HAL
open science

Détection et génotypage des kystes de Giardia lamblia à partir de matrices environnementales et d'échantillons biologiques

Isabelle Bertrand

To cite this version:

Isabelle Bertrand. Détection et génotypage des kystes de Giardia lamblia à partir de matrices environnementales et d'échantillons biologiques. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2005. Français. NNT : 2005NAN12509 . tel-01748156

HAL Id: tel-01748156

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748156v1

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

PPN 088710521

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2005

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE SANTE ENVIRONNEMENT"

THESE

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Présentée et soutenue publiquement

le 31 mars 2005

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau

par

Isabelle BERTRAND

Née le 13 octobre 1976

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

Sujet :

D8 31733

Détection et génotypage des kystes de *Giardia lamblia* à partir de matrices environnementales et d'échantillons biologiques

MEMBRES DU JURY

Juges : Pr P. HARTEMANN (Faculté de Médecine, UHP Nancy 1)
Pr F. LUCENA GUTIERREZ (Facultat de Biologia, Barcelona)
Pr J. SCHWARTZBROD (Faculté de Pharmacie, UHP Nancy 1)

Rapporteurs : Dr C. HARF-MONTEIL (Faculté de Pharmacie, ULP Strasbourg)
Pr J.G. GOBERT (Faculté de Pharmacie, Paris V)

Remerciements,

A mon directeur de thèse,

A Madame le Professeur Janine Schwartzbrod, que je tiens tout d'abord à remercier pour ses enseignements dont j'ai ai eu la chance de bénéficier au cours de mes études à la faculté de pharmacie. Je vous remercie très vivement pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au laboratoire ainsi que pour votre encadrement, vos conseils et votre soutien au cours de mes péripéties expérimentales et administratives. Je profite de ces quelques lignes pour vous remercier également pour votre bonne humeur, votre sérénité et surtout votre enthousiasme au cours de ces cinq années passées au laboratoire.

A mes rapporteurs,

A Madame le Docteur Colette Harf-Monteil, qui m'a fait le plaisir d'accepter avec enthousiasme le rôle de rapporteur dans ce jury. Je vous remercie très vivement pour m'avoir fait profiter de votre très grande expérience dans le domaine grâce à votre regard critique et positif sur ce manuscrit.

A Monsieur le Professeur Jean-Gérard Gobert, qui m'a également fait l'honneur de participer à ce jury en tant que rapporteur. Ces quelques lignes me permettent de vous remercier très sincèrement pour votre implication et le rapport enthousiaste que vous avez réalisé sur ce travail de thèse.

A mes juges,

A Monsieur le Professeur Philippe Hartemann, qui m'a fait l'honneur et le plaisir d'accepter la responsabilité de juge pour cette thèse. Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour votre regard d'expert en santé publique que vous avez bien voulu porté sur ce travail.

A Monsieur le Professeur Francisco Lucena Gutierrez, dont le laboratoire a été l'initiateur du projet européen qui a permis la réalisation de cette thèse. Je vous remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail et ainsi de me faire profiter de votre grande expérience dans le domaine.

Pour les différents échantillons et prélèvements,

A Monsieur le Professeur Bernard Fortier, Madame le Docteur Jocelyne Collomb (CHU Nancy-Brabois) et à Monsieur le Docteur Jean Puyhardy (Hôpital militaire Legouest, Metz) pour nous avoir fait parvenir de nombreux échantillons biologiques qui ont notamment permis d'initier l'étape de génotypage. Mais aussi, à Madame le Docteur Nathalie Kapel (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris) et à Madame le Docteur Sandrine Houzé (Hôpital Bichat, Paris) pour avoir également accepté de nous transmettre des selles analysées dans leur laboratoire.

Je tiens à vous remercier, ainsi que le personnel des différents laboratoires d'analyse de ces quatre hôpitaux pour votre contribution à la réalisation de cette étude.

A Messieurs Kahn et Massion qui ont autorisé les prélèvements réguliers aux stations d'épuration de Nancy-Maxéville et de Metz. A Monsieur Schmidt (Abattoir de Metz) qui nous a permis d'effectuer de fréquents prélèvements sur ce site et nous a apporté de nombreux renseignements au cours de ces trois années de thèse.

A Messieurs David Santilli et Fabian Marin pour avoir effectué (avec le sourire) les nombreux prélèvements d'eaux usées indispensables au bon déroulement de ces travaux.

Aux membres du laboratoire,

A Mesdames les Docteurs Monique Albert et Sandrine Banas, mais aussi à Sandrine, Sylvain, Thierry, Benoît, Mélinda, Elisabete, Christophe, Josiane-Aurore, Magali, Lucie, Olivier, Jérémie, David, Julien, Alexandre, Hermann, Charles, Leslie pour l'ambiance chaleureuse et conviviale qui a régné pendant cette thèse.

A Monsieur le Professeur Louis Schwartzbrod pour son accueil et son enthousiasme contagieux lors de ses enseignements magistraux dont j'ai pu bénéficier au cours de mes études.

A Monsieur le Docteur Christophe Gantzer pour avoir guidé mes premiers pas en biologie moléculaire lors de mon DEA et de ma première année de thèse.

A Olivier Estevenon pour sa participation technique courte mais efficace et au Docteur Cédric Carteret pour son aide au cours de l'analyse statistique des résultats.

A Sandrine Lemoine pour ses conseils informatiques, mais aussi pour sa disponibilité, son aide esthétique, sa gentillesse et sa bonne humeur.

Aux quatre Docteurs : Thierry Chesnot, Benoît Gassilloud, Sylvain Skraber et Mélinda Maux pour m'avoir fait une place dans leur joyeuse équipe lors de mon arrivée au laboratoire. Merci à Sylvain pour la détection des coliformes, à Mélinda pour l'immunofluorescence, à Benoît pour ses conseils pour les techniques de PCR qualitative et quantitative et bien sûr à Thierry pour sa formation aux techniques de purification des protozoaires. Tous mes vœux de réussite !

A mes deux stagiaires,

A Elisabete Gomes et Laetitia Albertini, qui ont chacune passé cinq semaines de leurs vacances d'été au laboratoire. Merci pour votre intérêt, votre bonne humeur, votre implication et votre enthousiasme lors de vos stages respectifs. Bonne chance pour la suite !

Au CIES de Lorraine,

A Monsieur C.-H. Grégoire, Mesdames F. Dendien et L. Hensch du CIES de Lorraine pour leur disponibilité, les formations proposées, mais aussi pour leur soutien et leur ténacité dans la recherche d'un financement suite au monitorat.

A mes encadrants de monitorat et d'ATER,

A Monsieur le Professeur P. Maincent et à Madame le Docteur F. Paulus pour leur encadrement dans mes premiers pas dans l'enseignement.

Pour avoir financé ce doctorat,

L'Union Européenne (TOFPSW EVK1.2000.22080) et la Z.A.M. (Zone Atelier Moselle) ont soutenu l'ensemble des expérimentations effectuées au cours de cette thèse.

Les contrats d'allocataire-moniteur et d'ATER (Ministère de l'éducation nationale et de la recherche) ont également permis la réalisation de ce doctorat.

Et bien sûr,

Merci à mes parents, mais aussi à Bettina et Guillaume. Merci à Juliette, Hubert, Adeline, Benoît, Pablo, Pascale, Jérôme, Sylvain, ... pour les soirées et week-end de détente.

Et pour finir, un merci plus spécial à Thierry.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNr SSU ou ARNr 18S : Acide ribonucléique ribosomal Small SubUnit
BET : Bromure d'éthidium
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BSA : Bovine Serum Albumin
Ct : Threshold cycle (Cycle seuil)
CV : Coefficient de variation
CWP : Cyst Wall Protein (protéine de paroi)
DAPI : 4',6 diamino-2-phénylindol
DEPC : Diéthylpyrocarbonate
DIC : Contraste Interférentiel Différentiel
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
DMI : Dose Minimale Infectieuse
dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate
ESV : Encystation Specific Vesicle
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétate
EF1A : Elongation Factor 1 Alpha
EIA : Enzyme Immuno Assay
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbend Assay
FAM : 6-carboxyfluorescéine
FDA : Diacétate de fluorescéine
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert
GDH : Glutamate deshydrogénase
HSP : Heat Shock Protein
If : Intensité de fluorescence
IFA : Immunofluorescence assay
IMS : Séparation immunomagnétique
MGB : Minor Groove Binder
MIF : Merthiolate Iode Formamide
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NFQ : Non Fluorescent Quencher
NGS : Normal Goat Serum
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
Pb : Paire de bases
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PE : Phycoérythrine
PI : Iodure de propidium
RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RT : Reverse Transcription
STEP : station d'épuration
TAMRA : 6-carboxytétraméthylrhodamine
Taq : Thermophilus aquaticus
TBE : Tris Borate EDTA
Tm : Temperature melting (température de fusion)
TPI : Triose Phophate Isomérase
TRITC : Tétraméthylrhodamine B thioisocyanate
T90 : Temps nécessaire pour inactiver 90 % d'une population
US-EPA : United States - Environmental Protection Agency
VSP : Variant spécifique des protéines de surface
Pour les tableaux : **NR** : Non Renseigné

Sommaire

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Introduction 1

Etude bibliographique 3

Description du sujet de thèse et des objectifs 87

Matériel et Méthodes 89

Résultats : Chapitre 1 119

Résultats : Chapitre 2 147

Résultats : Chapitre 3 167

Discussion 197

Conclusion 209

Références bibliographiques 213

Annexes

SOMMAIRE : Etude bibliographique

1- Place de Giardia parmi les micro-organismes à transmission hydrique. 3

2- Historique. 4

3- Giardia : une taxonomie en évolution. 4

3.1- Taxonomie du genre *Giardia*. 4

3.2- Les six espèces du genre *Giardia*. 5

3.3- Giardia lamblia : une espèce complexe. 7

3.3.1- La mise en place d'une classification de *Giardia lamblia* en différents génotypes. 8

3.3.2- La confirmation de cette classification. 10

4- Description du génome de Giardia. 12

4.1- Le projet de séquençage du génome de *Giardia*. 12

4.2- Caractéristiques du génome. 12

4.2.1- Les chromosomes. 12

4.2.2- Taille du génome haploïde. 13

4.3- Ploïdie de *Giardia* au cours de son cycle parasitaire. 13

5- Biologie de Giardia. 13

5.1- Le cycle de vie de *Giardia*. 13

5.2- Structure générale de *Giardia*. 14

5.3- Le trophozoïte. 15

5.3.1- Morphologie. 15

5.3.2- Cytosquelette, mobilité et adhésion du trophozoïte. 15

5.4- Le kyste : forme de résistance. 16

5.5- Les étapes intermédiaires : le dékystement et l'enkystement. 18

5.5.1- Le dékystement. 18

5.5.2- L'enkystement. 19

5.6- Techniques de multiplication de *Giardia* en laboratoire. 20

5.6.1- Multiplication *in vivo*. 20

5.6.2- Multiplication *in vitro*. 20

6- Giardia chez son hôte. 21

6.1- DMI et pouvoir pathogène. 21

6.2- Signes cliniques. 22

6.3- Réponse immunitaire. 22

6.4- Diagnostic. 23

7- Détection, quantification et évaluation de la viabilité des kystes de Giardia. 23

7.1- Techniques de concentration des kystes. 23
7.1.1- Concentration des kystes à partir d'eaux. 23
7.1.2- Concentration des kystes à partir d'aliments. 27

7.2- Techniques de purification des kystes. 27
7.2.1- La purification par cytométrie en flux. 27
7.2.2- La purification des kystes par les méthodes diphasiques. 28
7.2.3- La purification par séparation immunomagnétique : IMS. 29
7.2.3.1- Principe de l'IMS. 29
7.2.3.2- Influence de la matrice sur l'efficacité de l'IMS. 29
7.2.3.3- Autres facteurs pouvant influencer le rendement de l'IMS. 30
7.2.4- Les techniques de purification basées sur la densité. 31
7.2.4.1- Purification à partir de selles. 32
7.2.4.2- Purification à partir d'eaux. 33
7.2.4.3- Paramètres pouvant modifier les performances des techniques basées sur la densité. 33

7.3- Techniques de détection des kystes. 35
7.3.1- La méthode œuf et parasite. 35
7.3.2- Les techniques immunologiques. 35

7.4- Techniques d'estimation de la viabilité. 37
7.4.1- L'électrorotation. 37
7.4.2- La microscopie optique. 37
7.4.2.1- La coloration à l'éosine. 37
7.4.2.2- Le contraste interférentiel différentiel (DIC). 37
7.4.2.3- Les colorants fluorogéniques. 38
7.4.3- Le dékystement in vitro. 38
7.4.4- L'inoculation à l'animal ou dékystement in vivo. 38
7.4.5- Comparaison des trois techniques classiques d'estimation de la viabilité. 39

7.5- Méthodes de référence pour la détection des kystes de *Giardia* dans le milieu hydrique. 40

8- L'apport des techniques de biologie moléculaire dans l'étude de Giardia. 42

8.1- Description des techniques utilisées pour la détection ou la quantification de *Giardia*. 42
8.1.1- Les techniques d'hybridation. 42
8.1.1.1- La méthode FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). 42
8.1.1.2- L'hybridation dot-blot. 42
8.1.2- L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction). 43
8.1.2.1- Principe. 43
8.1.2.2- Révélation des produits amplifiés. 43
8.1.3- La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). 44
8.1.4- La quantification par PCR en temps réel. 44

8.2- L'intérêt de ces techniques pour la détection de *Giardia*. 48

8.3- L'estimation de la viabilité par les techniques de biologie moléculaire. 49

8.4- La quantification de *Giardia* par PCR en temps réel. 50

8.5- Les problèmes liés à l'analyse de prélèvements biologiques ou d'échantillons environnementaux. 51
8.5.1- Les problèmes d'inhibition. 51
8.5.2- Les problèmes de spécificité. 54

9- Les voies de contamination de Giardia. 54

9.1- Les mammifères en tant que réservoir de Giardia lamblia. 54
9.1.1.- Réservoir en milieu urbain. 55
9.1.1.1- *Giardia lamblia* chez l'Homme : prévalence et génotypage. 55
9.1.1.2- *Giardia lamblia* chez les animaux domestiques : prévalence et génotypage. 58
9.1.2- Réservoir en milieu extra-urbain. 59
9.1.2.1- *Giardia lamblia* chez les animaux d'élevage : prévalence et génotypage. 59
9.1.2.2- *Giardia lamblia* chez les animaux sauvages. 63

9.2- Contamination de l'environnement. 64
9.2.1- Les eaux usées et les boues. 64
9.2.1.1- Contamination des eaux usées brutes. 64
9.2.1.2- Contamination des boues résiduaires. 66
9.2.1.3- Contamination des eaux usées épurées. 66
9.2.2- Les eaux de surface. 67
9.2.3- Les eaux récréationnelles. 70

9.3- Survie des kystes de *Giardia* aux conditions environnementales. 70

9.4- Voies de contamination et épidémies. 72
9.4.1- La transmission zoonotique. 72
9.4.2- La transmission de personne à personne. 72
9.4.3- La voie alimentaire. 72
9.4.4- La voie hydrique. 74

9.5- Schéma général des réservoirs et voies de contamination de *Giardia*. 75

10- La rupture du cycle parasitaire. 77

10.1- Limitation des possibilités de contamination d'un nouvel hôte. 77
10.1.1- Les traitements de potabilisation. 72
10.1.2- Prévention de la giardiose : mesures d'hygiène et vaccination. 77
10.1.2.1- Mesures d'hygiène. 80
10.1.2.2- La vaccination chez les animaux. 81

10.2- Limitation de la contamination de l'environnement. 81
10.2.1- Agents thérapeutiques. 81
10.2.1.1- Les nitro-5 imidazolés. 81
10.2.1.2- Traitements alternatifs. 82
10.2.1.3- Nouvelles molécules. 83
10.2.2- Le traitement des eaux usées et des boues. 83
10.2.2.1- Traitement d'épuration des eaux usées. 83
10.2.2.2- Traitement des boues résiduaires. 85

SOMMAIRE : Matériel et Méthodes

BIBLIOTHEQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

1- Schéma général des expérimentations. 89

2- Matériel commun à plusieurs protocoles. 89

3- Suspensions purifiées de kystes de Giardia lamblia et Giardia muris. 90

3.1- Suspensions purifiées de kystes fournies par Waterborne™. 90

3.2- Réalisation de gamme de dilution de kystes. 90

3.3- Extraction de l'ADN à partir de kystes en suspensions purifiées. 90

3.3.1- Matériel. 90

3.3.2- Protocole d'extraction de l'ADN. 90

4- Eaux usées. 91

4.1- Sites de prélèvement des eaux usées. 91

4.2- Description des étapes suivies par les échantillons. 92

4.3- Analyse physico-chimique et numération des coliformes thermotolérants. 93

4.3.1- Mesure du pH et de la turbidité. 93

4.3.2- Numération des coliformes thermotolérants. 93

4.3.2.1- Matériel. 93

4.3.2.2- Protocole. 94

4.4- Techniques de concentration des kystes à partir des eaux usées. 94

4.4.1- Procédure de concentration par centrifugation. 94

4.4.2- Protocole de concentration par floculation au carbonate de calcium. 94

4.4.2.1- Matériel. 94

4.4.2.2- Procédure de concentration par floculation. 95

4.5- Techniques de purification des kystes. 95

4.5.1- Filtration. 95

4.5.2- Technique de séparation Formaldéhyde-Acétate d'éthyle (FEA). 95

4.5.2.1-Matériel. 95

4.5.2.2- Protocole de purification FEA. 96

4.5.3- Technique de séparation à l'acétate d'éthyle. 96

4.5.4- Flottation sur solution de Percoll-saccharose. 96

4.5.4.1- Matériel. 96

4.5.4.2- Procédure de flottation sur solution de Percoll™ -saccharose. 96

4.5.5- Gradient de densité sur solutions de bromure de potassium. 97

4.5.6- Gradient de densité sur solutions de saccharose. 98

4.5.7- Gradient de densité sur solutions de Nycodenz™. 98

4.5.8- Séparation immunomagnétique (IMS). 99

4.5.8.1- Matériel. 99

4.5.8.2- Procédure IMS. 99

4.5.8.3- Modifications apportées au protocole initial. 100

4.6- Procédés visant à améliorer la détection par PCR à partir d'échantillons environnementaux. 100

4.6.1- Techniques visant à améliorer la lyse des kystes. 100

4.6.2- Procédés visant à limiter l'effet des inhibiteurs lors de la détection par PCR. 100

4.7- Extraction de l'ADN. 101

4.7.1- Matériel. 101

4.7.2- Protocole d'extraction de l'ADN à partir d'échantillons d'eaux usées. 101

5- Selles humaines. ____ *102*

5.2- Origine des prélèvements analysés. ____ **102**

5.2- Procédures de purification-concentration des kystes de *Giardia* à partir de selles. ____ **102**

5.2.1- Séparation à l'acétate d'éthyle. ____ 102

5.2.2- Purification-concentration par chromatographie gel-filtration. ____ 102

5.2.2.1- Matériel. ____ 102

5.2.2.2- Protocole. ____ 103

5.3-Obtention d'une suspension purifiée de kystes à partir de selles humaines. ____ **103**

5.4- Extraction de l'ADN. ____ **103**

6- Quantification des kystes de Giardia en immunofluorescence. ____ *104*

6.1- Matériel. ____ **104**

6.2- Protocole de marquage. ____ **104**

6.3- Observation microscopique. ____ **105**

7- Détection par PCR en temps réel et PCR qualitative. ____ *105*

7.1- Séquences des gènes TPI et EF1A disponibles sur la base de données Genbank. ____ **105**

7.2- Quantification des espèces *G. lamblia* et *G. muris* et des génotypes A et B de *G. lamblia* par PCR en temps réel. ____ **105**

7.2.1- Matériel. ____ 105

7.2.1.1- Critères de sélection des amorces et des sondes TaqMan et TaqMan MGB. ____ 106

7.2.1.2- Caractéristiques des sondes et amorces utilisées pour la quantification des espèces *G. lamblia* et *G. muris*. ____ 106

7.2.1.3- Caractéristiques des sondes et amorces utilisées pour la quantification des assemblages A et B de l'espèce *G. lamblia*. ____ 106

7.2.2- Préparation du milieu réactionnel. ____ 108

7.2.3- Conditions d'amplification. ____ 108

7.2.4- Analyse des résultats en PCR quantitative. ____ 108

7.3- Détection des génotypes A, B, C et E de *Giardia lamblia* par PCR qualitative. ____ **109**

7.3.1- Matériel. ____ 109

7.3.1.1- Critères de sélection des amorces pour la PCR qualitative. ____ 110

7.3.1.1- Caractéristiques des amorces utilisées pour la détection des assemblages A et B de l'espèce *G. lamblia* ____ 110

7.3.1.2- Caractéristiques des amorces utilisées pour la détection des génotypes C et E de l'espèce *G. lamblia* ____ 110

7.3.2- Détection par PCR. ____ 110

7.3.2.1- Préparation du milieu réactionnel. ____ 110

7.3.2.2- Conditions d'amplification par PCR. ____ 111

7.3.3- Restriction enzymatique pour la détermination des génotypes des kystes isolés de selles. ____ 111

7.3.3.1- Préparation du milieu réactionnel. ____ 111

7.3.3.2- Profils électrophorétiques. ____ 111

7.3.4- Révélation des produits d'amplification et de restriction enzymatique. ____ 112

8- Analyse statistique des résultats. ____ *112*

Résultats - Chapitre 1

Développement et validation des protocoles de détection sur des suspensions purifiées de kystes.

1ère partie : Développement des PCR quantitatives et qualitatives

1- Gènes actuellement séquencés chez plusieurs espèces de Giardia. ____ *119*

2- Sélection des gènes cibles. ____ *120*

2.1- ARN18S : une cible idéale ? ____ **120**

2.2- La sélection des gènes cibles pour la distinction des espèces et des génotypes. ____ **120**

3- Sélection des amorces et des sondes. ____ *122*

3.1- Sélection d'amorces et de sondes pour les PCR en temps réel. ____ **122**

3.1.1- Les systèmes destinés à la quantification spécifique de *G. lamblia* et *G. muris* ____ 122

3.1.2- Les systèmes destinés à la quantification spécifique des génotypes A et B. ____ 122

3.2- Sélection de couples d'amorces pour les PCR qualitatives. ____ **123**

2ème partie : Optimisation des PCR quantitatives

1- Détermination des concentrations optimales en amorces. ____ *124*

1.1- Concentration optimale en amorces pour la PCRq-*lamblia*. ____ **124**

1.2- Concentration optimale en amorces pour la PCRq-*muris*. ____ **125**

1.3- Concentrations optimales en amorces pour la PCRq-A. ____ **126**

1.4- Concentrations optimales en amorces pour la PCRq-B. ____ **127**

2- Détermination de la concentration optimale en sonde. ____ *127*

2.1- Concentration optimale en sonde pour la PCRq-*lamblia*. ____ **128**

2.2- Concentration optimale en sonde pour la PCRq-*muris*. ____ **129**

2.3- Concentration optimale en sonde pour la PCRq-Assemblage A. ____ **130**

2.4- Concentration optimale en sonde pour la PCRq-Assemblage B. ____ **131**

3ème partie : Optimisation des PCR quantitatives

1- Evaluation de la spécificité des PCR quantitatives et qualitatives. ____ *132*

1.1- Evaluation de la spécificité par comparaison avec la base de données Genbank. ____ **132**

1.1.1.- Spécificité des systèmes PCRq-*lamblia* et PCRq-*muris*. ____ 132

1.1.1.1- Spécificité des amorces GIAF2 et GIAR1. ____ 132

1.1.1.2- Spécificité des sondes LAP1 et MUP1. ____ 133

1.1.2- Spécificité du système PCRq-A. ____ 133

1.2- Evaluation de la spécificité des sondes par PCR. 133

2- Evaluation de la sensibilité des PCR. *134*

2.1- Evaluation de la sensibilité des systèmes PCRq-*lamblia* et PCRq-*muris*. 134

2.1.1- Sensibilité observée avec le protocole initial d'extraction de l'ADN. 134

2.1.2- Sensibilité observée suite à l'optimisation du protocole d'extraction avec le RNA Carrier®. 134

2.1.3- Séquençage de l'amplicon de la PCRq-*muris*. 135

2.2- Evaluation de la sensibilité du système PCRq-A. 136

2.3- Evaluation de la sensibilité du système PCRq-B. 136

2.4- Evaluation de la sensibilité des PCR qualitatives. 136

3- Variations intra et inter-essai de l'étape de quantification. *137*

3.1- Variation intra-essai. 137

3.2- Variation inter-essai. 138

4- Evaluation du domaine de linéarité et du rendement. *139*

4.1- Domaine de linéarité et rendement de la PCRq-*lamblia*. 140

4.2- Domaine de linéarité et rendement de la PCRq-A. 140

4.3- Domaine de linéarité et rendement de la PCRq-B. 141

5- Variation inter-essai de l'étape d'extraction de l'ADN. *142*

6- Compétition des kystes de G. muris sur la quantification des kystes de G. lamblia. *142*

Résultats - Chapitre 2

Concentration et purification des kystes de *Giardia* à partir de prélèvements d'eaux usées.

