caractères intrinsèques du parasite.

Dans un deuxième temps, afin d'appréhender le comportement des oocystes et les phénomènes d'adhésion aux surfaces et particules en suspension intervenant au cours des procédés de microfiltration mais également lors des phases de concentration par floculation, une étude visant à évaluer les caractéristiques de surface du parasite a été menée.

Globalement les oocystes ont démontré un faible taux d'adhésion à l'octane (seulement 20% en moyenne), laissant suggérer que *Cryptosporidium spp* n'était pas caractérisé par des propriétés hydrophobes très marquées. Un potentiel zéta de -25 mV à pH 6 - 6.5 a été déterminé pour des oocystes en suspension dans de l'eau désionisée. Des mesures de potentiel zéta et d'hydrophobicité ont été réalisées en fonction du pH et de la force ionique ou de la conductivité du milieu.

Une étude méthodologique a ensuite été réalisée en deux parties visant d'une part à qualifier une méthode de concentration des oocystes de *Cryptosporidium* présents dans les échantillons d'eaux analysés au cours de l'étude sur pilote de microfiltration et d'autre part à définir une méthode d'évaluation de leur viabilité.

Parmi les deux techniques d'évaluation de la viabilité testées, seule la technique par inclusion / exclusion de DAPI et PI mise au point par Campbell et al, 1992, a permis d'obtenir de bons résultats grâce à la coloration spécifique des oocystes viables et non viables sur la base de leur intégrité structurale.

La floculation à l'hydroxyde d'aluminium, employant le sulfate d'aluminium 1mM à pH 6 pendant une nuit sur 20L d'échantillon, a été choisie pour la détection des oocystes dans les échantillons d'eaux prélevés sur le pilote de microfiltration car elle permet d'obtenir de bons rendements de récupération (60 % en moyenne) mais également de ne pas modifier la viabilité des oocystes détectée dont l'évaluation est particulièrement importante notamment au cours de la détermination du potentiel infectieux des rejets du système pilote.

Enfin la dernière partie du travail a permis d'évaluer l'efficacité des systèmes de microfiltration sur l'élimination de *Cryptosporidium* dans les eaux de surface. Pour cela un système pilote a été mis au point et testé au laboratoire. Ce système est constitué d'une membrane céramique tubulaire caractérisée par une porosité de 0.2 µm et une surface filtrante de 0.135 m^2. Une étude préliminaire a permis de fixer les paramètres hydrauliques optimaux de fonctionnement du système. Des échantillons de 200 L d'eaux de rivière contaminés artificiellement ont ensuite été filtrés. Une élimination supérieure à 4.8 log a été obtenue après filtration démontrant une bonne efficacité des systèmes pour l'élimination de *Cryptosporidium*. En parallèle, une étude de la viabilité des oocystes de *Cryptosporidium* dans les eaux de rejets de ces systèmes a été réalisée. Il apparaît ainsi, que si la viabilité des oocystes n'est pas altérée dans les rejets après un cycle habituel de filtration, la mise en oeuvre d'un système de décolmatage des membranes par lavage à la soude suivi d'un lavage à l'acide nitrique permet de réduire significativement le nombre d'oocystes viables retrouvés dans les eaux rejetées.

MOTS-CLES : eau - *Cryptosporidium* - microfiltration - hydrophobicité - potentiel zéta.