1- Comparaison de techniques de concentration et de purification pour la détection des kystes de Giardia par immunofluorescence. ____ *147*

1.1- Comparaison de la floculation au carbonate de calcium et de la centrifugation pour la concentration des kystes de *Giardia*. ____ **148**

1.2- Comparaison de deux techniques de purification des kystes de *Giardia* : flottation sur solution de Percoll™-saccharose et gradient de saccharose. ____ **149**

2- Comparaison de protocoles d'extraction de l'ADN pour l'analyse d'eaux usées. ____ *150*

2.1- Comparaison des protocoles d'extraction en l'absence d'étape de purification des kystes. ____ **151**

2.2- Comparaison des protocoles d'extraction après une étape de purification des kystes. ____ **152**

3- Comparaison de procédés pour la détection des kystes dans les eaux usées par PCR en temps réel. ____ *153*

3.1- Les techniques de purification basées sur les caractéristiques physiques des kystes. ____ **153**

3.2- Procédés visant à limiter l'impact de la matière en suspension et des inhibiteurs lors de la détection par PCR. ____ **154**

Réactifs intervenant en amont de l'amplification ____ 155

Réactifs intervenant lors de l'amplification ____ 155

3.3- Intérêt d'une séparation diphasique à l'acétate d'éthyle. ____ **158**

4- Evaluation de la séparation immunomagnétique (IMS) pour la détection des kystes de Giardia par immunofluorescence et PCR en temps réel. ____ *159*

4.1- Evaluation de l'IMS pour la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence. ____ **160**

4.1.1- Essais d'optimisation du protocole de séparation immunomagnétique. ____ 160

4.1.2- Comparaison par immunofluorescence de l'IMS et du protocole développé au laboratoire. ____ 161

4.2- Evaluation de l'IMS pour la détection des kystes de *Giardia* par PCR en temps réel. ____ **163**

Résultats - Chapitre 3

1ère partie : Les kystes de *Giardia* dans les eaux usées : détection spécifique de l'espèce *Giardia lamblia* et de ses génotypes par PCR

1- Caractéristiques des prélèvements d'eaux usées des trois sites. ____ *167*

1.1- Comparaison des valeurs de turbidité. ____ **169**

1.2- Comparaison des valeurs de pH. ____ **170**

1.3- Comparaison des concentrations en coliformes thermotolérants. ____ **170**

1.4- Evaluation de la corrélation entre les paramètres physico-chimiques et la concentration en coliformes thermotolérants. ____ **171**

2- Concentrations en kystes de Giardia observées par immunofluorescence pour les trois sites. ____ *172*

2.1- Concentrations totales en kystes de *Giardia*. ____ **172**

2.2- Concentrations en kystes de *Giardia* positifs après marquage au PI. ____ **173**

2.2.1- Comparaison des concentrations en kystes PI positifs entre les différents sites. ____ 173

2.2.2- Comparaison entre les concentrations totales et les concentrations en kystes PI positifs. ____ 174

2.3- Evaluation des corrélations entre les concentrations en kystes et les caractéristiques des prélèvements d'eaux usées. ____ **174**

3- Concentrations en kystes de Giardia lamblia observées par PCR en temps réel pour les trois sites. ____ *175*

3.1- Comparaison des concentrations en kystes de *Giardia lamblia* pour les trois sites. ____ **175**

3.2- Comparaison des concentrations en kystes en fonction de la méthode de détection. ____ **176**

3.2.1- Comparaison des concentrations en kystes pour la station d'épuration de Nancy. ____ 176

3.2.2- Comparaison des concentrations en kystes pour la station d'épuration de Metz. ____ 177

3.2.3- Comparaison des concentrations en kystes pour l'abattoir de Metz. ____ 177

4- Détection de quatre génotypes de Giardia lamblia par PCR en temps réel et PCR qualitative. ____ *178*

4.1- Détection du génotype C. ____ **179**

4.2- Détection du génotype E. ____ **179**

4.2.1- Résultats de la détection du génotype E par PCR qualitative. ____ 179

4.2.2- Confirmation du génotype par séquençage. ____ 180

4.3- Détection des génotypes A et B de *Giardia lamblia* par PCR en temps réel. ____ **182**

4.3.1- Détection du génotype A par PCR en temps réel. ____ 182

4.3.2- Détection du génotype B par PCR en temps réel. ____ 183

4.3.3- Comparaison des concentrations en génotypes A et B. ____ 184

4.3.4- Comparaison des concentrations en kystes observées par PCR et par immunofluorescence. ____ 184

4.3.4.1- Comparaison des concentrations en kystes pour la station d'épuration de Nancy. ____ 184

4.3.4.2- Comparaison des concentrations en kystes pour la station d'épuration de Metz. ____ 186

2ème partie : Génotypage de kyste de *Giardia lamblia* isolés de selles humaines

1- Résultats du génotypage des kystes de Giardia lamblia isolés de selles humaines. 188

1.1- Les différents profils électrophorétiques observés. 188

1.2- Génotypage des cas sporadiques. 189

1.2.1- Détection des génotypes A et B. 189

1.2.2- Mise en évidence des sous-génotypes A-I, A-II, B-III et B-IV. 190

1.3- Génotypage de cas regroupés de giardiose. 195

Discussion. 197

Conclusion. 209

Références bibliographiques. 213

Annexes.

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Introduction

✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣

Giardia est un protozoaire flagellé, parasite intestinal de l'Homme et de nombreuses espèces animales. Ce micro-organisme cosmopolite est responsable d'une infection intestinale, la giardiose. En l'absence de traitement, un passage à la chronicité avec une aggravation des symptômes peut être observé, notamment chez les personnes immunodéprimées. *Giardia* est généralement caractérisé par une prévalence élevée chez les enfants, surtout lorsque les conditions d'hygiène s'avèrent insuffisantes. Les structures de garde collectives et les voyages en zones endémiques constituent également des facteurs de risque plus marqués pour cette parasitose.

Le kyste constitue la forme de résistance de ce protozoaire excrétée dans les selles de ses hôtes et par voie de conséquence dans l'environnement et notamment les eaux usées brutes, les boues résiduaires, les eaux de surface...Le milieu hydrique, favorable à la survie des kystes, constitue la principale voie de transmission de *Giardia*. Ainsi, ce micro-organisme apparaît comme une des causes les plus fréquentes d'épidémies d'origine hydrique dues à un agent infectieux dans les enquêtes épidémiologiques réalisées principalement dans les pays anglo-saxons.

Au niveau de sa classification, le genre *Giardia* est composé de six espèces parmi lesquelles une seule est pathogène pour l'Homme : *Giardia lamblia*. Les termes *Giardia duodenalis* et *Giardia intestinalis* sont également employés comme synonymes pour cette espèce complexe qui comporte sept génotypes ou assemblages (A à G). Seuls deux génotypes, A et B, sont isolés chez l'Homme, mais aussi chez de nombreux mammifères domestiques, d'élevage ou sauvages. Les cinq autres assemblages présentent une plus grande spécificité d'hôte, ainsi le génotype E est détecté uniquement chez les animaux d'élevage (bovins, porcins,...).

A l'heure actuelle, des protocoles de référence sont développés par les normes française ou américaine pour la détection des kystes de *Giardia* à partir d'échantillons hydriques de faible turbidité (eau potable, eau souterraine, eau de surface). Suite aux étapes de concentration-purification réalisées par filtration sur cartouche et séparation immunomagnétique (IMS), la détection des kystes de *Giardia* fait alors appel à une technique conventionnelle, l'immunofluorescence. Cette méthode longue et fastidieuse, présente l'inconvénient majeur de ne pas détecter spécifiquement les espèces et les génotypes des kystes présents dans les échantillons analysés. Ainsi, le développement de techniques autorisant une détection spécifique, rapide et sensible au niveau des espèces et surtout des génotypes apporterait des données essentielles concernant l'étude des voies de transmission entre les différents hôtes et leur rôle dans la contamination de l'environnement. Ces données permettraient notamment de mieux évaluer la place de l'Homme et des autres mammifères en tant que réservoir pour les différents génotypes de *Giardia lamblia*.

Les techniques de biologie moléculaire connaissent actuellement un essor considérable dans l'analyse d'échantillons environnementaux en autorisant une détection spécifique des micro-organismes, basée sur leur génome. La PCR peut ainsi détecter de façon rapide, spécifique et sensible les différentes espèces du genre *Giardia* mais aussi les génotypes de l'espèce *Giardia lamblia* qui ne sont pas différenciables sur la base de critères morphologiques. La PCR conventionnelle est basée sur l'analyse des résultats après amplification de l'ADN, en revanche la PCR en temps réel développée plus récemment permet d'évaluer la quantité d'ADN initialement

contenue dans un échantillon. L'utilisation d'une gamme étalon amplifiée de façon simultanée avec les échantillons à analyser, permet de connaître leur concentration initiale en micro-organismes et notamment en kystes de *Giardia*.

Ces techniques de biologie moléculaire présentent l'inconvénient d'être sensibles à un large éventail de molécules inhibitrices. Ainsi, le développement de protocoles de concentration et de purification des kystes de *Giardia* adaptés aux échantillons biologiques et surtout aux prélèvements environnementaux notamment les eaux usées caractérisées par une forte turbidité ainsi qu'une concentration élevée en matière organique et en inhibiteurs est nécessaire afin de pouvoir faire appel à ces techniques.

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Etude

Bibliographique

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

1- Place de Giardia parmi les micro-organismes à transmission hydrique.

L'eau, indispensable à la vie, est le premier élément constitutif des êtres vivants et de leur environnement. Toutefois, depuis la fin du 19ème siècle, l'eau est reconnue comme vecteur de micro-organismes pathogènes pour l'Homme. La mise en évidence de la transmission hydrique pour *Vibrio cholerae* et *Salmonella typhi*, puis pour de nombreux autres micro-organismes pathogènes (bactéries, virus, parasites), a conduit au développement du traitement de l'eau de boisson dans les pays industrialisés. Cependant, l'accès à l'eau potable est très inégal entre les pays et l'O.M.S. estime à 1,1 milliards le nombre de personnes qui n'y ont pas accès. De plus, 1,8 millions de personnes décèdent de diarrhées chaque année et 90 % d'entre elles sont des enfants de moins de 5 ans, en grande majorité dans les pays en voie de développement. 88 % de ces cas de diarrhées sont imputables à la consommation d'eau non potable et à des conditions sanitaires et d'hygiène insuffisantes (O.M.S., 2004).

A l'exception des leptospires et des légionelles, les micro-organismes à transmission hydrique présentés dans le tableau 1, sont transmis par la voie féco-orale. Dans les pays en voie de développement, bien que les aliments et de mauvaises conditions d'hygiène constituent des voies de contamination fréquentes, l'eau est considérée comme la principale voie de transmission de ces micro-organismes pathogènes (Ashbolt, 2004).

Tableau 1 : Principaux micro-organismes à transmission hydrique pathogènes pour l'Homme (d'après Rose et Slifko, 1999 ; Schoenen, 2001 ; Schwartzbrod *et al.*, 2002)

Bactéries	Virus entériques	Protozoaires
- *Campylobacter jejuni*	- *Adenovirus*	- *Acanthamoeba spp.*
- *Escherichia coli (souches pathogènes)*	- *Enterovirus* (Poliovirus, Coxsackie virus)	- *Balantidium coli*
- *Legionella pneumophila*	- *Norovirus*	- *Cryptosporidium parvum*
- *Leptospira spp.*	- *Rotavirus*	- *Cyclospora cayetanensis*
- *Salmonella spp.*	- *Saporovirus*	- *Entamoeba histolytica*
- *Shigella spp.*	- Virus des hépatites	- *Giardia lamblia*
- *Vibrio cholerae*		- *Isospora belli*
- *Yersinia enterocolitica*		- *Naegleria fowleri*
		- *Toxoplasma gondii*

Bien que les traitements de potabilisation se révèlent efficaces contre la plupart des micro-organismes pathogènes, les pays industrialisés ne sont pas totalement épargnés par les risques microbiologiques liés à la consommation d'eau. En effet, certains micro-organismes et plus particulièrement les protozoaires présentent une forte résistance aux traitements de désinfection par l'ozone et les dérivés du chlore (Ashbolt, 2004 ; Schoenen, 2001). Dans les pays industrialisés, les épidémies d'origine hydrique à *Giardia*, *Cryptosporidium* et plus récemment à *Toxoplasma gondii* ont montré l'importance de ces protozaoires longtemps sous-estimés par rapport aux bactéries et virus (Schoenen, 2001). Parmi ces protozoaires, *Giardia* est considéré comme responsable de 117 épidémies d'origine hydrique aux Etats-Unis entre 1960 et 1994 (Rose et Slifko, 1999). Ce parasite cosmopolite est considéré comme hyperendémique dans certains pays avec des taux de réinfection pouvant atteindre 98 % chez les enfants de moins de 10 ans (Ashbolt, 2004).

2- *Historique.*

La première description de *Giardia* est réalisée en 1681 par van Leuwenhoek à partir de ses propres selles diarrhéiques. Il faut toutefois attendre 1859 pour qu'une description plus détaillée de ce parasite soit effectuée par Lambl (Adam, 2001). Durant la première moitié du 19ème siècle, la dénomination de ce parasite est sujette à de nombreuses controverses car les noms d'espèces sont basés soit sur l'hôte d'origine, soit sur la morphologie.

En 1952, Filice publie une description morphologique très détaillée de ce parasite et propose trois espèces pour le genre *Giardia*. Ce micro-organisme est reconnu comme une cause de pathologie diarrhéique à partir de la fin des années 1950. La figure **1** présente les principales étapes de l'étude de *Giardia*.

- **1681** : 1ère description de ce parasite par van Leeuwenhoek.
- **1859** : Description détaillée de ce parasite par Lambl qui le nomme *Cercomonas intestinalis*.
- **1881** : Association entre le stade kyste et le stade flagellé.
- **1883** : 1ère utilisation de *Giardia* comme nom de genre.
- **1922** : Simon utilise des critères morphologiques pour distinguer *Giardia muris* et *Giardia lamblia*.
- **1932** : Dobell considère le tractus gastro-intestinal comme le lieu de multiplication de ce parasite.
- **1952** : Filice publie une description détaillée de *Giardia* et propose alors trois espèces : *G. lamblia*, *G. muris* et *G. agilis*.
- **1955 à 1965** : La communauté médicale commence à reconnaître *Giardia* comme une cause de pathologie diarrhéique.
- **1960-1980** : Epidémies d'origine hydrique reportées en Europe et aux Etats-Unis.
- **1987** : Erlandsen et Bemrick décrivent une nouvelle espèce : *G. psittaci*.
- **1988** : Description de l'espèce *G. microti* par Feely.
- **1990** : Description de l'espèce *G.ardeae* par Erlandsen *et al.*

Figure 1 : Principales étapes de l'étude de *Giardia* (Adam, 2001 ; Erlandsen et Bemrick, 1987 ; Erlandsen *et al.* 1990 ; Feely, 1988 ; Gardner et Hill, 2001 ; Rose et Slifko, 1999)

3- *Giardia : une taxonomie en évolution.*

3.1- Taxonomie du genre Giardia.

Giardia est un micro-organisme eucaryote appartenant au règne des protozoaires flagellés. Les règnes Archezoa (regroupant les micro-organismes dépourvus de mitonchondries) et protistes ont été récemment proposés, toutefois le terme protozoaire est préférentiellement utilisé pour qualifier *Giardia* (Adam, 2000 ; Adam, 2001).

Dans la classification basée sur sa morphologie, *Giardia* appartient à l'embranchement *Sarcomastigophora*, au sous-embranchement *Mastigophora* (ou Flagellés), à la classe *Zoomastigophorea* (ou Zooflagellés), à l'ordre *Diplomonadida* et à la famille *Hexamitidae* (six à huit flagelles, deux noyaux, symétrie bilatérale et parfois axostyles, corps médians) (Adam, 2001 ; Thompson, 2000).

En se basant sur l'analyse de l'ARN ribosomal et sur la morphologie, Cavalier-Smith et Chao (1996) proposent une nouvelle classification dans laquelle *Giardia* ne serait plus classé dans la famille *Hexamitidae*.

Giardia appartiendrait alors à la sous-classe *Diplozoa* ou *Diplomanadida*, à l'ordre *Giardiida* et à la famille *Giardiinae*. Toutefois, la plupart des auteurs continuent à classer *Giardia* dans la famille *Hexamitidae* (Slifko *et al.*, 2000).

L'ordre *Diplomonadida* est considéré comme regroupant des eucaryotes primitifs car les micro-organismes qui le constituent seraient dépourvus de certaines organelles typiques des eucaryotes comme les mitochondries et peroxysomes, et contiendraient des systèmes endomembranaires peu développés. De plus, cet ordre constituerait un embranchement précoce des eucaryotes d'après la phylogénie de certains gènes comme celui de la petite sous-unité de l'ARN ribosomal (ARNr SSU ou ARNr 18S). La taille de ce gène est en effet inférieure à celle des eucaryotes mais présente des structures secondaires typiques de ceux-ci (van Keulen *et al.*, 1993). La position de *Giardia* par rapport à l'acquisition de mitochondries par les eucaryotes, par endosymbiose, était source de controverse car ce protozoaire était jusqu'à présent considéré comme dépourvu de ces organelles. Toutefois, Tovar *et al.* (2003) ont récemment mis en évidence la présence de vestiges mitochondriaux appelés mitosomes dans le cytosol de trophozoïtes en utilisant des anticorps dirigés contre deux protéines mitochondriales.

La taxonomie actuelle de *Giardia* devrait certainement être amenée à évoluer suite aux différents travaux réalisés sur le métabolisme et le génome de ce parasite (Lloyd et Harris, 2002).

3.2- Les six espèces du genre Giardia.

Jusque dans les années 1920, le nombre d'espèces constituant le genre *Giardia* est source de très nombreuses controverses. Ainsi, plus de 40 espèces ont été décrites sur la base de l'hôte d'origine (van Keulen *et al.*, 1993). Actuellement, le genre *Giardia* est subdivisé en six espèces.

En 1952, Filice propose la distinction de trois premières espèces : *G. lamblia*, *G. muris* et *G. agilis* en se basant sur des critères morphologiques observés par microscopie optique, le critère principal étant alors la morphologie du corps médian (Adam, 2001 ; Thompson *et al.*, 2000). D'autres caractéristiques morphologiques permettent également la différenciation des espèces, il s'agit de la position du ou des corps médians, de la forme globale des trophozoïtes, de la dimension du disque ventral par rapport à la taille globale du trophozoïte et de caractéristiques observables par microscopie électronique (Monis et Thompson, 2003).

Deux nouvelles espèces *G. psittaci* et *G. ardeae* sont décrites respectivement par Erlandsen et Bemrick (1987) et Erlandsen *et al.* (1990) sur la base de caractères ultrastructuraux observés par microscopie électronique. Une sixième espèce, *G. microti* est caractérisée par la présence de deux trophozoïtes matures mis en évidence dans chaque kyste par observation en microscopie électronique. Le tableau **2** regroupe les caractéristiques morphologiques des six espèces du genre *Giardia*, ainsi que leur hôte.

Tableau 2 : Hôtes et caractéristiques morphologiques des différentes espèces du genre *Giardia* (Adam, 2001 ; Erlandsen et Bemrick, 1987 ; Feely, 1988 ; McRoberts *et al.*, 1996 ; Thompson *et al.*, 2000)

Espèce	Hôte	Microscopie optique		Microscopie électronique	Dimensions des trophozoïtes
		Aspect général des trophozoïtes	Corps médian		
G. lamblia	Mammifères, dont l'Homme	Piriforme ou en cerf-volant	1 à 2 corps médians, transverses, en forme de griffe		Longueur : 12 à 15 µm Largeur : 6 à 8 µm
G. psittaci	Oiseaux			Trophozoïtes : repli ventrolatéral incomplet en position antérieure, pas de rainure marginale	
G. microti	Rats musqués et campagnols			Kystes : deux trophozoïtes matures (avec leur disque ventral) dans chaque kyste	
G. ardeae	Hérons		arrondi ou en forme de griffe	Trophozoïtes : Flagelles caudaux de taille différente	
G. muris	Rongeurs	Court et arrondi	Petit et arrondi		Longueur: 9 à 12 µm Largeur : 5 à 7 µm
G. agilis	Amphibiens	Long et mince	En forme de larme		Longueur: 20 à 29 µm Largeur : 4 à 5 µm

L'utilisation de techniques de biologie moléculaire permet depuis une dizaine d'années d'améliorer et de confirmer la classification du genre *Giardia* au niveau des espèces. Toutefois, aucune donnée n'est actuellement disponible concernant le génome de *G. psittaci* et *G. agilis*. Par contre, pour les quatre autres espèces du genre *Giardia*, plusieurs gènes sont entièrement ou partiellement séquencés et permettent de valider la distinction de ces espèces basées initialement sur des différences phénotypiques. Les premiers travaux de comparaison de séquence sont réalisés sur la petite sous-unité du gène de l'ARNr ou ARNr 18S.

Ainsi, par comparaison des séquences complètes de la petite sous unité de l'ARNr pour trois espèces : *G. lamblia*, *G. muris* et *G. ardeae*, van Keulen *et al.* (1993) constatent que ces trois espèces sont bien distinctes et que *G. muris* est génétiquement plus proche de *G. ardeae* que de *G. lamblia*. Les pourcentages d'homologie de séquence de l'ARNr de *G. muris* avec ces deux espèces sont respectivement de 80 et 76 %.

La distinction de l'espèce *G. microti* est source de controverses, certains auteurs considérant qu'elle appartiendrait en fait à l'espèce *G. lamblia* dont elle est très proche morphologiquement. Van Keulen *et al.* (1998) comparent des séquences de l'ARNr de *G. microti* provenant de rongeurs avec celles des espèces *G. lamblia* *G. muris* et *G. ardeae*. L'arbre phylogénétique construit à partir de ces séquences est présenté sur la figure 2.

Monis *et al.* (1999) comparent également les séquences des ARNr de *G. ardeae*, *G. muris* et de différents isolats de *G. lamblia* avec deux séquences de *G. microti* fournies par van Keulen *et al.* (1998).

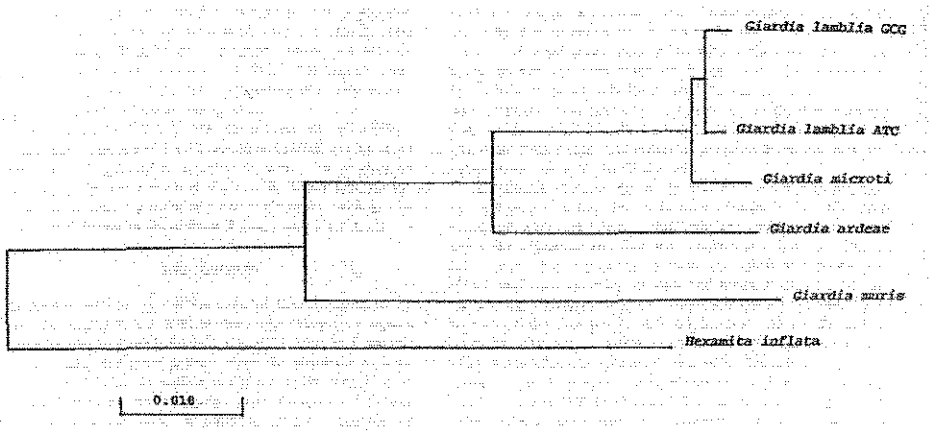


Figure 2 : Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences de l'ARNr de *G. lamblia*, *G. muris*, *G. ardeae*, *G. microti* et *Hexamita* sp. utilisée comme référence externe avec la méthode Neighbour-Joining (van Keulen *et al.*, 1998)

Ces deux équipes constatent alors que les différences entre *G. microti* et *G. lamblia* ne sont pas plus importantes que celles observées à l'intérieur de l'espèce de *G. lamblia*. Toutefois, *G. microti* est la seule espèce pour laquelle les kystes matures contiennent deux trophozoïtes. L'absence de réaction avec les anticorps monoclonaux destinés à la mise en évidence des kystes de *G. lamblia* suggère également des différences antigéniques au niveau de la paroi des kystes entre ces deux espèces (van Keulen *et al.*, 1998). De plus, l'ARNr qui est une séquence bien conservée, ne constitue peut-être pas la cible de choix pour l'étude de cette espèce.

Les travaux récents de Sulaiman *et al.* (2003) qui comparent les séquences nucléotidiques de la TPI (Triose Phosphate Isomérase) d'un grand nombre d'isolats humains et animaux permettent de confirmer que *G. microti* constitue une espèce distincte de *G. lamblia*. La TPI présente un haut niveau de polymorphisme, son étude permet d'améliorer la distinction des espèces du genre *Giardia*, mais aussi d'étudier les variations de séquences intra-espèce notamment pour *G. lamblia*.

3.3- Giardia lamblia : une espèce complexe.

Les noms d'espèce *G. lamblia*, *G. duodenalis* puis *G. intestinalis* ont été successivement utilisés durant ces trois dernières décennies. Ces trois noms d'espèces peuvent être considérés comme synonymes. En effet, le terme *G. lamblia* ne peut être réservé aux isolats humains car les génotypes isolés chez l'Homme sont également retrouvés chez de nombreux mammifères (Adam, 2001 ; Thompson *et al.*, 2000 ; Monis *et al.*, 1999).

Aucune caractéristique morphologique ne permet de distinguer les isolats de *Giardia lamblia*. Par contre, la mise en évidence de différences de virulence, d'infectiosité, de sensibilité aux agents thérapeutiques, ainsi que des différences génomiques et allozymiques suggèrent que *G. lamblia* serait une espèce complexe (Andrews *et al.*, 1989 ; Meloni *et al.*, 1989). De nombreuses études vont conduire à la mise en place d'une classification de cette espèce en différents groupes ou génotypes.

3.3.1- La mise en place d'une classification de Giardia lamblia en différents génotypes.

✳ Les génotypes pathogènes pour l'Homme.

La première classification au niveau moléculaire d'isolats de *Giardia lamblia* est réalisée dès 1985. Les techniques de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et de Southern-blot permettent en effet de classer 15 isolats en trois groupes distincts qui sont ensuite confirmés par l'analyse des antigènes de surface des trophozoïtes (Nash *et al.*, 1985 ; Nash et Keister, 1985). Ces auteurs distinguent alors un groupe 1 ou WB qui est l'isolat utilisé comme référence, un groupe 2 proche de l'isolat WB et enfin un groupe 3 distant de cet isolat. En 1992, cette classification est validée par la comparaison de gènes des protéines de surface (VSP) des trophozoïtes par Southern-blot et par la comparaison d'une partie de la séquence de la petite sous-unité de l'ARNr (Nash et Mowatt, 1992 ; Weiss *et al.*, 1992). Toutefois la distinction au niveau de la séquence de l'ARNr n'est basée que sur une seule variation nucléotidique entre la séquence de chaque groupe.

La classification actuelle des isolats de *G. lamblia* pathogènes pour l'Homme est essentiellement basée sur les travaux réalisés par des équipes australiennes. Ainsi, Andrews *et al.* (1989) distinguent quatre groupes (I à IV) suite à l'analyse par électrophorèse de 23 alloenzymes provenant de trophozoïtes issus de 77 isolats humains. En faisant appel à la même technique pour l'analyse de 60 isolats humains, Mayrhofer *et al.* (1995) confirment les résultats obtenus par Andrews *et al.* (1989) et distinguent deux groupes majeurs dénommés assemblages. Les groupes I et II sont alors rassemblés dans l'assemblage A et les groupes III et IV sont considérés comme appartenant à l'assemblage B. Ces assemblages A et B montrent 62 % de divergence par électrophorèse allozymique et l'assemblage A apparaît comme plus homogène que l'assemblage B (Mayrhofer *et al.*, 1995).

Par comparaison de 47 isolats par électrophorèse d'isoenzymes, Southern-blot et RAPD, Homan *et al.* (1992) classent 47 isolats humains et animaux en deux groupes : "Polonais" et "Belge". Par comparaison de la séquence complète de la petite sous-unité de l'ARNr entre les génotypes "Polonais" et "Belge", van Keulen *et al.*, (1995) montrent une différence caractéristique dans une région conservée de cette séquence. Cette "signature" caractéristique est située en positions 22 à 24, elle est constituée de trois nucléotides : ATC pour le génotype "Polonais" et GCG pour le génotype "Belge". La comparaison de séquences de cette même cible pour des isolats humains et canins, permet à Hopkins *et al.* (1997) de distinguer quatre groupes (1 à 4). Les groupes 1 et 2 regroupent la totalité des isolats humains, correspondent aux génotypes "Polonais" et "Belge" définis précédemment par Homan *et al.* (1992) et présentent la signature nucléotidique décrite par van Keulen *et al.* (1995). Trois isolats canins sont également classés dans les groupes 1 et 2.

L'analyse par PCR-RFLP du gène de la GDH (Glutamate DesHydrogénase) pour des isolats d'origine humaine et animale, permet à Monis *et al.* (1996) de montrer que les génotypes "Polonais" et "Belge" de Homan *et al.* (1992) correspondent respectivement aux assemblages A et B de Mayrhofer *et al.* (1995). La comparaison de séquence de la TPI (Triose Phosphate Isomérase) de trois isolats classés dans les groupes 1 + 2 et 3 par Nash *et al.* (1985), montre 99,2 % d'homologie de séquence entre les groupes 1 et 2 et seulement 81 % d'homologie entre les groupes 1 et 3. De plus, les groupes 1 + 2 et le groupe 3 correspondent aux assemblages A et B respectivement (Lu *et al.*, 1998).

Ainsi, les isolats de *Giardia lamblia* pathogènes pour l'Homme sont classés en deux génotypes majeurs dénommés assemblages A et B en Australie, génotypes "Polonais" et "Belge" en Europe et Groupes 1 + 2 et 3 en Amérique du Nord et (Adam, 2000 ; Thompson *et al.*, 2000). Jusqu'à présent aucun consensus n'a permis de fixer une dénomination définitive pour ces génotypes, toutefois le terme assemblage est largement utilisé dans la littérature (Sulaiman *et al.*, 2003). Les nomenclatures utilisées respectivement par les différents auteurs pour caractériser les génotypes de *G. lamblia* isolés chez l'Homme sont présentées dans la première partie du tableau **3**.

Tableau 3 : Nomenclatures alternatives utilisées pour caractériser les génotypes de l'espèce *Giardia lamblia*

Hôtes	Génotypes	Références
Homme et mammifères	Assemblage A	Mayrhofer *et al.* (1995)
	Groupes I et II	Andrews *et al.* (1989)
	" Polonais "	Homan *et al.* (1992)
	Groupes 1 + 2	Nash *et al.* (1985)
	Groupe 1	Hopkins *et al.* (1997)
	Assemblage B	Mayrhofer *et al.* (1995)
	Groupes III et IV	Andrews *et al.* (1989)
	" Belge "	Homan *et al.* (1992)
	Groupe 3	Nash *et al.* (1985)
	Groupe 2	Hopkins *et al.* (1997)
Chiens	Assemblage C	Monis *et al.* (1998)
	Groupe 3	Hopkins *et al.* (1997)
	Assemblage D	Monis *et al.* (1998)
	Groupe 4	Hopkins *et al.* (1997)
Bétail (bovins, ovins, porcins)	Assemblage E	Monis *et al.* (1999)
	Génotype bétail	Ey *et al.* (1997)
Chats	Assemblage F	Monis *et al.* (1999)
Rats	Assemblage G	Monis *et al.* (1999)

✳ Les génotypes spécifiques aux animaux.

Lors de leurs travaux sur les variants des protéines de surface (VSP) des trophozoïtes, Ey *et al.* (1996) et Karanis et Ey (1998) observent un regroupement des isolats provenant d'animaux dans les assemblages A et B. Par contre, Mayrhofer *et al.* (1995) montrent la présence d'un génotype distinct des assemblages A et B lors de la comparaison d'un isolat félin avec les 60 isolats humains. Hopkins *et al.* (1997) distinguent également deux nouveaux génotypes dénommés groupes 3 et 4 regroupant uniquement des isolats canins par comparaison de séquences de l'ARNr. Par électrophorèse d'allozyme et comparaison des séquences de la GDH pour des isolats humains et canins, Monis *et al.* (1998) confirment l'existence de deux génotypes regroupant ces isolats canins. Ces deux génotypes sont dénommés assemblages C et D et correspondent aux groupes 3 et 4 de Hopkins *et al.* (1997).

Lors de la comparaison d'isolats humains et d'animaux d'élevage par électrophorèse d'alloenzymes et comparaison des séquences des VSP et de la GDH, Ey *et al.* (1997) distinguent un nouveau génotype spécifique aux animaux d'élevage. En faisant appel aux mêmes techniques, mais en comparant les séquences des gènes de la GDH, de l'EF1A (Facteur d'Elongation 1 Alpha) et de la TPI, Monis *et al.* (1999) confirment la distinction d'un génotype spécifique au bétail nommé assemblage E. Ils distinguent également deux nouveaux génotypes qui seraient spécifiques au chat et au rat nommés assemblages F et G respectivement.

Les dénominations de ces cinq génotypes ou assemblages spécifiques à certains mammifères sont présentées dans la deuxième partie du tableau **3**.

3.3.2- La confirmation de cette classification.

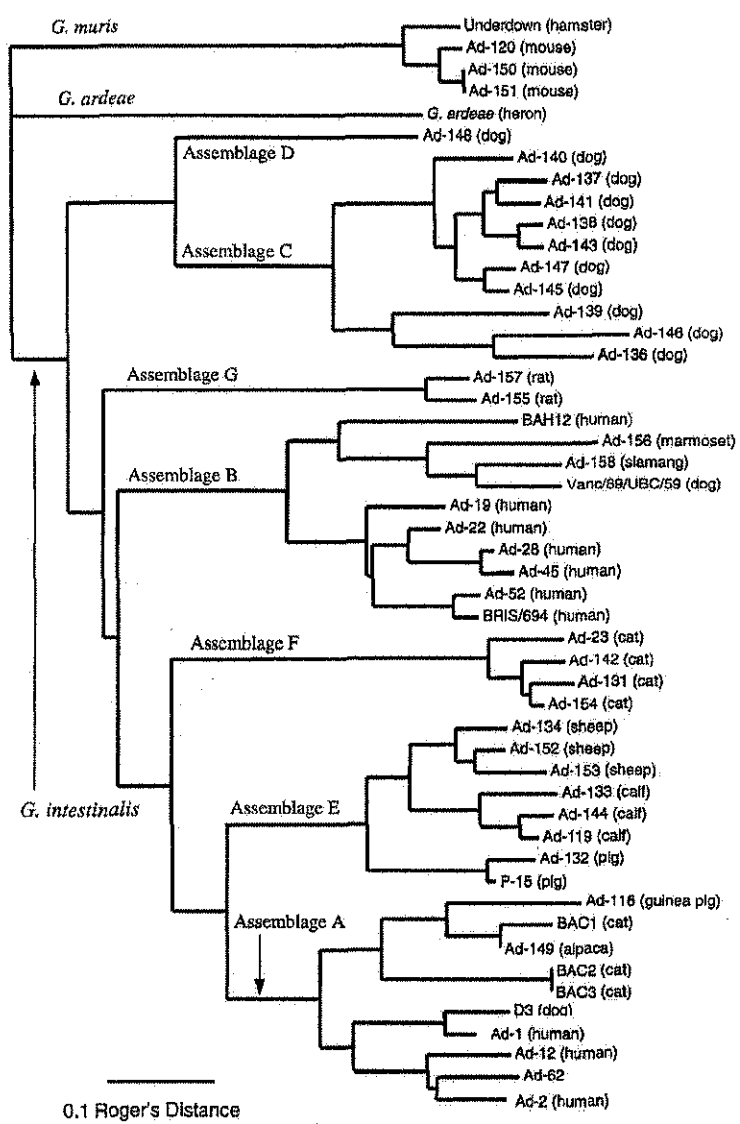
Les études récentes, concernant le génotypage d'isolats humains ou la comparaison d'échantillons d'origine humaine et animale dans le cadre d'étude de la transmission zoonotique de *G. lamblia*, confirment la classification des isolats de cette espèce en différents génotypes.

Ainsi, l'analyse de 11 isolats humains, d'isolats de *G. muris* et *G. ardeae* et surtout de 42 isolats provenant d'animaux domestiques, sauvages et d'élevage par électrophorèse d'alloenzymes, permet à Monis *et al.* (2003) de confirmer la distinction de sept génotypes ou assemblages (A à G). L'arbre phylogénétique résultant de cette étude est présenté sur la figure **3(A)**. Toutefois ces travaux sont réalisés sur des trophozoïtes maintenus en culture *in vitro*. Or l'analyse directe de l'ADN des kystes de *Giardia* permet d'éviter la sélection des génotypes pouvant être entraînée par les techniques de dékystement et de multiplication *in vitro* (Hopkins *et al.*, 1997).

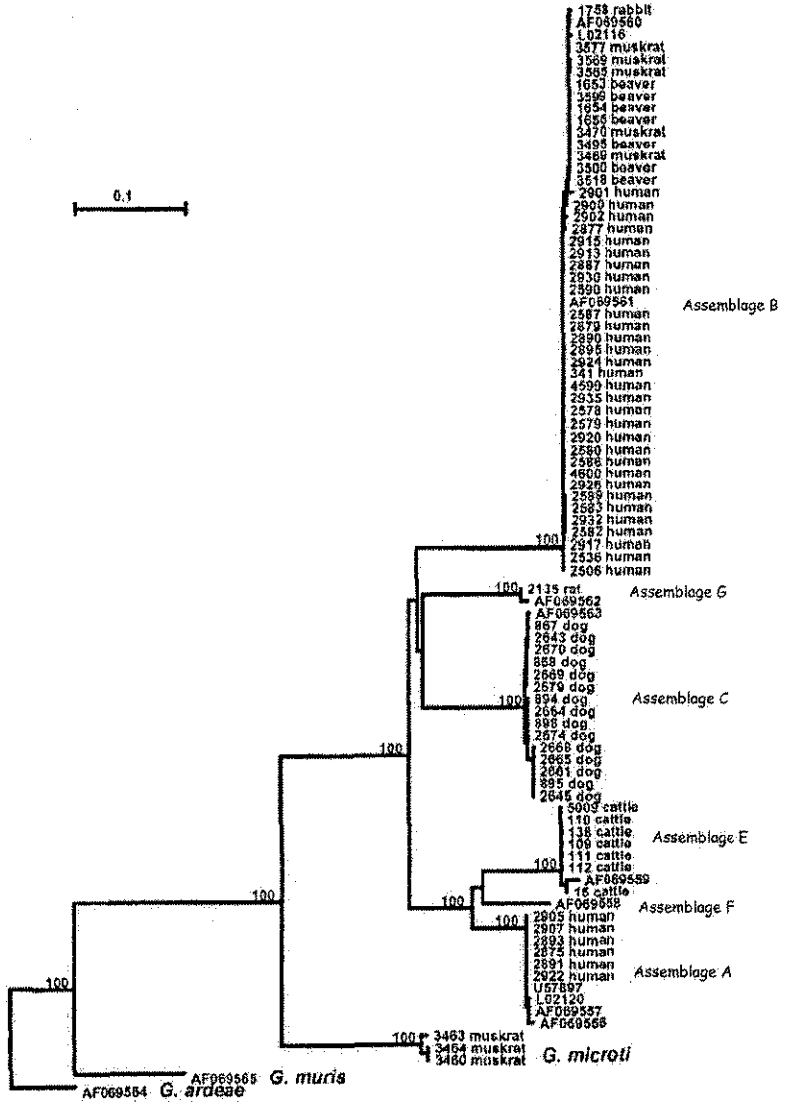
Les études permettant une validation plus précise de cette classification, visent à comparer, sans multiplication *in vitro* préalable, des gènes dont les séquences sont moins conservées que l'ARNr, comme la GDH et surtout la TPI (Amar *et al.*, 2002 ; Read *et al.*, 2004 ; Sulaiman *et al.*, 2003 ; Traub *et al.*, 2004). Parmi ces études, les travaux de Sulaiman *et al.* (2003) confortent solidement la classification de l'espèce *G. lamblia* en différents génotypes. L'arbre phylogénétique obtenu lors de cette étude par comparaison de la séquence nucléotidique de la TPI pour 76 isolats humains et animaux (chiens, bovins, rongeurs) est présenté sur la figure **3(B)**.

Ces études aboutissent à des conclusions identiques sur la présence de sept génotypes distincts composant l'espèce *G. lamblia*. Ainsi, les génotypes A et B regroupent la totalité des isolats humains mais aussi des isolats issus d'animaux domestiques, sauvages ou d'élevage et sont eux-mêmes subdivisés en deux sous-génotypes, I, II pour le génotype A et III, IV pour le génotype B.

Par contre, les assemblages C à G sont spécifiques de certaines espèces animales, notamment l'assemblage E qui contient uniquement des isolats d'animaux d'élevage (bovins, ovins, porcins) et les assemblages C et D qui regroupent des isolats canins. Ces études montrent que les kystes de *G. lamblia* excrétés par les animaux sont potentiellement pathogènes pour l'Homme. Ainsi la transmission zoonotique notamment par la voie hydrique peut être une des causes de contaminations humaines par ce protozoaire. De plus, ces travaux confirment la complexité de l'espèce *Giardia lamblia* et pourraient conduire, à terme, à une modification de la taxonomie actuelle.



3(A)



3(B)

Figure 3 : (A) Arbre phylogénétique obtenu après électrophorèse d'alloenzymes analysée avec la méthode Neighbour-Joining (Monis *et al.*, 2003). (B) Arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences de la TPI (Triose Phosphate Isomérase) avec la méthode Neighbour-Joining (Sulaiman *et al.*, 2003)

4- Description du génome de Giardia.

4.1- Le projet de séquençage du génome de Giardia.

Le projet de séquençage du génome de *Giardia lamblia* qui a débuté en Février 1998 est un travail en collaboration réunissant cinq équipes américaines. Ce séquençage est réalisé sur le clone C6 de la souche WB qui appartient au génotype A-I (ATCC -American Type Culture Collection - référence : 30957). La progression du séquençage peut être suivie sur un site internet (http://gmod.mbl.edu/perl/site/giardia ?page=intro) sur lequel les résultats sont reportés de façon bimensuelle. Les séquences de la souche WB sont également disponibles sur la banque de données NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/HTGS/). Le séquençage est effectué par la méthode de shotgun qui est réalisée par fragmentation au hasard de l'ADN cible en segments courts. Cette technique utilisée pour le séquençage de longues séquences d'ADN aboutit à la constitution d'une bibliothèque de séquences qui sont ensuite comparées et assemblées (McArthur *et al.*, 2000 ; Sambrook et Russell, 2001). Actuellement, 95,9 % du génome de la souche WB est séquencé.

4.2- Caractéristiques du génome.

4.2.1- Les chromosomes.

Les premières observations en microscopie optique ont révélé la présence de quatre chromosomes par noyau. Mais l'utilisation de la microscopie confocale a permis par la suite la distinction de cinq chromosomes par l'analyse des noyaux en métaphase (Adam, 2000).

L'électrophorèse en champs alternés (PFGE) qui permet la séparation de très gros fragments d'ADN, a tout d'abord mis en évidence quatre bandes distinctes pour des isolats appartenant au génotype A-I (ISR, WB, P1, GS, CAT), alors que cinq bandes ont été identifiées pour un isolat appartenant au génotype A-II (isolat JH). L'utilisation de sondes spécifiques pour chacune des cinq bandes isolées pour l'isolat JH, a montré que la bande de plus faible taille moléculaire des isolats A-I, correspondait en réalité aux deux plus petites bandes de l'isolat JH. La taille des chromosomes de *Giardia lamblia* a finalement été estimée sur l'isolat WB en comparant la migration de ses chromosomes avec celle des chromosomes de *Plasmodium falciparum* (Adam, 2000).

Ainsi, *Giardia* possède cinq chromosomes de taille comprise entre 1,6 et 3,8 Mb (Adam, 2000) :

Chromosomes **1 et 2** : 1,6 Mb

Chromosome **3** : 2,3 Mb

Chromosome **4** : 3,0 Mb

Chromosome **5** : 3,8 Mb

De plus, l'analyse par la méthode FISH confirme la présence d'au moins cinq chromosomes distincts par noyau (Yu *et al.*, 2002).

L'analyse par PFGE a mis en évidence un nombre de chromosomes supérieur à cinq pour certains isolats. L'utilisation de sonde spécifique de chaque chromosome a montré que les bandes supplémentaires mises en évidence par PFGE sont en fait des variants de taille d'un de ces cinq chromosomes. D'autres études ont montré que ces bandes supplémentaires sont des variants du chromosome 1 pour lesquels environ 30 % de la variation de taille serait due à des séquences répétées de l'ADN ribosomal (Adam, 2000). La variation de taille de ces

chromosomes se situe au niveau des régions subtélomériques des chromosomes (Le Blancq et Adam, 1998). Ces variants contiennent une région interne commune de 850 kb et une région dont la taille varie de 185 à 450 kb (Adam, 2000 ; Pardue *et al.*, 2001).

4.2.2- Taille du génome haploïde.

En utilisant ces données, la taille du génome haploïde est estimée à $1,2.10^7$ paires de bases (12 Mb). Avec la technique Cot, ce génome est estimé à une valeur minimum de 30 Mb (Nash *et al.*, 1985). Actuellement, sur la base de l'analyse par cytométrie en flux, la taille de ce génome est considérée comme étant comprise entre 10,5 Mb et 12 Mb (Bernander *et al.*, 2001). Cette valeur est en accord avec une taille comprise entre 10,6 et 11,9 Mb obtenue par analyse densitométrique (Adam, 2000). D'après le projet de séquençage la taille du génome de la souche WB est estimée à 11,7 Mb.

4.3- Ploïdie de Giardia au cours de son cycle parasitaire.

La ploïdie caractérise le nombre de copies de chaque chromosome dans une cellule. La ploïdie de *Giardia* a longtemps été source de controverses. Les premières études ont utilisé la densitométrie après séparation des chromosomes par électrophorèse en champs alternés (PFGE), l'analyse Cot ou la quantification par microspectrophotométrie après coloration de Feulgen (Coloration avec le réactif de Schiff après hydrolyse ménagée de l'ADN). Ces méthodes ont abouti à des résultats contradictoires, avec des ploïdies comprises entre 2N et 12N, dues au fait qu'elles ne permettent pas de différencier les différents stades du cycle parasitaire (Bernander *et al.*, 2001).

Bernander *et al.* (2001) font appel à la cytométrie en flux, en utilisant une souche d'*Escherichia coli* dont le contenu en ADN est connu, comme référence pour déterminer la ploïdie des différentes étapes de *Giardia*. Pour les trophozoïtes, la ploïdie varie de 4N à 8N, alors qu'elle est de 16N pour les kystes matures. Pour certains kystes immatures, une ploïdie de 12N est observée, dans ce cas la réplication et la division nucléaire ne se sont produites que pour un noyau. Les trophozoïtes en phase G1 sont tétraploïdes, c'est-à-dire qu'ils contiennent deux noyaux diploïdes (2 x 2N). Toutefois, ils restent plus longtemps en phase G2 (phase stationnaire) et contiennent alors deux noyaux tétraploïdes (2 x 4N) (Bernander *et al.*, 2001). Ces résulats sont en accord avec l'observation de quatre variants de taille pour le chromosome 1 (Le Blancq et Adam, 1998).

5- Biologie de Giardia.

5.1- Le cycle de vie de Giardia.

Le cycle parasitaire de *Giardia* est relativement simple et comporte deux stades, le kyste qui est la forme infestante, résistante à de nombreux facteurs environnementaux et le trophozoïte qui colonise la muqueuse intestinale de l'hôte et provoque la pathologie. La figure **4** présente le cycle parasitaire détaillé de *Giardia*.

L'infection d'un nouvel hôte débute par l'ingestion de kystes viables, suivie par leur dékystement. Chaque kyste libère alors un excyzoïte qui va subir deux divisions binaires et une division nucléaire aboutissant à la formation de quatre trophozoïtes (Bernander *et al.*, 2001 ; Svärd *et al.*, 2003).

Ces trophozoïtes vont alors coloniser la muqueuse du duodénum de leur l'hôte. Les trophozoïtes se multiplient par fission ou division binaire. La répartition des noyaux se ferait suivant un plan équatorial, chaque trophozoïte fille recevant une copie de chacun des deux noyaux du trophozoïte initial (Yu *et al.*, 2002). La division binaire des trophozoïtes peut se faire suivant trois plans : dorsal-ventral, dorsal-dorsal et ventral-ventral (Benchimol, 2004).

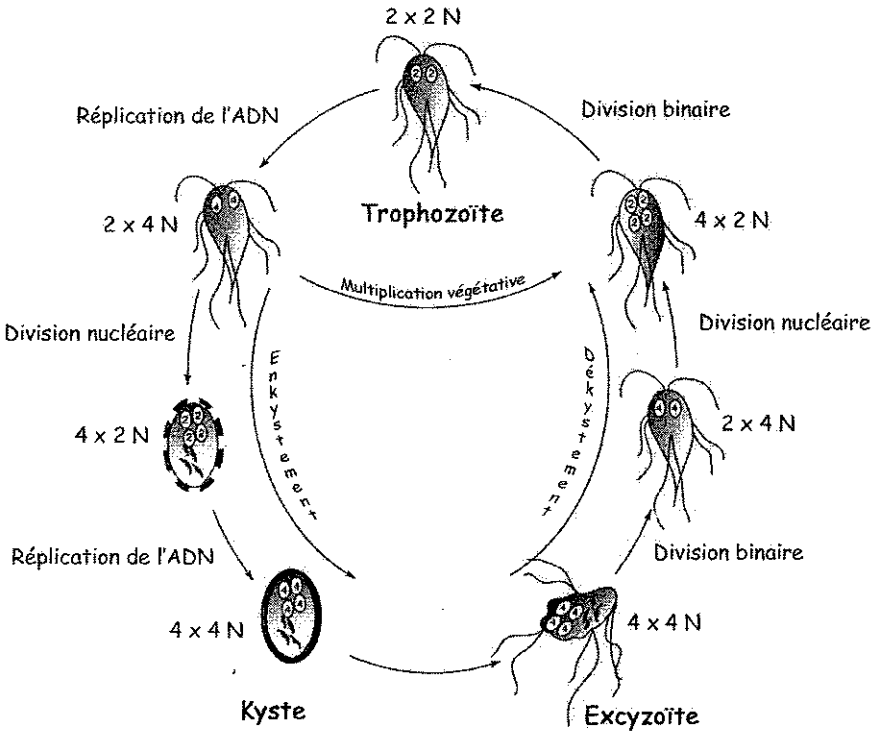


Figure 4 : Représentation schématique du cycle de *Giardia* (Svärd *et al.*, 2003)

Lors de l'enkystement, les trophozoïtes subissent des modifications biologiques très intenses afin de pouvoir survivre en dehors de l'intestin de leur hôte. Durant cette phase, pour chaque trophozoïte, deux réplications de l'ADN, séparées par une division nucléaire, vont permettre la formation d'un kyste mature contenant 4 noyaux tétraploïdes (4 x 4N).

L'enkystement et le dékystement sont parmi les processus de développement les plus simples des eucaryotes. La totalité du cycle de vie de *Giardia* peut être reproduit *in vitro* grâce à des stimuli mimant les conditions gastro-intestinales (Bernander *et al.*, 2001 ; Gillin *et al.*, 1996 ; Svärd *et al.*, 2003).

5.2- Structure générale de Giardia.

Giardia contient les différents éléments du système endomembranaire des eucaryotes constitués par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes. La présence d'un réticulum endoplasmique a été suggérée par observation en microscopie électronique et confirmée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre une protéine spécifique de cette structure (Adam, 2001). L'appareil de Golgi a été mis en évidence lors de l'enkystement, mais sa présence n'est pas confirmée pour les trophozoïtes. Une activité phosphatase acide, caractéristique des lysosomes, est détectée dans des vacuoles présentes en grand nombre à proximité de la membrane cytoplasmique des trophozoïtes (Adam, 2001 ; Lloyd et Harris, 2002).

Contrairement à ce qui était couramment admis, *Giardia* n'est pas un micro-organisme dépourvu de mitochondries. En effet, Tovar *et al.* (2003) ont récemment mis en évidence des organelles fonctionnelles, les mitosomes, dans des trophozoïtes. Ces structures dérivent des mitochondries originelles acquises par endosymbiose.

A l'heure actuelle, ni les peroxysomes, ni les hydrogénosomes, n'ont été clairement mis en évidence chez *Giardia*. Par contre, une faible activité hydrogénase a été détectée en anaérobiose et le développement de techniques de détection moins destructrices pour ces structures pourrait améliorer notre connaissance de l'organisation subcellulaire de ce protozoaire (Lloyd et Harris, 2002).

5.3- Le trophozoïte.

5.3.1- Morphologie et métabolisme.

Le trophozoïte ou forme végétative est responsable de la pathologie. La présence de glucose, fructose et éthanol stimule la respiration chez les trophozoïtes (Lloyd *et al.*, 2002). En présence d'oxygène, les trophozoïtes respirent en utilisant une protéine fer-soufre. Les voies de la glycolyse et des hexoses monophosphate permettent le catabolisme du glucose et la production d'énergie (Jarroll *et al.*, 2001).

Le trophozoïte présente une symétrie bilatérale avec deux noyaux en position antérieure. *Giardia* possède un cytosquelette complexe composé de plusieurs structures microtubulaires qui participent notamment aux phénomènes d'adhésion et de locomotion des trophozoïtes.

5.3.2- Cytosquelette, mobilité et adhésion du trophozoïte.

Le cytosquelette de ce protozoaire comprend quatre structures microtubulaires : 8 flagelles, un disque ventral, un à deux corps médians, ainsi que deux ensembles appelés "cordons".

La figure **5** correspond à la représentation schématique d'un trophozoïte de *Giardia lamblia*.

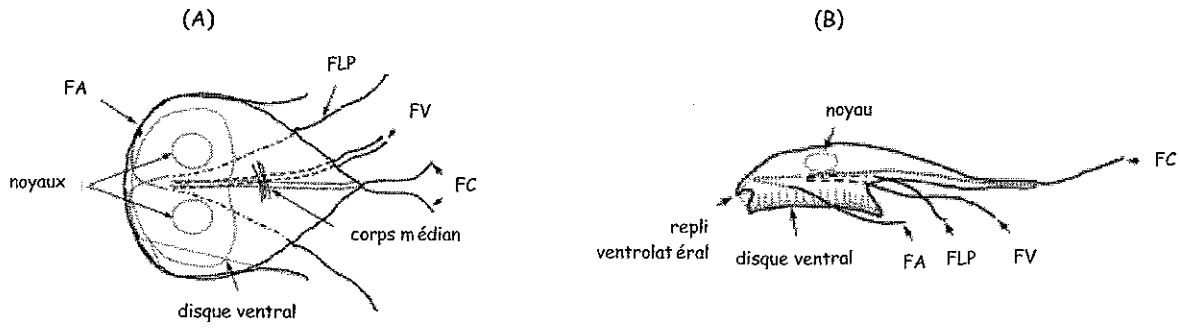


Figure 5 : Représentation schématique d'un trophozoïte de *G. lamblia*. (A) vue dorsale, (B) vue latérale. FA : flagelles antérieurs (x2), FC : flagelles caudaux (x2), FLP : flagelles latéro-postérieurs (x2) et FV : flagelles ventraux (x2) (Elmendorf *et al.*, 2003)

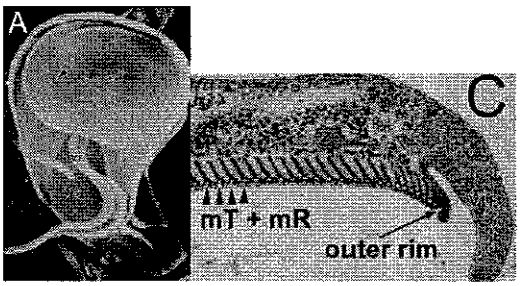
Les corps médians ou corps parabasaux apparaissent en microscopie électronique comme une zone constituée de microtubules relativement peu organisée et située en position postérieure par rapport aux noyaux. Les "cordons" sont deux structures reliant, ventralement et dorsalement, les axonèmes des flagelles caudaux.

Le rôle des corps médians et des "cordons" n'est pas encore bien élucidé. Les "cordons" pourraient intervenir dans les mouvements de la partie caudale des trophozoïtes (Benchimol *et al.*, 2004 ; Elmendorf *et al.*,

2003). Par contre, le rôle des flagelles et du disque ventral au niveau respectivement de la mobilité et de l'adhésion des trophozoïtes a déjà fait l'objet de plusieurs études.

Les flagelles, impliqués dans la mobilité des trophozoïtes, sont répartis en quatre paires : flagelles antérieurs, latéro-postérieurs, caudaux et ventraux. Les axonèmes des flagelles présentent un arrangement de leurs microtubules qui est caractéristique des eucaryotes avec une paire en position centrale et neuf paires situées en périphérie. Ils ont pour origine les corps basaux ou kinétosomes placés en position centrale et légèrement antérieure par rapport aux deux noyaux (Elmendorf *et al.*, 2003). Les axonèmes des huit flagelles sont représentés en pointillés sur la figure **5**.

Le disque ventral ou disque adhésif est un élément hautement caractéristique de ce protozoaire. En effet, dans l'ordre *Diplomonadida*, seul *Giardia* possède cette structure qui recouvre la moitié antérieure de la surface ventrale du trophozoïte. Ce disque est entouré par un repli ventro-latéral formant un canal appelé rainure marginale (figures **5(B)** et **6(B)**). Le disque ventral et le repli ventrolatéral sont impliqués dans l'adhésion des trophozoïtes à la surface de la muqueuse intestinale (Erlandsen *et al.*, 2004). Le disque ventral est constitué de structures parallèles à sa surface appelées microtubules et de structures perpendiculaires à ces dernières, l'ensemble forme une structure hélicoïdale de forme concave (figure **6(A)**). Ces microtubules semblent jouer un rôle esentiel au niveau de l'adhésion des trophozoïtes à la surface des entérocytes (Magne *et al.*, 1991). Seule la partie centrale du disque est dépourvue de ces structures microtubulaires (Adam, 2001 ; Elmendorf *et al.*, 2003 ; Erlandsen *et al.*, 2004).



(A) (B)

Figure 6 : Disque ventral d'un trophozoïte de *Giardia* (A) : vue d'un disque ventral. (B) : coupe d'un disque ventral (mT : microtubules, VLF : repli ventrolatéral) (http://www.tulane.edu//~wiser/protozoology/notes/images/disk.JPG ; juin 2004).

Au cours de ces dix dernières années, les recherches sur le cytosquelette de *Giardia* ont essentiellement porté sur l'identification des protéines. Ainsi, le cytosquelette est constitué d'au moins 35 protéines ayant un rôle dans la stabilité des différentes structures, mais aussi dans l'adhésion et la locomotion des trophozoïtes. Il s'agit de tubulines, centrine (également dénommée caltractine), actine et protéines associées, annexines et giardines, ces dernières étant spécifiques de *Giardia* (Corrêa *et al.*, 2004 ; Elmendorf *et al.*, 2003).

5.4- Le kyste : forme de résistance.

La forme de résistance de *Giardia* est un kyste ovoïde contenant différents éléments : les axonèmes des flagelles, des fragments du disque ventral et des petites vacuoles situées en périphérie (Erlandsen *et al.*, 1989). Le kyste mature contient également quatre noyaux tétraploïdes. Les kystes ont, comme les trophozoïtes, une activité respiratoire, mais ils prélèvent seulement 10 % de l'oxygène utilisé par les trophozoïtes à 37 °C (Lloyd *et al.*, 2002).

La figure **7** présente une observation par microscopie électronique et optique de kystes de *Giardia*. Les noyaux et les axonèmes des flagelles sont visibles.

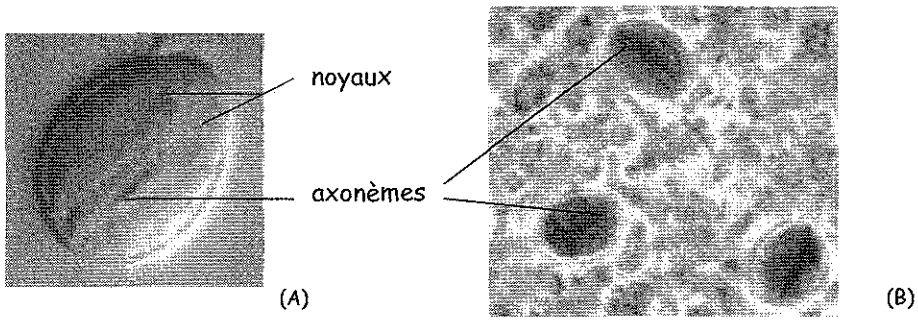


Figure 7 : Observation de kystes de *Giardia* en microscopie électronique (A), en microscopie optique (B) (http://www.ksu.edu/parasitology/625tutorials/Protozoa04.html ; août 2004)

L'observation par microscopie électronique de la paroi du kyste met en évidence deux composantes : une couche externe filamenteuse et une couche interne comprenant deux membranes. La couche externe mesure 0,25 à 0,3 µm d'épaisseur, elle est constituée de filaments de 7 à 20 nm de diamètre. Au niveau de son organisation, des filaments épais sont reliés entre eux par des filaments plus fins et plus courts, l'ensemble formant ainsi un maillage très serré (Erlandsen *et al.*, 1989 ; Erlandsen *et al.*, 1996). Contrairement à ce qui était couramment admis pour l'ensemble des protozoaires, la paroi des kystes de *Giardia* n'est pas constituée de chitine. En effet, des études récentes ont démontré que les filaments de la couche externe sont constitués de 63 % d'hydrates de carbone sous forme d'un polymère de N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc) et 37 % de protéines riches en leucine (Gerwig *et al.*, 2002). Trois protéines de paroi, Cwp 1, 2 et 3 (Cyst wall proteins) ont notamment été identifiées, leur poids moléculaire est respectivement de 26, 39 et 27,3 kDa (Jarroll et Sener, 2003).

Les valeurs de densité et de taille des kystes de *Giardia lamblia* sont présentées dans le tableau **4**.

Tableau 4 : Dimensions et densité des kystes de *G. lamblia* (Medema *et al.*, 1998)

Dimensions	**Longueur**	9,8 à 14,7 µm	moyenne = 12,2 µm
	Largeur	7,8 à 10,8 µm	moyenne = 9,3 µm
Densité		1,01 à 1,08	moyenne = 1,03

L'évaluation de la taille et surtout de la densité est indispensable lors de l'utilisation de techniques de concentration-purification des kystes de *Giardia* à partir d'échantillons environnementaux ou de selles. En effet, ces méthodes sont essentiellement basées sur la taille du micro-organisme (filtration) ou sur sa densité (flottation, sédimentation, gradient).

5.5- Les étapes intermédiaires : le dékystement et l'enkystement.

5.5.1- Le dékystement.

Le dékystement est un processus rapide qui permet le passage de la forme kystique à la forme trophozoïte en 15 à 30 minutes. Les stimuli du dékystement sont bien connus, par contre leurs mécanismes d'action ne sont pas parfaitement élucidés (Svärd *et al.*, 2003).

In vitro, le dékystement est obtenu en mimant les conditions rencontrées par les kystes au niveau du tube digestif de leur hôte. Différentes études ont mis en évidence la nécessité de deux étapes correspondant aux conditions rencontrées successivement par les kystes au niveau de l'estomac et de la partie supérieure de l'intestin grêle. Ainsi, Bingham et Meyer (1979) montrent que l'exposition des kystes de *Giardia* à une solution acide est indispensable au dékystement. Bingham *et al.* (1979) constatent que le pH optimal est de 2 pour des kystes provenant de selles. Les kystes sont ensuite mis en contact avec une solution légèrement alcaline contenant des protéases (trypsine, chymotrypsine) et correspondant aux conditions retrouvées dans l'intestin grêle (Boucher et Gillin, 1990).

Le dékystement est un processus sensible aux stimuli environnementaux qui entraînent des réponses coordonnées au niveau physiologique, structural et moléculaire (Hetsko *et al.*, 1998). Une diminution du pH interne des kystes est ainsi détectée lorsqu'ils sont mis en contact de solutions de pH décroissant. Au niveau structural, la modification la plus importante est le développement de protubérances remplies de cytoplasme dans l'espace péritrophique qui s'élargit. Dix minutes après le début du dékystement, le protozoaire est distinct de la paroi kystique et les premiers excyzoïtes sont libérés après 20 minutes d'incubation Des variations au niveau de la quantité et de la nature des transcripts sont également mises en évidence durant les deux étapes correspondant aux conditions gastrique et intestinale. Ces variations au niveau des ARNm sont nettement plus marquées dans les conditions mimant le passage dans l'intestin grêle. Ainsi, l'ARNm de la protéine de paroi Cwp2 n'est plus détecté lors de cette étape. Par contre d'autres ARNm apparaissent ou augmentent de façon notable pour les mêmes conditions (Hetsko *et al.*, 1998).

Plusieurs protéines, présentes dans le kyste ou synthétisées sous l'impulsion d'un pH acide, interviennent dans le processus de dékystement.

La déphosphorylation des protéines de la paroi des kystes (Cwp) par une phosphatase acide contenue dans les lysosomes serait impliquée dans la première étape du dékystement. Cette enzyme est libérée dans l'espace périplasmique et initie la déphosphorylation des Cwp qui est une étape préliminaire, indispensable à l'action des protéases digestives. Les protéines de paroi sous leur forme phosphorylée seraient en effet résistantes à la protéolyse (Slavin *et al.*, 2002).

La calmoduline intervient également dans le processus de dékystement. Son rôle est mis en évidence en inhibant le dékystement grâce à des molécules antagonistes de cette protéine. De plus, une augmentation de 28 % de l'activité de la calmoduline et sa redistribution au niveau de la paroi, de la membrane cytoplasmique et du

cytoplasme sont observées suite à l'étape de stimulation du dékystement en présence d'acide chlorhydrique (Bernal *et al.*, 1998). La protéine kinase A jouerait un rôle dans la mobilité et la division des trophozoïtes. L'utilisation d'inhibiteurs de cette protéine a montré qu'elle interviendrait également dès le début du processus de dékystement (Abel *et al.*, 2001).

La cellule obtenue immédiatement après le dékystement est de forme ovoïde, possède huit flagelles, quatre noyaux avec une ploïdie de 16N (4 x 4N) et son métabolisme est intermédiaire entre celui du trophozoïte et du kyste. Ce stade dénommé excyzoïte initie l'infection et constitue une étape très brève du cycle de *Giardia*. L'excyzoïte se divise rapidement en deux trophozoïtes contenant deux noyaux avec une ploïdie de 8N (2 x 4N). Après une étape de division nucléaire, chacun de ces trophozoïtes va à son tour se diviser en deux trophozoïtes caractérisés par deux noyaux et une ploïdie de 4N (2 x 2N). Ainsi chaque kyste conduit à la formation de quatre trophozoïtes dans l'intestin grêle de l'hôte (Bernander *et al.*, 2001 ; Svärd *et al.*, 2003).

5.5.2- L'enkystement.

L'enkystement de ce protozoaire intestinal est une étape clé de son cycle parasitaire car elle permet ensuite sa transmission féco-orale vers un nouvel hôte par les voies alimentaire et surtout hydrique. La synthèse d'une paroi est indispensable à la poursuite du cycle parasitaire. Contrairement au dékystement, l'enkystement est un processus lent. Il est en effet constitué d'une première étape réalisée en 10 heures et d'une deuxième étape nécessitant 16 heures (Adam, 2001).

La première expérimentation d'enkystement *in vitro* a été réalisée par Gillin *et al.* (1987). L'ajout de forte quantité de sels biliaires après culture dans un milieu légèrement alcalin (pH 7,8) initiant l'enkystement, les sels biliaires sont alors considérés comme étant le stimulus principal de ce phénomène. Toutefois, la production *in vitro* de kystes en absence de sels biliaires a ensuite réfuté leur action directe dans le processus d'enkystement. Ce serait la combinaison d'un excès de sels biliaires sous forme de micelles couplé à un déficit en cholestérol qui induirait la stimulation de l'enkystement par inhibition de l'absorption du cholestérol exogène indispensable à la biogénèse de la membrane des trophozoïtes. L'atteinte d'un seuil critique en cholestérol entraînerait une activation de la transcription de gènes impliqués dans le processus d'enkystement (Lujan *et al.*, 1998).

L'enkystement peut être divisé en deux étapes. La première phase correspond à des modifications au niveau de la division cellulaire, du métabolisme, de l'ultrastructure, du transport de protéine et de l'expression des gènes. Les trophozoïtes s'arrondissent rapidement et le disque ventral est fragmenté (Svärd *et al.*, 2003). Après 10 heures d'enkystement, les trophozoïtes n'utilisent plus le glucose exogène, la consommation d'oxygène diminue également fortement (Jarroll *et al.*, 2001). A cet instant, l'appareil de Golgi devient visible, ainsi que des vésicules spécifiques de l'enkystement (ESV) qui jouent un rôle de transport et de différenciation des protéines et des hydrates de carbone constituant la paroi kystique et dont la synthèse est activée lors de cette étape (Svärd *et al.*, 2003). Ainsi, les transcrits des protéines de paroi Cwp1 et Cwp2 sont mis en évidence après 90 minutes de contact avec un milieu favorisant l'enkystement (Lujan *et al.*, 1998). L'activité des enzymes

intervenant dans la synthèse de la N-acétyl-D-galactosamine augmente également de façon significative lors de l'enkystement (Jarroll *et al.*, 2001). La synthèse de protéines, intervenant notamment dans la maturation de la protéine Cwp2 ou dans l'assemblage des protéines au niveau de la paroi, est également induite lors de cette étape (Touz *et al.*, 2002a et b).

Lors de la deuxième phase de l'enkystement, les modifications se produisent essentiellement au niveau des noyaux. Quatre heures après le début de son induction, la majorité des cellules ont une ploïdie de 8N. Cette observation est concordante avec le blocage de la division cellulaire lors de cette étape et suggère que l'enkystement débuterait à partir du stade G2 pendant lequel les trophozoïtes contiennent deux noyaux tétraploïdes. 24 heures après le début de l'induction et suite à une division nucléaire suivie d'une nouvelle réplication de l'ADN, la plupart des kystes observés sont matures et contiennent quatre noyaux tétraploïdes (Bernander *et al.*, 2001).

5.6- Techniques de multiplication de Giardia en laboratoire.

Les différentes étapes du cycle de vie de *Giardia* peuvent être reproduites en laboratoire pour le maintien de stock ou pour l'obtention d'un grand nombre de kystes ou de trophozoïtes nécessaires notamment lors de l'analyse du génome de ce protozoaire. La multiplication de *Giardia* en laboratoire peut être obtenue *in vivo* par contamination d'un animal ou *in vitro* en utilisant un milieu de culture favorable à la multiplication des trophozoïtes.

5.6.1- Multiplication in vivo.

La multiplication *in vivo* est réalisée soit sur la gerbille ou le souriceau nouveau-né pour l'espèce *Giardia lamblia*, soit sur la souris pour l'espèce *Giardia muris*. La contamination de l'animal est réalisée par administration *per os* de kystes purifiés à partir de selles. Les trophozoïtes sont ensuite récupérés après le sacrifice de l'animal. Plusieurs passages sur l'animal peuvent être réalisés dans le cas où le nombre de trophozoïtes est insuffisant. Les trophozoïtes peuvent ensuite être mis en culture *in vitro* (Mayrhofer *et al.*, 1992). Cette technique est notamment utilisée par les équipes qui réalisent le génotypage de *Giardia* par électrophorèse d'alloenzymes à partir de trophozoïtes (Andrews *et al.*, 1992 ; Mayrhofer *et al.*, 1995).

5.6.2- Multiplication in vitro.

Actuellement, le milieu de culture le plus fréquemment utilisé pour les trophozoïtes de *Giardia* est le milieu TYI-S-33 modifié. Initialement le milieu TYI-S-33 avait été développé pour la culture d'*Entamoeba histolytica* (Keister, 1983). Le milieu TYI-S-33 modifié est supplémenté avec de la bile à une concentration de 0,5 à 1mg.mL^{-1} (Keister, 1983). Des antibiotiques peuvent également être ajoutés à ce milieu, il s'agit de la gentamicine (50 µg.mL^{-1}), pénicilline (1000 µg.mL^{-1}), ticarcilline (1000 µg.mL^{-1}) et amphotéricine B (2 µg.mL^{-1}). Ces antibiotiques n'entraînent pas de diminution de la vitesse de multiplication des trophozoïtes (Nash et Keister, 1985)

La vitesse de multiplication de *Giardia lamblia* dans le milieu TYI-S-33 modifié varie suivant le génotype. Ainsi, les assemblages A-I, A-II et B sont considérés comme ayant respectivement une croissance rapide, intermédiaire et lente dans ce milieu. La phase de croissance logarithmique est évaluée à 60 à 70 heures pour l'assemblage A-I, alors qu'elle est supérieure à 100 heures pour l'assemblage B. Ainsi, la culture *in vitro* de *Giardia*

favoriserait l'assemblage A et plus particulièrement A-I par rapport à l'assemblage B. Cette différence de vitesse de croissance est certainement due à une déficience de ce milieu pour la multiplication de l'ensemble des génotypes de *Giardia lamblia* et des autres espèces de *Giardia*. En effet, *Giardia muris* est une espèce réfractaire à la multiplication dans ce milieu (Karanis et Ey, 1998).

Andrews *et al.* (1992) constatent des différences au niveau des résultats de l'électrophorèse allozymique pour un même prélèvement multiplié *in vitro* ou *in vivo*. Ces différences pourraient être dues à une régulation de l'expression des gènes durant l'adaptation aux conditions de culture, mais elles seraient plus certainement provoquées par une sélection génétique des différents micro-organismes présents dans l'échantillon. Un même prélèvement de selles peut contenir plusieurs isolats (Butcher *et al.*, 1994) et ces techniques pourraient être responsables d'une sélection des génotypes présents (Andrews *et al.*, 1992 et Mayrhofer *et al.*, 1992). L'utilisation de ces techniques peut donc entraîner un biais au niveau de la fréquence et de la diversité des génotypes détectés (Karanis et Ey, 1998).

6- Giardia chez son hôte.

Ce parasite est responsable chez son hôte de la giardiose, pathologie également dénommée giardiase ou lambliase. Les voyages en zones tropicales, subtropicales ou présentant des conditions d'hygiène insuffisantes, les structures de garde collectives pour enfants (crèches et halte-garderies) constituent des facteurs de risque plus marqués pour cette parasitose (Gardner et Hill, 2001 ; Vesy et Peterson, 1999). Le traitement de cette parasitose ainsi que sa prévention notamment par l'immunoprophylaxie sont regroupés dans le paragraphe 10 qui présente les différentes possibilités de rupture du cycle parasitaire de *Giardia*.

6.1- DMI et pouvoir pathogène.

La première évaluation de la DMI (Dose Minimale Infectieuse) chez l'Homme est réalisée en 1954 sur des prisonniers volontaires. Cette étude montre que des inoculats contenant 10 à 25 kystes de *Giardia lamblia* entraînent une giardiose dans 36,4 % des cas et que l'ingestion de 100 kystes provoque une infection dans la totalité des cas. L'ingestion d'un seul kyste ne présente aucun risque de contamination (Rendtorff, 1954). Ainsi la DMI de *G. lamblia* est faible puisqu'elle est comprise entre 10 et 100 kystes. Cette faible valeur peut être notamment expliquée par la libération de quatre trophozoïtes par kyste (Bernander *et al.*, 2001). La figure **8** correspond à une observation par microscopie électronique d'une muqueuse intestinale recouverte par des trophozoïtes de *Giardia*.

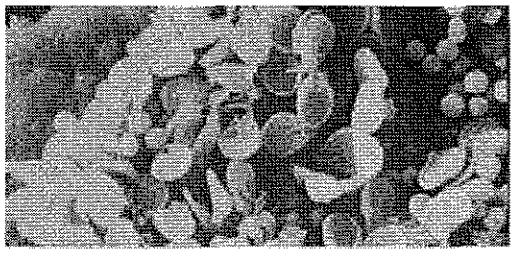


Figure 8 : Observation en microscopie électronique de trophozoïtes de *Giardia* recouvrant la muqueuse intestinale de leur hôte (http://cal.nbc.upenn.edu/merial/Introduction/intro_2.htm ; août 2004)

Les trophozoïtes se placent généralement à proximité de la surface apicale des entérocytes. Ce protozoaire n'est pas un micro-organisme invasif, il n'est que très rarement observé à l'intérieur de la muqueuse intestinale (Farthing, 1996). La pathogénicité de *Giardia* n'est pas complètement élucidée. Plusieurs hypothèses incluent une altération des microvillosités des entérocytes associée à une hyperplasie des cryptes de la paroi intestinale, l'induction d'une réponse immunitaire provoquant une sécrétion liquidienne et une atteinte de la paroi intestinale. De plus, l'altération de la flore duodénale et la modification de la composition de la bile pourraient contribuer au déclenchement d'une diarrhée (Ali et Hill, 2003 ; Faubert, 2000).

6.2- Signes cliniques.

Les symptômes de la giardiose apparaissent habituellement une à trois semaines après l'ingestion de kystes viables (Gardner et Hill, 2001). La majorité des giardioses seraient asymptomatiques, dans les autres cas le tableau clinique est constitué de très nombreux signes relativement peu caractéristiques tels que selles pâteuses, diarrhées, malaises, crampes abdominales, météorisme, ballonnement, malabsorption des graisses. D'autres symptômes couramment observés sont une anorexie et une perte de poids (Gardner et Hill, 2001 ; Hoque *et al.*, 2002). En l'absence de traitement la giardiose évolue soit vers une résolution spontanée, soit vers un passage à la chronicité caractérisée par une aggravation des symptômes digestifs (Gardner et Hill, 2001 ; Vesy et Peterson, 1999). Chez l'adulte, Rendtorff (1954) observe une résolution spontanée dans 86 % des cas.

Lors d'une étude réalisée en Espagne, seuls 13,9 % des enfants de moins de 4 ans porteurs de *Giardia*, présentaient des symptômes gastro-intestinaux constitués essentiellement par des douleurs abdominales et des diarrhées (Rodriguez-Hernandez *et al.*, 1996). Aucun enfant porteur de *Giardia* ne présentait de diarrhée chronique et aucune différence significative de poids et de taille n'a été mise en évidence entre les enfants porteurs et non porteurs de *Giardia* dans une crèche de région parisienne (Dupouy-Camet *et al.*, 1990). Traub *et al.* (2004) observent des signes diarrhéiques associés à la giardiose uniquement chez des enfants âgés de moins de 10 ans et ces symptômes ne sont retrouvés que chez 10 % de ces individus.

Certains auteurs tentent de relier la pathogénicité au génotype. Ainsi, lors d'une étude concernant 18 personnes, une corrélation a été mise en évidence entre le génotype et la sévérité des signes diarrhéiques, une diarrhée persistante étant associée au génotype B (Homan et Mank, 2001). Par contre lors du génotypage de kystes isolés chez des enfants, Read *et al.* (2002) ont montré une fréquence plus importante de diarrhées chez les porteurs de l'assemblage A que chez ceux excrétant l'assemblage B. Le faible nombres d'études prenant en compte ces deux critères ne permet pas de conclure actuellement à une différence de sévérité des symptômes suivant le génotype.

6.3- Réponse immunitaire.

Le statut immunitaire de l'hôte influence sa susceptibilité à l'infection et la sévérité des signes cliniques. Le risque d'infection sévère ou chronique est plus élevé chez personnes immunodéprimées. Par contre, les personnes immunocompétentes vivant en zone endémique pour *Giardia* présentent parfois une moins grande sensibilité à l'infection, ce qui suggère la possibilité d'une immunité contre ce protozoaire (Olson *et al.*, 2000).

La réaction immunitaire vis-à-vis de *Giardia* fait intervenir les médiations humorale et cellulaire. Les lymphocytes T-CD4 et la sécrétion d'immunoglobulines de type A au niveau de la muqueuse intestinale semblent

jouer un rôle majeur dans l'élimination des trophozoïtes (Eckman, 2003 ; Faubert, 2000). D'autres éléments notamment la synthèse de protéines par les polynucléaires neutrophiles et l'excrétion d'oxyde nitrique (NO) pourraient également intervenir dans l'élimination des trophozoïtes (Eckmann, 2003).

L'évaluation des mécanismes intervenant dans la réponse immunitaire vis-à-vis de *Giardia* basée sur l'utilisation de modèle murin rend délicate leur transposition à l'homme. Des expérimentations ont également été conduites *in vitro*, mais elles ont été réalisées avec un milieu de culture favorable aux cellules lymphoïdes et non aux trophozoïtes (Faubert, 2000).

Dans certaines communautés, un taux élevé de réinfestation a été observé, ce phénomène pourrait notamment être expliqué par des variations d'expression des variants spécifiques des protéines de surface (VSP) qui représentent une fraction majeure des protéines de la surface des trophozoïtes. Ces variations d'expression sont détectées pendant et après le dékystement. Ainsi, l'expression de la TSA 417 qui est largement prédominante chez les kystes, diminue très fortement lors de la deuxième étape du dékystement alors que l'expression de nouvelles VSP est induite (Svärd *et al.*, 1998).

6.4- Diagnostic.

Plusieurs techniques permettent de diagnostiquer une giardiose à partir d'échantillons de selles fraîches ou fixées au formaldéhyde.

La méthode kyste et trophozoïtes nommée "Ova and Parasite" qui permet la mise en évidence de kystes ou de trophozoïtes par examen microscopique des selles, est traditionnellement utilisée (Aziz *et al.*, 2001 ; Gardner et Hill, 2001).

La description de cette technique classique ainsi que des techniques immunologiques ou de biologie moléculaire appliquées à l'analyse des prélèvements biologiques et des échantillons environnementaux sont présentées dans les paragraphes 7.3 et 8 qui concernent respectivement les techniques conventionnelles et basées sur le génome pour la détection des kystes de *Giardia*.

7- Détection, quantification et évaluation de la viabilité des kystes de Giardia.

Ce paragraphe décrit les techniques de concentration et de purification des kystes de *Giardia* à partir de selles et d'échantillons environnementaux, ainsi que les méthodes conventionnelles de détection et d'estimation de la viabilité. Les techniques standardisées pour la recherche et le dénombrement des kystes de *Giardia* dans les eaux sont également présentées dans ce paragraphe. Les techniques de biologie moléculaire permettant le génotypage, la détection et la quantification des kystes de *Giardia* seront abordées lors du paragraphe suivant.

7.1- Techniques de concentration des kystes.

7.1.1- Concentration des kystes à partir d'eaux.

Si le développement de techniques de détection sensibles et rapides est actuellement un des axes de recherche majeur, l'optimisation de l'étape de concentration ne doit pas être négligée afin de permettre notamment l'analyse de grands volumes d'eau contenant de faibles concentrations en parasites. La filtration, la

floculation et la centrifugation en flux continu sont trois méthodes envisageables pour la concentration des kystes de *Giardia* présents dans ces eaux.

La centrifugation en flux continu est la seule méthode de concentration ne faisant pas intervenir directement la taille des kystes, cette technique est testée pour la concentration des kystes de *Giardia* par Goatcher *et al.* (1995). Une forte diminution du rendement de récupération lorsque le débit est supérieur à 0,5 $L.min^{-1}$, ainsi que la nécessité d'étapes de concentration supplémentaires constituent les inconvénients majeurs de cette technique. Bien que les modifications proposées par Zuckerman *et al.* (1999) permettent d'augmenter le débit en obtenant un rendement de récupération élevé (87,7 %) dans les eaux potables et les eaux de rivière (tableaux **5** et **6**), aucune publication n'a fait suite à cette étude.

La filtration et la floculation sont les techniques majoritairement utilisées pour la concentration des kystes contenus dans les eaux et sont basées sur la taille des éléments à concentrer.

Initialement, la floculation est une technique développée pour la concentration des oocystes de *Cryptosporidium parvum.* Au cours des techniques de floculation, les kystes sont retenus par le maillage d'un floculat constitué généralement par des particules de carbonate de calcium qui sédimentent rapidement. Le surnageant est éliminé puis le floculat de carbonate de calcium est dissous par ajout d'acide sulfamique (Vesey *et al.*, 1993). Cette technique a ensuite été proposée pour la détection simultanée des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium.* La floculation au carbonate de calcium permet d'obtenir des rendements de récupération compris entre 46 % (Zuckerman *et al.*, 1999) et 77 % (Shepherd et Wyn-Jones, 1996) lors de l'analyse d'eau potable dopée en kystes. Pour des prélèvements d'eau de rivière, les rendements s'échelonnent entre 43 % (Zuckerman *et al.*, 1999) et 77 % (Shepherd et Wyn-Jones, 1996). Ainsi, cette technique semble robuste et performante au vu des rendements de récupération observés sur différents types d'eaux (tableaux **5** et **6**). Toutefois, le temps d'expérimentation de cette méthode est relativement long puisque la sédimentation du floculat nécessite au minimum quatre heures. De plus, cette technique aurait également un effet délétère sur la viabilité des oocystes de *Cryptosporidium* certainement dû à une exposition prolongée à un pH basique (pH 10) (Campbell *et al.*, 1994).

Tableau 5 : Rendement des techniques de concentration des kystes à partir d'eau très faiblement chargée

Technique	Type d'échantillon			Rendement	Références
	Nature	Volume	Kystes.L^{-1}		
Centrifugation en flux continu					
	Eau potable	45 L	$1{,}1.10^4$	m = 87,7 ± 4,7 % (n = 3)	Zuckerman *et al.* (1999)
Floculation au carbonate de calcium					
	Eau potable	10 L	85	64,7 à 77,1 % (n = 8) m = 77,1 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
		10 L	138 ± 11	m = 63,7 % (n = 23)	Matheson *et al.* (1998)
		45 L	$1{,}1.10^4$	m = 46,0 ± 10,2 % (n = 3)	Zuckerman *et al.* (1999)
Filtration sur membrane					
Acétate de cellulose					
p :1,2 µm	Eau potable	10 L	85	30,6 à 63,5 % (n = 5) m = 51,3 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
	Eau désionisée		1.10^5	36,7 à 96,6 % (n = 5) m = 63,1 ± 20,5 %	McCuin *et al.* (2000)
			10	m = 65,4 ± 2,8 % (n = 5)	
	Eau distillée	10 L	10	m = 35,2 ± 1,4 % (n = 5)	Wohlsen *et al.* (2004)
Acrylique					
p :1,2 µm p :3,0 µm	Eau potable	10 L	85	22,4 à 51,2 % ; m = 36,7 % 38,8 à 49,4 % ; m = 42,6 % (n = 5)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
Nitrate de cellulose					
p :3,0 µm	Eau potable	10 L	85	56,5 à 77,6 % (n =5) m = 66,8 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
p : 1,2 µm	Eau distillée	18 L	10^2, 10^3, 5.10^3	61,1 à 105,9 % (n = 14) m = 78,7 %	Falk *et al.* (1998)
Nitrate et acétate de cellulose					
p : 3,0 µm	Eau distillée	10 L	10	m = 24,2 ± 1,1 % (n = 10)	Wohlsen *et al.* (2004)
Polycarbonate					
p : 2,0 µm	Eau potable	10 L	85	35,3 à 67,1 % (n = 5) m = 48,5 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
Filtration en continu, 2 membranes p : 10 et 3 µm		20 L	3	59,4 ± 10,4 % (n = 3) à 93,4 ± 6,1 % (n = 3)	Oda *et al.* (2000)
Polyéthersulfone					
p : 0,8 µm	Eau potable	10 L	85	42,4 à 48,2 % ; m = 45,1 % (n = 3)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
Filtration sur cartouche					
Cartouche en polypropylène					
p : 15 µm	Eau potable	100 L	85	11,8 à 23,2 % (n = 5) m = 17,1 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
p : 1 µm		45 L	$1{,}1.10^4$	m = 11,6 ± 3,8 % (n = 3)	Zuckerman *et al.* (1999)
Cartouche en polyéthersulfone					
Type Envirochek, p : 1 µm	Eau potable	10 L	138 ± 11	m = 83,5 % (n = 23)	Matheson *et al.* (1998)
Type Envirochek, p : 1 µm Sans rétrolavage Avec 5 rétrolavages	Eau distillée	10 L	10	 m = 4 ± 1,5 % (n = 5) m = 32,8 ± 10,3 % (n = 5)	Wohlsen *et al.* (2004)
Type Envirochek-HV, p : 1 µm Sans rétrolavage Avec 5 rétrolavages		10 L	10	 m = 28 ± 4,6 % (n = 5) m = 59 ± 5,1 % (n = 5)	
Mousse compressée					
p : 1 µm	Eau distillée	10 L	10	m = 49,8 ± 5,4 % (n = 5)	Wohlsen *et al.* (2004)

p : porosité / m : moyenne

Tableau 6 : Rendement des techniques de concentration des kystes de *Giardia* à partir d'eaux de turbidité variable

Technique	Type d'échantillon			Rendement	Références
	Nature	Volume	Kystes.L^{-1}		
Centrifugation en flux continu					
	Eau de rivière	45 L	1,1.10^4	56,7 ± 16,0 % (n = 3)	Zuckerman *et al.* (1999)
Floculation au carbonate de calcium					
	Eau de rivière	10 L	85	68,2 à 77,6 % (n = 6) m = 72,5 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
	Eau de source	10 L	138 ± 11	m = 61,9 % (n = 20)	Matheson *et al.* (1998)
	Eau de rivière	45 L	1,1.10^4	m = 43,4 ± 4,0 % (n = 3)	Zuckerman *et al.* (1999)
Filtration sur membrane					
Acétate de cellulose					
p :1,2 µm	Eau de rivière	10 L	85	36,5 à 62,4 % (n = 5) m = 50,1 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
	Eau de rivière		10	m = 8,2 ± 3,4 % (n = 5)	Wohlsen *et al.* (2004)
Acrylique					
p :1,2 µm p :3,0 µm	Eau de rivière	10 L	85	41,2 à 51,8 % ; m = 46,1 % 36,5 à 48,2 % ; m = 41,9 % (n = 5)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
Polyéthersulfone					
p : 0,8 µm	Eau de rivière	10 L	85	38,8 à 43,5 % ; m = 41,2 % (n = 3)	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
Nitrate de cellulose					
p :3,0 µm	Eau de rivière	10 L	85	47,1 à 60,0 % (n =5) m = 52,7 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
Polycarbonate					
p : 2,0 µm	Eau de rivière	10 L	85	45,9 à 50,6 % (n = 5) m = 48,2 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
Filtration sur cartouche					
Cartouche en polypropylène					
p : 15 µm	Eau de rivière	100 L	85	9,8 à 20,4 % (n = 5) m = 16,3 %	Shepherd et Wyn-Jones (1996)
p : 1 µm	Eau de rivière	45 L	1,1.10^4	m = 8,2 ± 2,8 % (n = 3)	Zuckerman *et al.* (1999)
Cartouche en polyéthersulfone					
Type Envirochek, p : 1 µm	Eau de source	10 L	138 ± 11	m = 74.9 % (n = 20)	Matheson *et al.* (1998)
Type Envirochek-HV, p : 1 µm	Eau de surface 11 NTU 20 NTU 36 NTU 99 NTU	10 L	10	 m = 53 ± 0,06 % (n = 3) m = 46 ± 0,03 % (n = 3) m = 2,6 ± 0,01 % (n = 3) m = 0,5 ± 0,0025 % (n = 3)	DiGiorgio *et al.* (2002)
p : 1 µm, Type Envirochek-HV Avec 5 rétrolavages	Eau de rivière	10 L	10	m = 37,4 ± 3,8 % (n = 8)	Wohlsen *et al.* (2004)
Mousse compressée					
p : 1 µm	Eau de rivière	10 L	10	m = 23,8 ± 3,5 % (n = 8)	Wohlsen *et al.* (2004)

p : porosité / m : moyenne / NTU : Unité Néphélométrique de Turbidité

La concentration des kystes par filtration est réalisée sur membrane ou sur cartouche. Lorsque la filtration est effectuée sur une membrane, les kystes sont récupérés par lavage ou par raclage. Quel que soit le type de membrane utilisé, les rendements sont compris entre 22,4 % et 77,6 % pour les eaux potables (tableau **5**). La filtration en continu sur deux membranes en polycarbonate de porosité décroissante permet d'atteindre des rendements supérieurs à 90 %, toutefois aucune publication n'a fait suite à cette étude. Les membranes en acétate ou en nitrate de cellulose permettent d'atteindre des rendements supérieurs à 50 % voire 60 % dans l'eau potable. Après filtration sur une membrane en acétate de cellulose, les kystes peuvent être récupérés par dissolution de la membrane dans de l'acétone ce qui permet d'augmenter le rendement de récupération (McCuin *et*

al., 2000). Dans les eaux plus chargées (tableau **6**), le rendement reste proche de 50 % d'après Shepherd et Wyn-Jones (1996). Toutefois, des rendements beaucoup plus faibles (8,2 %) peuvent être observés suite au colmatage de la membrane par des débris (Wohlsen *et al.*, 2004).

La deuxième catégorie de systèmes de filtration utilise une cartouche comme support pour la surface filtrante. L'utilisation de cartouche présente l'avantage majeur d'augmenter la surface de filtration et ainsi le volume analysé. L'élution est alors réalisée par lavage avec une solution détergente. Les surfaces filtrantes en polyéthersulfone permettent d'obtenir des rendements plus élevés que celles en polypropylène pour les eaux potables et les eaux de rivière. Toutefois, les rendements restent très variables suivant les études (tableaux **5** et **6**). Ainsi, pour des eaux très faiblement chargées, les rendements sont compris entre 4 % et 83,5 %. Lors de l'analyse d'eau de rivière dopée avec de faibles concentrations de kystes, plus proches des concentrations attendues dans ce type d'échantillons, Wohlsen *et al.* (2004) récupèrent 37,4 % des kystes. Comme dans le cas des membranes, le colmatage de la surface filtrante lors de l'analyse d'eaux chargées en débris et donc l'analyse de volumes insuffisants, limite les possibilités d'utilisation de ces techniques pour la détection des kystes de *Giardia* dans les échantillons environnementaux.

Bien que ces systèmes de filtration présentent des rendements assez variables suivant les eaux analysées, les méthodes de référence (AFNOR, 2001 ; US-EPA, 2001) recommandent l'utilisation de cartouches de filtration en polyéthersulfone de porosité 1 µm (type Envirochek®) pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* dans les eaux de faible turbidité. Les cartouches contenant une mousse compressée de porosité équivalente à 1 µm répondent également aux exigences de rendement de ces normes (McCuin et Clancy, 2003).

L'étape de concentration des kystes de *Giardia* présents dans les eaux usées brutes est essentiellement réalisée par floculation au carbonate de calcium et surtout par centrifugation. La filtration sur cartouche pose en effet le problème d'un colmatage rapide de la surface filtrante par les débris ce qui entraîne l'analyse d'un volume d'eau insuffisant (Robertson *et al.*, 2000).

7.1.2- Concentration des kystes à partir d'aliments.

Les épidémies d'origine alimentaire mettant en cause *Giardia* et la consommation croissante de fruits et légumes crus ou insuffisamment cuits, justifie la recherche des kystes sur ces aliments. Suite à une étape d'élution réalisée dans des bacs en présence de détergents, la concentration des kystes est réalisée par centrifugation. Les rendements de récupération varient suivant les aliments utilisés, mais peuvent atteindre 67 % sur des laitues ou des fraises (Robertson et Gjerde, 2000).

7.2- Techniques de purification des kystes.

7.2.1- La purification par cytométrie en flux.

La cytométrie en flux permet de déterminer la taille, le contenu cellulaire et/ou l'intensité de fluorescence d'une cellule ou d'une particule exposée à un laser. Les mesures de la diffraction de la lumière dans l'axe et à 90° permettent de déterminer respectivement la taille et les caractéristiques internes de la particule

(Vesey *et al.*, 1994b). L'autofluorescence ou la fluorescence après marquage sont mesurées grâce à un système optique composé de filtres, miroirs dichroïques et photomultiplicateurs.

Le tri par cytométrie en flux permet la capture des micro-organismes recherchés suite à leur identification à partir de leur taille relative, de leur complexité interne et d'un marquage par immunofluorescence. Afin de tenir compte de l'hétérogénéité des deux paramètres de discrimination que sont la morphologie et la fluorescence, la reconnaissance des micro-organismes se fait suivant leur appartenance à un intervalle défini pour chacun de ces critères. Ces deux intervalles définissent la fenêtre de tri.

L'eau ou les sédiments contiennent jusqu'à 10^{11} particules par mL, de taille suffisante pour permettre leur détection par cytométrie en flux. Le problème majeur lors de l'analyse d'échantillons environnementaux est le colmatage de la canule (Vesey *et al.*, 1994b). Le tri par cytométrie en flux permettrait d'analyser de plus grands volumes d'eaux par microscopie, de retenir les kystes fixés à des particules environnementales et surtout d'éliminer de plus grandes quantités de débris que les techniques basées sur la densité (Vesey *et al.*, 1994a). Vesey *et al.* (1997) montrent que le choix du fluorochrome couplé à l'anticorps affecte la capacité du cytomètre à distinguer les micro-organismes marqués, des particules autofluorescentes. Ainsi le FITC serait plus adapté au tri à partir d'eau de surface non traitée, alors que le CY3, le PE et le TRITC seraient préférables pour la purification à partir d'eau potable.

Ferrari et Veal (2003) montrent que l'association d'un anticorps marqué au PE et d'une sonde associée au FITC augmentent la sensibilité de façon notable par l'utilisation de deux cibles distinctes constituées respectivement par la paroi des kystes et l'ARNr. Toutefois cette technique ne permet pas d'éviter la détection de faux positifs et une étape préalable de purification par séparation immunomagnétique reste nécessaire. La complexité de mise en oeuvre de cette technique, son manque de spécificité et son coût limitent actuellement le développement de la purification par cytométrie en flux.

7.2.2- La purification des kystes par les méthodes diphasiques.

Les méthodes diphasiques utilisent deux phases non miscibles, l'une hydrophile et l'autre hydrophobe. Les techniques de Telemann-Rivas, Ritchie, Bailenger et surtout la technique MIF sont essentiellement utilisées pour la concentration-purification des kystes à partir de selles.

Pour la méthode de Telemann-Rivas, l'échantillon est trituré en présence d'acide acétique (5 %), tamisé et 5 mL de filtrat sont mélangés avec 5 mL d'éther sulfurique. Le culot est analysé après centrifugation. Les méthodes de Ritchie, Bailenger et la technique MIF utilisent un protocole identique à la méthode de Telemann-Rivas avec des variations au niveau de l'étape précédent la séparation diphasique en présence d'éther. Ainsi pour la méthode de Ritchie, l'échantillon est trituré en présence de formaldéhyde (10 %). Dans le cas de la méthode de Bailenger, l'échantillon est dilué dans une solution d'acétate de sodium cristallisé et d'acide acétique et le pH final est ajusté à 5 par de l'acide acétique. La technique MIF utilise une solution de merthiolate-iode-formaldéhyde avant la centrifugation en présence d'éther.

La séparation sur Formaldéhyde-acétate d'éthyle (FEA) est également une technique diphasique utilisée en coprologie parasitaire, la phase hydrophobe est alors constituée par de l'acétate d'éthyle (Weber *et al.*, 1992 ; Zimmerman et Needham, 1995).

Ces techniques diphasiques et notamment la méthode FEA peuvent être envisagées pour la purification des kystes à partir de certaines matrices environnementales, notamment les boues primaires et les eaux usées.

7.2.3- La purification par séparation immunomagnétique : IMS.

La séparation immunomagnétique est actuellement la méthode de référence pour la purification (ou la re-concentration) des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* dans les eaux de faible turbidité. En effet, cette technique est recommandée par la méthode 1623 de l'US-EPA (2001), mais aussi par la norme française NF T90- 455 (AFNOR, 2001).

7.2.3.1- Principe de l'IMS.

La technique de séparation immunomagnétique est basée sur l'utilisation de billes magnétiques couplées à un anticorps spécifique de la paroi des kystes. Une première étape de capture des kystes contenus dans la suspension à analyser est réalisée avec les billes magnétiques associées à un anticorps. Un aimant est ensuite utilisé pour séparer les complexes billes-anticorps-kystes de la suspension contenant les particules non retenues. Les kystes sont enfin dissociés des billes en diminuant le pH par ajout d'acide chlorhydrique.

7.2.3.2- Influence de la matrice sur l'efficacité de l'IMS.

Bien que l'IMS soit la méthode de purification des kystes recommandée par les normes récentes, peu d'études portent sur l'évaluation de cette technique. Le tableau **7** présente les résultats de travaux récents réalisés dans l'eau désionisée, mais surtout dans des milieux très chargés en débris et provenant de la concentration d'eau de surface.

↳ Dans l'eau désionisée

Lors de l'évaluation des rendements de récupération des kystes de *Giardia* dans l'eau désionisée, les valeurs sont comprises entre 69,2 ± 4,6 % (McCuin *et al.*, 2001) et 82,6 ± 12,2 % (Hsu *et al.*, 2001c). Toutefois, les valeurs de rendement les plus élevées sont obtenues avec des concentrations initiales nettement supérieures à ce qui est couramment observé pour des échantillons environnementaux.

↳ Dans les concentrats d'eau de surface

Cette technique se révèle tout aussi satisfaisante avec des concentrats d'eaux de surface puisque les rendements les plus faibles observés par Mc Cuin *et al.* (2001) sont compris entre 55,9 ± 4,6% (n = 3) pour une turbidité de 50 NTU et 59,9 ± 7,4 % (n = 3) pour une turbidité de 5 000 NTU. Pour cette même gamme de turbidité, les rendements les plus élevés atteignent des valeurs très proches voire supérieures à 80 %. Hsu *et al.* (2001c) obtiennent des résultats cohérents avec ces valeurs puisqu'ils observent un rendement de 70,6 ± 8,2 % (n = 3) pour une turbidité de 5 000 NTU, mais avec une concentration en kystes beaucoup plus importante. De plus, lors de ces expérimentations, les variations des rendements restent satisfaisantes puisque les valeurs des écart-types sont généralement inférieures à 10 %. La turbidité élevée des concentrats d'eaux de surface ne semble pas influencer les performances de la séparation immunomagnétique. Pour le kit IMS GC-Combo, qui est le plus fréquemment utilisé dans les expérimentations récentes, un volume de culot maximal de 0,5 mL est conseillé pour obtenir un rendement satisfaisant. Toutefois, pour des échantillons de turbidité équivalente (5000 NTU),

McCuin *et al.* (2001) constatent que les rendements de récupération ne diminuent pas avec l'augmentation du volume de culot. En effet, l'échantillon contenant le culot le plus volumineux (0,8 mL) permet d'obtenir les rendements de récupération les plus élevés. Les rendements les plus faibles sont observés pour l'échantillon caractérisé par un volume de culot nettement inférieur aux recommandations (0,2 mL), mais contenant une quantité importante d'argile et de vase. Ces résultats montrent que la composition de l'échantillon peut également influencer l'efficacité de l'IMS (McCuin *et al.*, 2001).

Tableau 7 : Rendement de récupération de la séparation immunomagnétique dans diverses matrices

Turbidité (NTU)	Concentration en kystes	Protocole de concentration	Technique de détection	Pourcentage de récupération	Références
Eau désionisée					
0	1 000 kystes.mL^{-1}	aucun	IFA	82,6 ± 12,2 % (n = 6)	Hsu *et al.* (2001c)
NR	≈ 30 kystes.mL^{-1}		IFA	74,0 ± 6,7 % (n = 3)	Yakub et Stadterman-Knauer (2000)
NR	9 à 12 kystes.mL^{-1}		IFA	69,2 ± 4,6 % (n = 3)	McCuin *et al.* (2001)
NR	22 à 24 kystes.mL^{-1}		IFA	89,0 ± 4,7 % (n = 3)	Hu *et al.* (2004)
Concentrats d'eaux de surface					
5000	1000 kystes.mL^{-1}	Concentrat obtenu par filtration sur cartouche et élution avec un tampon PBS contenant des détergents	IFA	70,6 ± 8,2 % (n = 3)	Hsu *et al.* (2001c)
	9 à 12 kystes.mL^{-1}		IFA	59,9 ± 7,4 % (n = 3) à 80,0 ± 2,1 % (n = 3)	McCuin *et al.* (2001)
500	9 à 12 kystes.mL^{-1}		IFA	58,1 ± 10,8 % (n = 3) à 83,1 ± 7,9 % (n = 3)	McCuin *et al.* (2001)
50	9 à 12 kystes.mL^{-1}		IFA	55,9 ± 4,6% (n = 3) à 79,7 ± 9,7 % (n = 3)	McCuin *et al.* (2001)

↳ dans les selles et les boues résiduaires

Lors de la comparaison de la sensibilité de l'IMS avec les techniques de Faust (purification par flottation) et de Lutz (purification par sédimentation) pour la détection de kystes de *Giardia* dans des selles humaines naturellement contaminées, Souza *et al.* (2003) montrent une plus grande sensibilité de la séparation immunomagnétique. En effet, les techniques classiques de purification aboutissent à 15,7 % d'échantillons positifs alors que l'IMS couplée à la détection par immunofluorescence détecte des kystes de *Giardia* dans 27,5 % des échantillons.

Massanet-Nicolau (2003) associe une purification par sédimentation à la séparation immunomagnétique pour la détection des kystes de *Giardia* dans des boues résiduaires et des selles animales. Dans les boues primaires et secondaires, 22 à 48 % des kystes sont récupérés avec ce protocole de purification. Rimhanen-Finne *et al.* (2001) utilisent également la séparation immunomagnétique pour la détection des kystes de *Giardia* dans les boues par PCR qualitative, mais ne précisent pas le rendement de leur protocole.

7.2.3.3- Autres facteurs pouvant influencer le rendement de l'IMS.

La conservation des réactifs, l'âge des kystes, la concentration en fer de l'échantillon analysé sont des facteurs pouvant influencer l'efficacité de cette technique.

Ainsi, Hu *et al.* (2004) constatent que l'augmentation du temps de rotation de 50 % peut être nécessaire afin de maintenir le rendement de récupération des kystes, lorsque les réactifs sont conservés sur une durée supérieure à un mois. Toutefois, d'autres expérimentations seraient nécessaires pour confirmer cette étude réalisée uniquement avec des kystes en suspension dans de l'eau désionisée.

Concernant l'influence de l'âge des kystes sur le rendement de l'IMS, Yakub et Stadterman-Knauer (2000) observent une diminution du rendement de 50 % lorsque les kystes sont stockés 90 jours dans du tampon PBS entre 2 et 8°C. Les auteurs expliquent cette diminution du rendement par l'agrégation des kystes qui rend plus délicate la numération des stocks de kystes et la préparation des solutions de dopage. McCuin *et al.* (2001) constatent une diminution du rendement de la séparation immunomagnétique de 81 à 49 % pour des kystes stockés 20 mois dans de l'eau désionisée entre 3 et 5°C. Ils supposent alors que cette chute de l'efficacité de la technique pourrait être due à une plus faible densité de déterminants antigéniques sur la paroi des kystes.

Le troisième facteur incriminé dans les variations de rendement de cette méthode est la concentration en fer dissous présent dans les échantillons. Yakub et Stadterman-Knauer (2000) montrent qu'une concentration en fer dissous supérieure à 40 $mg.L^{-1}$ entraîne une forte diminution du rendement de l'IMS allant jusqu'à des rendements inférieurs à 10 % pour une concentration supérieure ou égale à 200 $mg.L^{-1}$. Le fer est couramment retrouvé dans les eaux de surface et les eaux souterraines. Des concentrations comprises entre 0,5 et 20 $mg.L^{-1}$ sont également observées dans des eaux usées ou des effluents de bassins à boues activées. De plus, le fer est utilisé pour le traitement de déphosphatation des eaux usées par précipitation au chlorure ferrique. De fortes concentrations en fer peuvent donc être attendues dans les effluents de ces stations d'épuration. Lors de cette étude, l'utilisation d'EDTA comme agent chélateur d'ions divalents n'a pas permis d'augmenter le rendement de la séparation immunomagnétique en présence de fer. De nouvelles études seraient nécessaires pour déterminer si l'effet délétère du fer dissous est dû à une action au niveau des interactions de surface entre les anticorps et la paroi des kystes, au niveau de la récupération des complexes billes-anticorps-kystes, ou à une combinaison de ces facteurs (Yakub et Stadterman-Knauer, 2000).

7.2.4- Les techniques de purification basées sur la densité.

Les méthodes de flottation et de gradient de densité isolent les kystes des autres débris grâce à leur différence de densité. Ces méthodes sont couramment utilisées pour la purification de kystes de *Giardia* à partir de selles ou d'échantillons environnementaux.

Pour les méthodes de flottation, la solution à purifier est déposée à la surface d'une solution de densité supérieure à celles des éléments à purifier. Les particules vont alors se séparer en deux populations, d'une part celles qui flottent à la surface de la solution de flottation car elles sont de densité inférieure et d'autre part celles qui sédimentent au fond du tube car elles sont plus denses. Ce phénomène de séparation est accéléré par une centrifugation.

Les centrifugations en gradient de densité sont de deux types et utilisent soit un gradient continu (centrifugation isopycnique), soit un gradient discontinu (centrifugation sur coussin). Lors de la centrifugation isopycnique, la solution de purification utilisée forme un gradient de densité continu. Les particules à séparer vont se placer au cours de leur migration dans la zone du gradient dont la densité est identique à la leur. Cette

technique est très résolutive mais d'un maniement délicat. Dans le cas de la centrifugation sur un gradient discontinu, différents dépôts de densité décroissante sont réalisés. Les particules à séparer sont déposées au dessus du gradient et vont ensuite se placer au cours de la centrifugation au-dessus de la couche qu'elles ne pourront pas traverser. La fraction est récupérée à l'interface de deux couches. Cette technique en gradient discontinu est plus couramment utilisée que la technique en gradient continu.

7.2.4.1- Purification à partir de selles.

Plusieurs méthodes de flottation sur des solutions de citrate de potassium (Rose *et al.*, 1988), de sulfate de zinc (Mahbubani *et al.*, 1991 ; Rose *et al.*, 1988 ; Wade *et al.*, 2000 ; Zajac *et al.*, 1992), de saccharose (Bingham *et al.*, 1979 ; Roberts-Thompson *et al.*, 1976) ou de Percoll™-saccharose (Rose *et al.*, 1988 ; Sauch, 1985) sont utilisées pour la purification des kystes de *Giardia* à partir de selles humaines ou animales. Les techniques utilisant des gradients de densité sur des solutions de saccharose ou de Percoll™ sont moins fréquemment utilisées pour la purification des kystes (Sauch, 1984 ; Smith et Smith, 1989).

Actuellement, la méthode de Faust qui permet la purification par flottation sur une solution de sulfate de zinc de densité 1,18, est la plus couramment utilisée par les laboratoires d'analyse. Peu d'études précisent les valeurs de rendement des différentes méthodes de purification des kystes à partir de selles (tableau **8**).

Tableau 8 : Rendements des techniques de purification des kystes de *Giardia* à partir de selles

Technique	Densité des solutions	Concentration en kystes	Rendement	Références
Flottation				
Solution de citrate de potassium à 40 %	1,16	NR	76 % (n = 5)	Rose *et al.* (1988)
Solution de Percoll™-saccharose	1,09	NR	77 % (n = 5)	Rose *et al.* (1988)
Solution de saccharose	1,05 1,075 1,10 1,125 1,15	NR	0 % 5 % 64 % 65 % 60 %	Roberts-Thompson *et al.* (1976)
	1,11	NR	30 %	Fontaine *et al.* (1984)
Solution de Sheather (saccharose)	1,29 1,24 1,17	NR	70 % (n = 6) 68 % (n = 5) 66 % (n = 5)	Rose *et al.* (1988)
Solution de sulfate de zinc (méthode de Faust)	1,18	NR	40 % (n = 5)	Rose *et al.* (1988)
Gradient de densité				
Solutions de Percoll™	1,01 1,13	$< 10^7.mL^{-1}$ de suspension de selles	60 à 82 %	Sauch, 1984
Solutions de saccharose	1,02 1,06 1,18	NR	63 % (n = 4)	Smith et Smith (1989)

Selon les études et le type de solution utilisée pour la purification par flottation, les rendements s'échelonnent entre 60 et 77 % pour des densités comprises entre 1,10 et 1,29. Fontaine *et al.* (1984) observent un rendement plus faible (30 %) que Roberts-Thompson *et al.* (1976) lors de la purification sur une solution de saccharose de densité de 1,11, mais cette étape de purification par flottation sur solution de saccharose est répétée plusieurs fois. Par contre des densités de l'ordre de 1,05 ou 1,07 semblent inefficaces avec des

rendements nettement insuffisants. Les techniques basées sur la purification par gradient de densité permettent d'obtenir des rendements compris entre 60 et 80 %. L'utilisation moins fréquente des techniques basées sur les gradients de densité est certainement due à leur mise en œuvre plus longue et délicate.

7.2.4.2- Purification à partir d'eaux.

Les rendements de récupération présentés dans le tableau **9** tiennent compte de l'étape de concentration et de purification des kystes sauf pour les travaux de Nieminski *et al.* (1995) et LeChevallier *et al.* (1995) pour lesquels le dopage est réalisé suite à l'étape de concentration. Toutefois l'étude de Robertson *et al.* (2000) permet de comparer différentes techniques de purification après concentration par centrifugation sur trois types de prélèvements environnementaux. D'après cette étude, quelque soit le type d'eau analysée (eau potable, eau usée traitée, eau usée brute), les rendements de récupération les plus élevés sont obtenus en l'absence d'étape de purification. Parmi les trois protocoles de purification, la combinaison d'une flottation sur solution de saccharose (d : 1,18) et d'une purification diphasique à l'éther permet d'obtenir les rendements les plus élevés et les écarts-types les plus faibles. Toutefois, Robertson *et al.* (2000) utilisent une solution de saccharose de densité 1,18 alors qu'une densité de 1,10 semble donner des pourcentages de récupération plus élevés (LeChevallier *et al.*, 1995). Concernant les autres études, la flottation sur solution de Percoll™-saccharose est la technique la plus fréquemment étudiée. Lorsque la densité de la solution est de 1,10, le rendement de cette technique associée à une étape de concentration est compris entre 22,8 et 90 %. L'évaluation de cette technique sur des concentrats d'eau de surface permet à LeChevallier *et al.* (1995) d'obtenir des rendements de 100 % alors que Nieminski *et al.* (1995) observent un rendement de 53 ± 33 %. Les rendements des techniques de purification sur gradient de Percoll™ ou de saccharose sont rarement évalués. Nieminski *et al.* (1995) obtiennent 83 ± 23 % de récupération avec un gradient de Percoll™ toujours avec des concentrats d'eau de surface.

7.2.4.3- Paramètres pouvant modifier les performances des techniques basées sur la densité.

La viabilité des kystes et leur adsorption à des débris pourraient influencer les rendements des techniques de purification basées sur la densité. Ainsi, LeChevallier *et al.* (1995) constatent que la flottation sur solution de Percoll™/saccharose favoriserait la récupération des kystes vides, mais aucune hypothèse n'est proposée pour expliquer cette sélection. Medema *et al.* (1998) montrent que les kystes s'adsorbent aux particules en suspension lorsqu'ils sont mis en contact avec des effluents de station d'épuration. 35 % des kystes s'adsorbent après quelques minutes de contact et 70 % après 24 heures. Cette adsorption aux particules en suspension influence la cinétique de sédimentation des kystes. Des variations de rendement pour une même méthode de purification pourraient être expliquées par la viabilité des kystes ou leur adsorption aux particules en suspension.

Tableau 9 : Rendements de récupération des techniques de purification des kystes de *Giardia* dans les échantillons environnementaux

Protocole de concentration	Protocole de purification	Concentration en kystes	Rendement	Références
Eau potable				
Centrifugation 1500g, 15 minutes	Flottation sur solution de saccharose (d : 1,18)	120 kystes.L^{-1}	39 ± 23 % (n = 7)	Robertson *et al.* (2000)
		5000 kystes.L^{-1}	39 ± 21 % (n = 7)	
	Méthode diphasique (éther)	120 kystes.L^{-1}	47 ± 26 % (n = 7)	
		5000 kystes.L^{-1}	51 ± 22 % (n = 7)	
	Flottation sur solution de saccharose (d : 1,18), méthode diphasique (éther)	120 kystes.L^{-1}	52 ± 26 % (n = 7)	
		5000 kystes.L^{-1}	56 ± 17 % (n = 7)	
	Aucun	120 kystes.L^{-1}	81 ± 11 % (n = 8)	
		5000 kystes.L^{-1}	83 ± 9 % (n = 8)	
Filtration sur cartouche en polypropylène, élution, centrifugation	Flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10)	1,8.10^4 kystes.L^{-1}	22,8 à 26,5 % (NR)	Hsu *et al.* (1999)
		1.10^3 à 1.10^4.L^{-1}	30,0 ± 11,7 % (n = 8)	Hsu *et al.* (2001a)
Filtration sur membrane en polycarbonate, élution, centrifugation	Flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10)	1.10^3 à 1.10^4.L^{-1}	40,4 ± 9,7 % (n = 5)	
Eau de rivière				
Floculation au carbonate de calcium	Flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10)	310 kystes.L^{-1}	61 % (n =1)	Ho *et al.* (1995)
		500 kystes.L^{-1}	40 % (10 à 90 %)	Ho et Tam (1998b)
Filtration sur cartouche en polypropylène, élution, centrifugation	Flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10)	1.10^3 à 1.10^4.L^{-1}	28,4 ± 11,0 % (n = 4)	Hsu *et al.* (2001a)
		NR	27,3 ± 5,6 % (n = 5)	Hsu *et al.* (2001b)
Concentrat d'eau de surface				
dopage après concentration	Flottation sur solution de Percoll™-saccharose : d : 1,05	NR	53 ± 33 % (n = 4)	Nieminski *et al.* (1995)
	Gradient de Percoll™ : d : 1, 5 et 1,09		82 ± 23 % (n = 4)	
	Flottation sur solution de Percoll™-saccharose : d : 1,05	NR	2 % (n = 3)	LeChevallier *et al.* (1995)
	d : 1,10		100 % (n = 3)	
	d : 1,15		96 % (n = 3)	
Eau usée traitée				
Filtration sur gaze, Centrifugation 1500g, 15 minutes	Flottation sur solution de saccharose (d : 1,18)	120 kystes.L^{-1}	37 ± 16 % (n = 7)	Robertson *et al.* (2000)
		5000 kystes.L^{-1}	40 ± 17 % (n = 7)	
	Méthode diphasique (éther)	120 kystes.L^{-1}	43 ± 17 % (n = 7)	
		5000 kystes.L^{-1}	47 ± 22 % (n = 7)	
	Flottation sur solution de saccharose (d : 1,18), Méthode diphasique (éther)	120 kystes L^{-1}	48 ± 12 % (n = 7)	
		5000 kystes.L^{-1}	52 ± 18 % (n = 7)	
	Aucun	120 kystes.L^{-1}	81 ± 27 % (n = 8)	
		5000 kystes.L^{-1}	78 ± 17 % (n = 8)	
Eau usée brute				
Filtration sur gaze, Centrifugation 1500g, 15 minutes	Flottation sur solution de saccharose (d : 1,18)	120 kystes.L^{-1}	30 ± 23 % (n = 7)	Robertson *et al.* (2000)
		5000 kystes.L^{-1}	31 ± 19 % (n = 7)	
	Méthode diphasique (éther)	120 kystes.L^{-1}	38 ± 28 % (n = 7)	
		5000 kystes.L^{-1}	35 ± 24 % (n = 7)	
	Flottation sur solution de saccharose (d : 1,18), Méthode diphasique (éther)	120 kystes.L^{-1}	49 ± 18 % (n = 7)	
		5000 kystes.L^{-1}	49 ± 29 % (n = 7)	
	Aucun	120 kystes.L^{-1}	79 ± 32 % (n = 8)	
		5000 kystes.L^{-1}	85 ± 30 % (n = 8)	

7.3- Techniques de détection des kystes.

Dans les selles, la technique traditionnelle de détection de *Giardia* est la méthode kyste et trophozoïte (nommée "ova and parasite") pour la détection de l'ensemble des protozoaires et helminthes. Toutefois d'autres techniques de détection basées sur des réactions immunologiques ou sur la détection du génome tendent à se développer en complément de celle-ci.

7.3.1- La méthode œuf et parasite.

Cette méthode conventionnelle comprend trois types d'analyse microscopique : une analyse directe au microscope, une analyse après concentration par sédimentation ou flottation et une analyse après coloration de l'échantillon (Aziz *et al.*, 2001). Concernant les techniques de concentration, la méthode de Faust est basée sur la purification par flottation sur une solution de sulfate de zinc (d : 1,18), alors que la méthode de Ritchie est une technique diphasique de purification en présence de formaldéhyde et d'éther.

L'analyse par la méthode kyste et trophozoïte permet la détection de 60 à 80 % des infections pour l'analyse d'un échantillon, alors que deux échantillons permettent la détection de 80 à 90% des cas de giardiose et trois échantillons entraînent une détection supérieure à 90 % (Aziz *et al.*, 2001). Rodriguez-Hernandez *et al.* (1996) observent également une augmentation de la prévalence lors de l'allongement de la période d'observation.

La coloration de l'échantillon permet de faciliter la détection du parasite. Les procédures de détection après coloration utilisent généralement le Lugol, le trichrome, l'hématoxyline et la procédure MIF (Merthiolate-Iode-Formaldéhyde). Parmi ces méthodes, la procédure MIF et la coloration au trichrome apparaissent comme les plus efficaces pour la détection des kystes de *Giardia* (Pickering et Engelkirk, 1988). De plus, la méthode MIF présente l'avantage de coupler la concentration et la coloration des kystes.

Toutefois, l'intermittence et le faible niveau d'excrétion des kystes peuvent entraîner l'examen de plus de trois échantillons pour le diagnostic de cette parasitose (Gardner et Hill, 2001). La nécessité de techniques de diagnostic plus spécifiques, rapides et sensibles a conduit au développement des techniques immunologiques.

7.3.2- Les techniques immunologiques.

Les techniques immunologiques sont soit des méthodes d'immunofluorescence (IFA : Immuno-Fluorescence Assay), soit des techniques immunonuenzymatiques (EIA : Enzyme Immuno Assay).

L'immunofluorescence (IFA) fait intervenir des anticorps poly- ou monoclonaux couplés à une molécule fluorescente constituée par le FITC (IsoThiocyanate de Fluoresceine) ou le TMR (TétraMéthylRhodamine). Le FITC présente une coloration verte alors que le TMR est caractérisé par une coloration rouge lorsque la longueur d'onde d'excitation est comprise entre 450 et 490 nm (Jarmey-Swan *et al.*, 2000). Cette technique de marquage des kystes nécessite ensuite une observation microscopique de l'échantillon.

L'immunofluorescence est la technique actuellement recommandée par les normes américaines (US-EPA, 1995, 2001) et françaises (AFNOR, 2001) pour la numération des kystes de *Giardia* dans les échantillons d'eaux environnementales. Toutefois, cette technique est relativement longue et fastidieuse et le risque de faux positifs dû à une réaction croisée avec d'autres éléments notamment des algues ne peut être totalement écarté

(Mahbubani *et al.*, 1992). Actuellement, cette méthode ne permet pas de déterminer l'espèce pour des kystes présents dans ces échantillons.

Les techniques immunoenzymatiques (EIA) font appel à des anticorps sur lesquels est fixée une enzyme. L'ajout du substrat de l'enzyme permet ensuite la révélation de la réaction. Le produit de la réaction enzyme-substrat est une molécule colorée. La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) appartient aux méthodes immunoenzymatiques, il s'agit d'une technique basée sur la compétition entre les antigènes que l'on recherche et des antigènes marqués par une enzyme. Les anticorps sont fixés sur un support, l'échantillon à analyser ainsi qu'une quantité connue d'antigènes marqués sont ensuite mis en présence des anticorps.

La lecture des résultats ne nécessitant pas d'examen microscopique, elle est plus rapide que pour l'immunofluorescence. Toutefois, ces techniques immunoenzymatiques peuvent entraîner la détection de faux positifs due à la mise en évidence d'antigènes de paroi et non de kystes intacts (Johnston *et al.*, 2003).

Lors d'études d'estimation de la sensibilité et de la spécificité des techniques immunoenzymatiques sur des prélèvements de selles (tableau **10**), les performances de ces méthodes sont comparées à celles de l'immunofluorescence ou d'une technique de coloration classique (Schunk *et al.*, 2001). La sensibilité de ces techniques est supérieure à 88 % dans la totalité des analyses. La spécificité des techniques EIA est comprise entre 99 et 100 % , par contre elle présente une variabilité plus importante pour la technique ELISA puisqu'elle varie entre 89 et 100 %.

Tableau 10 : Evaluation de la sensibilité et de la spécificité des techniques immunologiques lors de l'analyse de selles

Techniques	Sensibilité	Spécificité	Référence
IFA	100 %	99,8 %	Zimmerman et Needham (1995)
EIA	97 %	99,8 %	
IFA	100 %	100 %	Garcia et Shimizu (1997)
EIA	94 - 99 %	100 %	
ELISA	88,6 - 100 %	99 - 100 %	Aldeen *et al.* (1998)
IFA	97 %	NR	Aziz *et al.* (2001)
EIA	100 %	100 %	
ELISA	91 - 94 %	89 %	
EIA	100 %	99,6 %	Schunk *et al.* (2001)
IFA	100 %	100 %	Johnston *et al.* (2003)
EIA	90,6 %	99,5 %	

La plus faible sensibilité de la technique œuf et parasite, par rapport aux méthodes immunologiques, nécessite généralement la lecture de plusieurs lames pour obtenir des résultats similaires entre ces méthodes, ce qui est difficilement applicable dans le cas d'analyse en routine (Aldeen *et al.*, 1998). Bien que l'immunofluorescence soit une technique moins rapide que les techniques immunoenzymologiques, elle doit être préférée à ces dernières car elle est couplée à l'observation microscopique et permet ainsi de vérifier la présence des kystes.

7.4- Techniques d'estimation de la viabilité.

La viabilité est la condition nécessaire, mais non suffisante, pour que l'ingestion de kystes provoque une infection. L'estimation de la viabilité des kystes de *Giardia* provenant de selles, d'eau destinée à la consommation humaine ou de prélèvements environnementaux (eaux de surface, eaux usées, boues) peut être réalisée par différentes techniques. Les méthodes classiques sont représentées par l'inoculation à l'animal, le dékystement *in vitro* et l'observation par microscopie pouvant être précédée par une étape de coloration. L'électrorotation et les techniques de biologie moléculaire sont des méthodes plus récemment proposées pour l'estimation de la viabilité des kystes. L'intérêt des techniques de biologie moléculaire dans ce domaine sera abordé dans le paragraphe **8**.

7.4.1- L'électrorotation.

L'électrorotation est une technique non invasive basée sur l'observation de micro-organismes soumis à un champ électrique rotatif. La rotation induite chez les micro-organismes varie suivant la conductivité et la constante diélectrique de la paroi, de la membrane cytoplasmique et du cytoplasme des kystes, mais aussi du milieu de suspension. La perte de viabilité des kystes entraîne une augmentation de la perméabilité de la paroi provoquant une diminution de la conductivité au niveau du cytoplasme et une modification de leur comportement sous l'effet d'un champ électrique rotatif.

Le sens et la vitesse de rotation des kystes permettent d'estimer leur viabilité. La mesure de la vitesse de rotation serait moins sensible aux variations de conductivité du milieu de suspension et devrait être préférentiellement utilisée pour l'analyse d'échantillons environnementaux (Dalton *et al.*, 2001a et 2001b).

Ces travaux relatifs à l'électrorotation ont été réalisés par une seule équipe et uniquement sur des suspensions purifiées de kystes, ainsi des expérimentations sur des kystes provenant de différentes sources environnementales seraient indispensables pour l'évaluation de cette technique.

7.4.2- La microscopie optique.

7.4.2.1- La coloration à l'éosine.

La coloration à l'éosine est une technique basée sur l'exclusion de ce colorant par les kystes viables. Cette méthode a notamment été utilisée pour l'estimation de la viabilité en comparaison avec le dékystement *in vitro* lors d'expérimentations portant sur la survie des kystes de *Giardia*. Cette coloration simple à mettre en oeuvre, consiste à marquer les kystes non viables par une solution aqueuse d'éosine grâce à la perméabilité de leur paroi. Le pourcentage de viabilité est ensuite déterminé par observation microscopique et correspond au nombre de kystes non marqués par rapport au nombre total de kystes (Bingham *et al.*, 1979).

7.4.2.2- Le contraste interférentiel différentiel (DIC).

La microscopie DIC permet d'estimer la viabilité des kystes par l'observation de leurs structures externes et internes. Les kystes viables présentent alors une paroi nettement délimitée, un espace périplasmique entre la paroi et la membrane cytoplasmique, ainsi qu'un cytoplasme hyalin et non granuleux (Schupp et Erlandsen, 1987a). Toutefois, Hautus *et al.* (1988) constatent que 38 % des kystes satisfaisant ces trois critères ne peuvent se dékyster *in vitro* et aucun critère morphologique ne permet de les identifier.

7.4.2.3- Les colorants fluorogéniques.

Les principaux colorants fluorogéniques utilisés pour l'estimation de la viabilité des kystes de *Giardia* sont le PI (Iodure de Propidium ou 2,7-diamino-9-phényl-10-(diéthylaminopropyl)iodure méthiodure de phénanthridinium), le FDA (Diacétate de Fluorescéine) et le DAPI (4',6-diamidino-2- phénylindole).

Le PI est un colorant basique exclu par les cellules viables dont la membrane est intacte. Les kystes de *Giardia* non viables présentent une coloration rouge à 510-560 nm (Thiriat *et al.*, 1998). Cette molécule qui est un analogue du bromure d'éthidium (BET) s'intercale entre les deux brins d'ADN contenus dans les cellules non viables ce qui entraîne une très forte augmentation de sa fluorescence (Yeh *et al.*, 1981).

Le FDA est un ester non polaire qui traverse la paroi du kyste par diffusion, il est transformé en fluorescéine par les estérases intracellulaires et permet ainsi la mise en évidence d'une activité enzymatique. La fluorescéine s'accumule dans les kystes viables qui présentent alors une fluorescence verte à 450-490 nm (Sauch *et al.*, 1991).

Le DAPI traverse la paroi des kystes et se fixe au niveau de l'ADN. Les noyaux des kystes viables présentent alors une fluorescence bleue caractéristique à 365 nm (Thiriat *et al.*, 1998). Le marquage par le DAPI, en association avec l'immunofluorescence et l'observation DIC, est actuellement recommandé par la norme US-EPA (2001) pour la numération des kystes de *Giardia*.

L'utilisation des fluorochromes est une technique rapide, simple et peu coûteuse (Schupp et Erlandsen, 1987b). Toutefois, la comparaison de cette méthode avec l'inoculation à l'animal et le dékystement *in vitro* a montré une surestimation de la viabilité des kystes par l'utilisation des colorants fluorogéniques (Labatiuk *et al.*, 1991; Smith et Smith, 1989).

7.4.3- Le dékystement in vitro.

Cette méthode comporte différentes étapes dont les plus importantes sont l'induction et l'incubation. Les conditions appliquées pour les étapes d'induction et d'incubation miment celles de l'estomac et de l'intestin grêle de l'hôte. Différents paramètres comme la température, le pH et le milieu d'incubation influencent le niveau de dékystement (Bingham *et al.*, 1979). Ainsi, la température doit être maintenue constante à 37°C durant l'ensemble des étapes. Le pH optimal pour l'induction est de 2 (car cette étape s'effectue *in vivo* au niveau gastrique), alors qu'il est de 8 lors de l'incubation (étape réalisée *in vivo* au niveau intestinal). Il a également été observé que pendant l'étape d'incubation, l'utilisation d'enzymes, notamment la trypsine permet d'augmenter le pourcentage de dékystement (Schaefer *et al.*, 1984 ; Labatiuk *et al.*, 1991). Le dékystement est apprécié par observation au microscope.

Cette technique présente l'avantage d'être d'exécution rapide (une à trois heures), mais elle ne présente pas une bonne corrélation avec le dékystement *in vivo* qui doit lui être préféré (Smith & Smith, 1989 ; Isaac-Renton *et al.*, 1992).

7.4.4- L'inoculation à l'animal ou dékystement in vivo.

Le modèle animal permet de mesurer la capacité des kystes à terminer leur cycle parasitaire chez l'hôte et y provoquer une infection. Il s'agit de la méthode de référence pour l'étude de la viabilité des kystes (Labatiuk

et al., 1991). On peut utiliser comme association hôte-parasite soit souris - *Giardia muris*, soit gerbille - *Giardia duodenalis*.

Préalablement à l'inoculation des kystes, un examen des selles est effectué sur les rongeurs et un animal par groupe est sacrifié afin de vérifier l'absence de trophozoïtes au niveau de l'intestin grêle. Des kystes, à raison de plus de 100 par animal, sont ensuite administrés par voie intra-gastrique à l'aide d'une sonde, le choix d'une infestation massive permettant de diminuer le temps de latence (Schupp et Erlandsen, 1987a). Des analyses de selles sont ensuite réalisées de j+3 à j+11. Les animaux pour lesquels aucun kyste n'a été détecté, sont sacrifiés et des trophozoïtes sont recherchés par examen microscopique de la muqueuse intestinale (DeRegnier *et al.*, 1989 ; Schupp et Erlandsen, 1987a).

Outre l'utilisation d'animaux, le dékystement *in vivo* présente l'inconvénient d'être une méthode à réponse tardive.

7.4.5- Comparaison des trois techniques classiques d'estimation de la viabilité.

Lors de l'évaluation de la survie des kystes à différentes températures, Bingham *et al.* (1979) constatent que l'exclusion à l'éosine conclut toujours à une plus grande résistance des kystes par rapport au dékystement *in vitro*, ainsi cette technique entraînerait une surestimation de la viabilité.

Schupp et Erlandsen (1987a) montrent une parfaite corrélation entre les observations DIC et le marquage par le FDA ou le PI. Les kystes PI positifs, non viables, présentent des caractéristiques morphologiques distinctes des kystes viables positifs au marquage FDA. Lors de la comparaison entre l'inoculation à l'animal et le marquage par le FDA et le PI, Schupp et Erlandsen (1987b) montrent que les kystes de *G. muris* positifs au FDA provoquent une infection chez la souris alors que les kystes PI positifs n'entraînent aucune contamination chez l'animal. Toutefois, ces auteurs utilisent de très fortes quantités de kystes lors des essais d'inoculation à l'animal. De plus, certains kystes ne pourraient être marqués ni par le FDA, ni par le PI. Le FDA surestimerait la viabilité par rapport au dékystement *in vitro* (Smith et Smith, 1989). Sauch *et al.* (1991) constatent que le PI ne permet pas le marquage des kystes exposés au chlore et aux monochloramines.

Labatiuk *et al.* (1991) observent que pour les kystes exposés à l'ozone, le FDA et le dékystement *in vitro* surestimeraient la viabilité par rapport à l'infectiosité chez l'animal. Ainsi, le dékystement *in vitro* est une méthode pouvant surestimer la viabilité notamment par sa subjectivité lorsque le dékystement n'est que partiel (Labatiuk *et al.*, 1991).

La figure 9 compare la précision de détection des kystes viables par les trois méthodes : inoculation à l'animal, dékystement *in vitro* et colorants fluorogéniques. La technique *in vivo* est la seule à permettre la mise en évidence des kystes aptes à poursuivre leur cycle parasitaire chez l'hôte et constitue la méthode de référence. Toutefois, le marquage par le DAPI et le PI semble être la méthode la mieux adaptée pour l'estimation de la viabilité des kystes de *Giardia* isolés à partir d'échantillons environnementaux (Thiriat *et al.*, 1998)

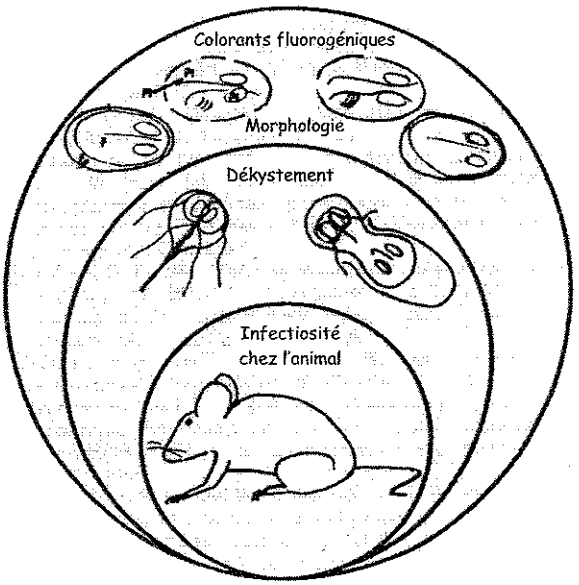


Figure 9 : Comparaison de la précision de détection de la viabilité des kystes de *Giardia* par inoculation à l'animal, dékystement *in vitro* et microscopie (DeRegnier *et al.*, 1989)

7.5- Méthodes de référence pour la détection des kystes de Giardia dans le milieu hydrique.

Deux catégories de méthodes de référence existent pour la détection des kystes de *Giardia* dans le milieu hydrique. Ces deux catégories diffèrent par la technique de purification-concentration des kystes qui est réalisée soit par flottation, soit par séparation immunomagnétique (IMS). La première catégorie correspond à la méthode ICR-US-EPA de 1995 (ICR : Information Collection Rule) et la deuxième regroupe la norme française NF T90-455 de l'AFNOR (2001) et la méthode 1623 de l'US-EPA (2001). Ces trois méthodes de référence sont établies pour la détection des kystes de *Giardia*, mais aussi des oocystes de *Cryptosporidium*.

Les méthodes normalisées ICR-US-EPA (1995) et NF T90-455 (2001) concernent l'analyse d'eaux destinées à la consommation humaine, d'eaux de surface et souterraines, voire d'eaux résiduaires épurées sous certaines conditions. La méthode 1623, validée sur des eaux de surface, peut être utilisée sur d'autres types d'eaux après vérification de ses performances. Ces protocoles sont donc destinés à l'analyse d'échantillons d'eaux de faible turbidité. Ces méthodes sont constituées de trois étapes : concentration des kystes par filtration sur cartouche, purification des kystes, puis détection par observation microscopique. Les caractéristiques des différentes étapes constituant ces trois méthodes sont présentées dans le tableau **11**.

La méthode 1623 de l'US-EPA (2001) précise que lors du contrôle qualité, les rendements initiaux de récupération dans l'eau désionisée doivent être compris entre 24 et 100 %. L'évaluation de l'effet de la matrice sur le rendement de la méthode avec des échantillons environnementaux dopés, doit aboutir à des rendements de récupération compris entre 15 et 118 %.

Tableau 11 : Caractéristiques des différentes étapes des méthodes ICR-US-EPA (1995), NF T90-455 AFNOR (2001) et 1623 US-EPA (2001)

	Méthodes		
	ICR-US-EPA (1995)	NF T90-455 AFNOR (2001)	1623 US-EPA (2001)
Concentration	**Filtration sur cartouche** (Porosité : 1 µm)		
	Cartouche avec surface filtrante en polypropylène	Cartouche avec surface filtrante en polyéthersulfone	
	Elution		
	Centrifugation (centrifugeuse à godets oscillants)		
	1 050 g, 10 minutes	1 250 g, 30 minutes	1 500 g, 15 minutes
Purification	Flottation sur solution de Percoll-saccharose (densité : 1,1)	Séparation immunomagnétique : IMS	
Détection-identification et quantification	**Immunofluorescence : utilisation d'anticorps marqués au FITC**		
	Observation à l'objectif DIC		
	Marquage sur membrane en acétate de cellulose (porosité : 0,22 µm).	Marquage sur lame à puits	
			Marquage au DAPI

Tableau 12 : Rendements des méthodes 1623 US-EPA (2001) et NF T90-455 AFNOR (2001) pour la détection des kystes de *Giardia*

Méthode		Volume analysé	Kystes.L^{-1}	Rendement	Références
Eau distillée					
Méthode 1623, non modifiée		10 L	98 ± 1,5	45 ± 41 % (n = 4)	Quintero-Betancourt *et al.* (2003)
Méthode 1623-cartouche Envirochek-HV		100 L	98 ± 1,5	37 ± 40 % (n = 4)	
Eau potable					
NF T90-455		100 L	24,4 ± 4,9 125,9 ± 8,5	34,5 ± 11,8 % (n = 10) 42,4 ± 6,5 % (n = 10)	De Roubin *et al.* (2002)
Méthode 1623, non modifiée		10 L	98 ± 1,5	64 ± 16 % (n = 5)	Quintero-Betancourt *et al.* (2003)
			232 ± 11,8	77,2 ± 6,0 % (n = 3)	Hu *et al.* (2004)
Méthode 1623-cartouche Envirochek-HV		100 L	98 ± 1,5	55 ± 22 % (n = 5)	Quintero-Betancourt *et al.* (2003)
Eau de surface	**Turbidité**				
NF T90-455	5 10	20 L	24,4 ± 4,9 125,9 ± 8,5	53,2 ± 11,6 % (n = 10) 40,3 ± 11,5 % (n = 10)	De Roubin *et al.* (2002)
Méthode 1623	11 NTU	10 L	10	61 ± 0,06 % (n = 3)	DiGiorgio *et al.* (2002)
	99 NTU	1,7 L		0,83 ± 0,01 % (n = 3)	
Méthode 1623-cartouche Envirocheck-HV	11 NTU	10 L		53 ± 0,05 % (n = 3)	
	20 NTU	10 L		46 ± 0,03 % (n = 3)	
	36 NTU	7 L		2,6 ± 0,01 % (n = 3)	
	99 NTU	3,2 L		0,5 ± 0,0025 % (n = 3)	
Eau usée traitée					
Méthode 1623, non modifiée		10 L	98 ± 1,5	26 ± 84 % (n = 5)	Quintero-Betancourt *et al.* (2003)
Méthode 1623-cartouche Envirochek-HV		100 L	98 ± 1,5	27 ± 94 % (n = 5)	

Cartouche Envirochek HV (High-Volume) = cartouche destinée à la filtration de 100 L d'eau

La méthode 1623 US-EPA non modifiée permet d'obtenir des rendements compris entre 64 et 77 % lors de l'analyse d'eau potable (Hu *et al.*, 2004 ; Quintero-Betancourt *et al.*, 2003). Par contre le rendement diminue et l'écart-type est plus élevé (26 ± 84 %) lorsque cette méthode est appliquée à une eau usée traitée (Quintero-Betancourt *et al.*, 2003).

La cartouche Envirochek-HV (High Volume) qui permet de filtrer des volumes 10 fois plus importants que la cartouche Envirochek classique, a essentiellement été développée afin d'améliorer le rendement de récupération des oocystes de *Cryptosporidium*. Concernant la détection des kystes de *Giardia* à partir d'eau potable et d'eau usée traitée, la modification du système de filtration ne permet pas d'augmenter le rendement de récupération. De plus, pour les eaux usées traitées, la variation du rendement est plus élevé avec ce type de cartouche. DiGiorgio *et al.* (2002) observent également qu'une turbidité supérieure à 20 NTU est préjudiciable au rendement de la méthode 1623 US-EPA quelque soit le système de filtration mis en oeuvre.

8- L'apport des techniques de biologie moléculaire dans l'étude de Giardia.

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis notamment d'envisager leur application à la détection de micro-organismes pathogènes dans les prélèvements biologiques, mais aussi dans les échantillons environnementaux. Ainsi, de nombreuses études concernent la détection, le génotypage, l'estimation de la viabilité et plus récemment la quantification de *Giardia* par ces techniques. L'intérêt croissant qui est porté à ces techniques est justifié par leur apport en terme de sensibilité, rapidité et surtout spécificité par rapport aux méthodes conventionnelles de détection des micro-organismes.

8.1- Description des techniques utilisées pour la détection ou la quantification de Giardia.

8.1.1- Les techniques d'hybridation.

8.1.1.1- La méthode FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).

La technique d'hybridation *in situ* a pour objectif de localiser une séquence particulière de l'acide nucléique au sein de la cellule par hybridation d'une sonde oligonucléotidique complémentaire. Les ARN ribosomaux (ARNr) sont choisis comme cible dans la méthodologie FISH. La sonde est couplée à un fluorochrome permettant ensuite la détection par microscopie en épifluorescence. Cette technique autorise une détection spécifique d'espèce et ne détecte pas les kystes vides ou les fragments de paroi contrairement à la détection par immunofluorescence (Dorsch et Veal, 2001).

En 2001, Dorsch et Veal montrent que la technique FISH permet la détection de kystes viables, sans toutefois la comparer avec les autres méthodes d'estimation de la viabilité. Actuellement, cette technique permet la détection des kystes, mais son intérêt dans l'estimation de leur viabilité doit être confirmé.

8.1.1.2- L'hybridation dot-blot.

La technique d'hybridation dot-blot est basée sur l'immobilisation de l'ADN ou de l'ARN cible sur une membrane en nylon suivie par sa détection par hybridation avec une sonde marquée. Une étape de lyse des kystes et de purification de l'ADN doit être réalisée préalablement au dépôt sur la membrane.

Dès 1988, Butcher et Farthing testent la méthode de dot-blot sur des échantillons de selles et ne parviennent pas à détecter l'ADN de kystes de *Giardia* par cette technique. Abbaszadegan *et al.* (1991) utilisent

une sonde ciblant la petite sous-unité de l'ARN ribosomal. Cette sonde permet alors la détection des kystes de *G. lamblia* dans des eaux usées traitées et des eaux de surface, mais malheureusement s'hybride également avec l'ADN provenant de kystes de *G. muris*. Finalement, cette technique n'est plus actuellement utilisée pour la détection des kystes de *Giardia*.

8.1.2- L'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction).

8.1.2.1- Principe.

La technique de Polymerase Chain reaction (PCR) permet d'amplifier de façon spécifique une séquence d'ADN en plusieurs millions de copies. Cette méthode consiste à polymériser un fragment d'ADN de façon répétée à l'aide d'une enzyme thermostable et de deux amorces sens et antisens. L'amorce sens est complémentaire d'une partie du brin antisens de l'ADN, alors que l'amorce antisens s'hybride avec le brin sens. Une PCR est composée de 20 à 40 cycles successifs qui permettent en théorie d'obtenir 2^{20} à 2^{40} copies de la séquence cible.

Chaque cycle est composé de trois étapes. L'ADN double brin est dénaturé par chauffage à une température de 95°C. La deuxième étape est ensuite réalisée à une température comprise entre 50 et 60°C et permet l'hybridation des amorces à chaque extrêmité de la séquence génomique à amplifier. La température d'hybridation est dépendante de la séquence et de la longueur des amorces. La troisième étape nommée élongation est réalisée à partir des amorces par l'ADN polymérase à une température de 72°C et permet la synthèse des brins complémentaires.

La nested-PCR (PCR nichée) et la semi-nested PCR (ou hemi-nested PCR) sont des variantes de la PCR conventionnelle permettant d'augmenter la sensibilité ainsi que la spécificité de cette technique de détection en amplifiant l'ADN par deux PCR successives. Ces techniques utilisent respectivement une ou deux nouvelles amorces situées à l'intérieur de la séquence du fragment amplifié lors de la première PCR. Une deuxième amplification est ensuite réalisée afin de synthétiser une quantité très importante d'ADN. L'utilisation de nouvelles amorces permet également d'améliorer la spécificité de détection. L'inconvénient majeur de ce type de technique est lié à la manipulation d'ADN amplifié entraînant un fort risque de contamination.

Les premières études portant sur la détection de kystes de *Giardia* par PCR ont été publiées au début des années 1990 (Mahbubani *et al.*, 1991, 1992 ; Weiss *et al.*, 1992). Les travaux ont ensuite porté sur la détection des kystes à partir de selles ou d'échantillons environnementaux (Mahbubani *et al.*, 1998 ; Mayer et Palmer, 1996).

8.1.2.2- Révélation des produits amplifiés.

L'ADN amplifié peut être détecté soit par hybridation moléculaire avec une sonde complémentaire de la séquence cible (Southern-blot), soit par électrophorèse sur un gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium (BET) qui est un agent intercalant, suivie par une révélation sur une table UV (254 nm).

La révélation des produits amplifiés par Southern-blot permet d'augmenter la sensibilité, mais aussi la spécificité de la PCR notamment lors de l'analyse d'échantillons environnementaux (Kaucner et Stinear, 1998 ; Mahbubani *et al.*, 1998). La révélation par Southern blot est utilisée par Mahbubani *et al.* (1992) pour confirmer la spécificité des amorces. Weiss *et al.* (1992) constatent que les amorces dessinées pour l'amplification de

Giardia lamblia amplifient également l'ADN de trois autres protozoaires (*Entamoeba histolytica, Leishmania major* et *Trypanosoma brucei*), ils font alors appel à cette technique pour détecter spécifiquement *G. lamblia*. Ces auteurs constatent que la révélation par Southern-blot permet également d'atteindre une valeur de limite de détection 10 à 100 fois plus performante.

8.1.3- La technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

La technique RFLP a notamment été utilisée par Nash *et al.* (1985) pour comparer les séquences ADN d'isolats de *Giardia* d'origine humaine et animale. La digestion de l'ADN par des enzymes de restriction ou endonucléases permet d'obtenir des profils électrophorétiques permettant la comparaison des différents isolats lors d'études épidémiologiques.

La PCR-RFLP associe l'amplification de l'ADN par PCR à la digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Suite à une PCR conventionnelle, l'ADN amplifié est purifié, puis digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction et les différents fragments sont ensuite révélés par électrophorèse. Cette technique permet ainsi d'identifier des isolats en fonction de leur profil électrophorétique. Cette technique nécessite la mise en évidence de site de restriction enzymatique par séquençage.

Actuellement, la PCR-RFLP reste une technique couramment utilisée pour le génotypage de kystes de *Giardia* isolés de selles humaines ou animales. Ainsi, Homan *et al.* (1998) montrent que cette technique permet d'obtenir des profils électrophorétiques différents pour les génotypes A et B à partir de souches référencées de *G. lamblia* et qu'elle peut alors être utilisée pour le génotypage de kystes isolés de selles humaines. Amar *et al.* (2002) utilisent la PCR-RFLP pour réaliser la distinction entre les sous-génotypes AI et AII lors de l'analyse de selles humaines. Caccio *et al.* (2002) développent une PCR-RFLP permettant la distinction entre les génotypes A, B et E de *G. lamblia* et valident cette technique par comparaison avec les résultats de séquençage toujours sur des selles humaines. Plus récemment, Read *et al.* (2004) proposent un protocole de PCR-RFLP utilisant deux enzymes de restriction pour la distinction des sous-génotypes AI, AII, BIII, BIV, C, D et E et proposent de l'utiliser pour le génotypage d'isolats d'origine humaine ou animale.

8.1.4- La quantification par PCR en temps réel.

La PCR en temps réel est une technique où l'étape de révélation du produit amplifié se fait directement au cours de l'amplification. Par conséquent il n'est plus nécessaire de révéler les produits amplifiés par une étape de révélation par hybridation ou électrophorèse. Le principe de cette technique est fondé sur la mesure de la fluorescence émise au cours de la PCR qui est proportionnelle au nombre de copies d'ADN néosynthétisé (Higuchi *et al.*, 1993).

Suivant la technologie utilisée, la fluorescence peut être soit le résultat d'interactions non spécifiques entre l'ADN amplifié et un agent intercalant, soit générée grâce à une sonde spécifique complémentaire de l'ADN cible.

Dans le cas de l'utilisation d'un agent intercalant (Bromure d'Ethidium, SYBER Green...), plus le nombre de molécules d'ADN amplifié augmente, plus la quantité d'agent intercalant fixée augmente et plus l'intensité de fluorescence est élevée. La fluorescence peut également être générée par utilisation de sondes spécifiques

complémentaires de l'ADN amplifié. Il s'agit de sondes marquées chimiquement par un fluorochrome (sondes TaqMan et TaqMan MGB, sondes d'hybridation, sondes molecular beacon, sondes scorpions...). Lors de cette étude des sondes TaqMan et TaqMan MGB sont utilisées pour la quantification de kystes de *Giardia lamblia* et de certains génotypes de cette espèce.

Les sondes TaqMan MGB comportent deux éléments spécifiques constitués par un groupement MGB (Minor Groove Binder) et un quencher non fluorescent (NFQ) à l'extrêmité 3'. Les MGB sont des molécules relativement allongées, en forme de croissant, qui se lient au sillon mineur de l'ADN par des forces de Van der Waals, des interactions hydrophobes et électrostatiques (Kutyavin *et al.*, 1997). La présence du groupement MGB permet d'augmenter le Tm des sondes et la stabilité de la liaison entre la sonde et l'ADN cible. Plus la sonde est de petite taille et plus la contribution du groupement MGB à la stabilité de la liaison entre la sonde et sa cible est importante. Le groupement MGB permet donc de dessiner des sondes plus courtes et ainsi plus sensibles aux variations de séquence d'un seul nucléotide. Les sondes TaqMan MGB sont notamment utilisées pour la discrimination allélique. De plus, la présence d'un quencher non fluorescent et la diminution de la distance entre le quencher et le reporter permettent de diminuer très nettement le ratio signal/bruit. En effet, ce ratio est de 1,5 pour une sonde TaqMan MGB alors qu'il est de 6 pour une sonde TaqMan classique (Kutyavin *et al.*, 2000). Le tableau **13** présente les caractéristiques des sondes TaqMan et TaqMan MGB.

Tableau 13 : Caractéristiques des sondes TaqMan et TaqMan MGB

Type de sonde	Marquage en 5'	Marquage en 3'	Taille	Autres caractéristiques
TaqMan		TAMRA	20 à 30 nucléotides	aucune
TaqMan MGB	6-FAM, VIC, TET	Quencher non fluorescent (NFQ)	Inférieure à 20 nucléotides	Groupement MGB

6-FAM : 6-carboxyfluorescéine ; TET : tetrachloro-6-carboxyfluorescéine ; TAMRA : 6-carboxytétraméthylrhodamine ; NFQ : Non Fluorescent Quencher ; MGB : Minor Groove Binder.

Les deux points importants pour la PCR en temps réel avec les sondes TaqMan et TaqMan MGB sont l'activité exonucléasique de la Taq polymérase et l'utilisation de sondes caractérisées par un double marquage aux extrémités 5' et 3'. Les sondes TaqMan et TaqMan MGB sont en effet marquées à leur extrêmité 5' par un fluorochrome ou "Reporter" et à leur extrêmité 3' par un "Quencher". Le quencher inhibe l'émission de flurescence par phénomène de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) lorsque la sonde est intacte.

Durant l'amplification (figure **10**), les amorces et sonde TaqMan s'hybrident à la cible pendant l'étape d'hybridation. Lors de la phase d'élongation, la sonde est clivée grâce à l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase ce qui permet la séparation entre le quencher et le reporter provoquant alors une émission de fluorescence. A chaque synthèse d'un brin d'ADN une molécule de fluorochrome est libérée, il en résulte une émission de fluorescence proportionnelle au nombre de copies générées (Giuletti, 2001).

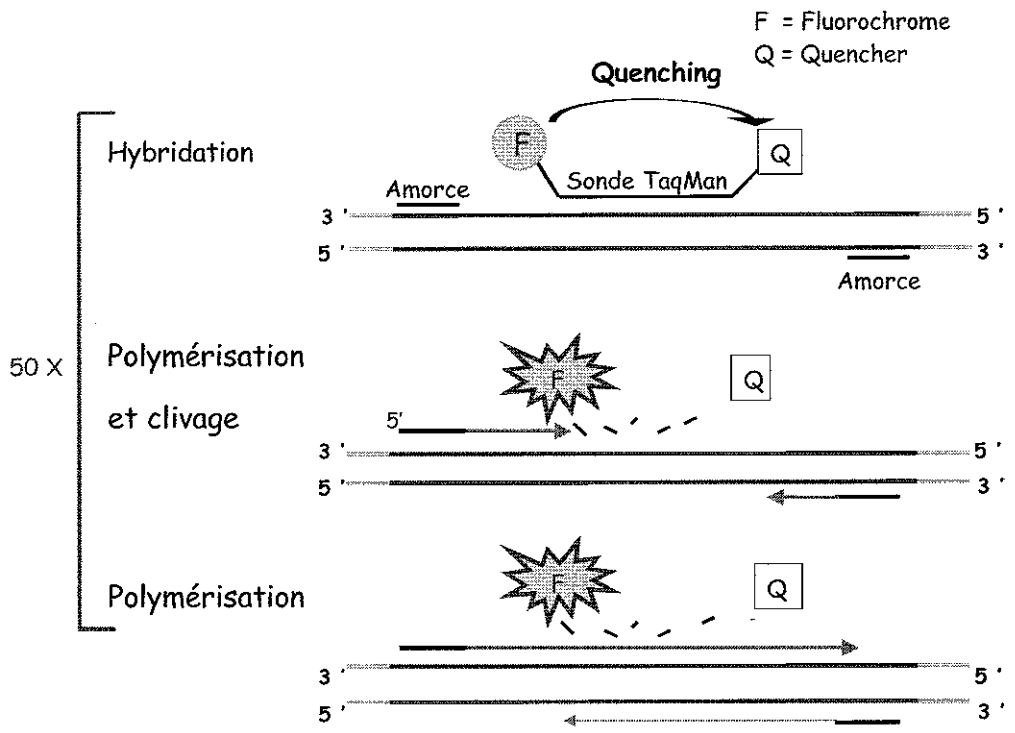


Figure 10 : Représentation schématique du principe de la PCR en temps réel

La cinétique de l'amplification d'un échantillon d'ADN est obtenue par mesure de l'intensité de fluorescence (If) à chaque cycle de PCR. L'ensemble des données brutes de fluorescence est normalisé par rapport à un autre fluorochrome (ROX) présent en concentration constante dans le milieu réactionnel. Le résultat des 50 cycles est une courbe d'amplification représentant l'intensité de fluorescence en fonction des cycles de PCR (figure **11**). Suite à la PCR quantitative, chaque échantillon est caractérisé par une valeur de Ct (Threshold cycle) qui correspond au cycle à partir duquel la fluorescence est considérée comme significativement supérieure à la ligne de base ou seuil. Ce seuil est déterminé soit en fonction de la fluorescence mesurée lors des 15 premiers cycles de PCR, soit à partir de la fluorescence émise par des tubes témoins ne contenant pas d'ADN à amplifier.

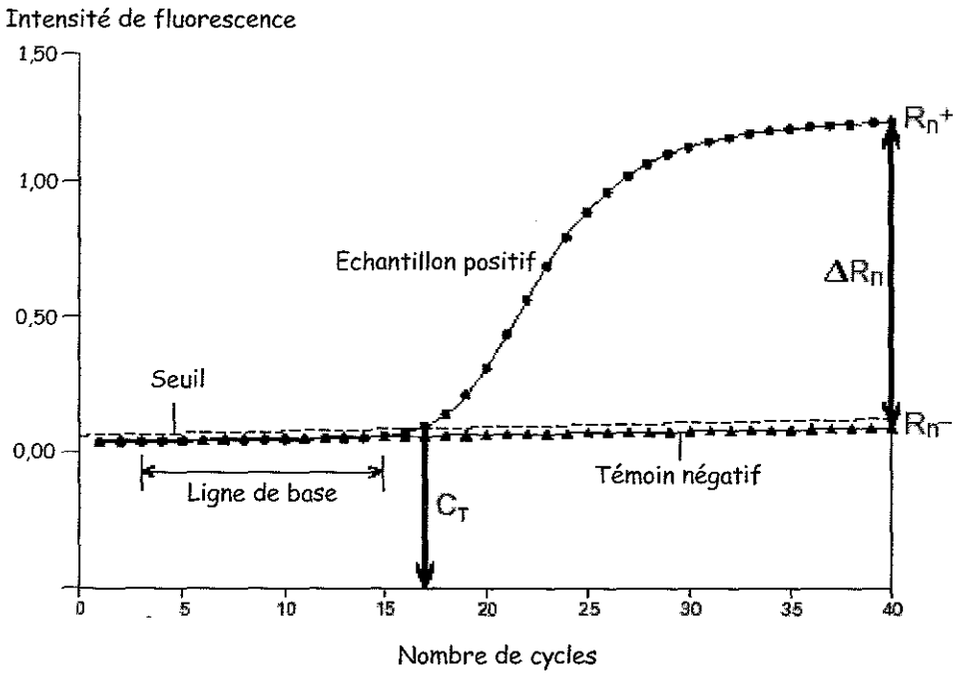


Figure 11 : Evolution de la fluorescence au cours d'une PCR en temps réel en fonction du nombre de cycles

R_n^+ : Intensité de fluorescence d'un échantillon positif.

R_n^- : Intensité de fluorescence d'un témoin négatif (sans ADN).

Ligne de base : Intensité de fluorescence mesurée entre les cycles 3 et 15 afin de fixer le seuil d'émission de fluorescence.

ΔRn : Amplitude de l'intensité de fluorescence émise, $\Delta Rn = (R_n^+) - (R_n^-)$

Ct : Cycle seuil d'émission de fluorescence

Le Ct est inversement proportionnel à la quantité de copies d'ADN présentes dans le milieu réactionnel, il est d'autant plus faible que le nombre initial de copies de l'ADN cible est élevé. La quantification absolue s'effectue en utilisant une gamme étalon externe qui établit une relation linéaire entre la valeur de Ct et le logarithme du nombre initial de copies de l'étalon. Les Ct des échantillons sont reportés sur la droite d'étalonnage pour déterminer la quantité de génome.

La méthode repose sur l'exploitation de la cinétique de la réaction de PCR : $X_n = X_0 (1 + R)^n$ où Xo correspond à la quantité initiale d'ADN, Xn est la quantité d'ADN générée après n cycles d'amplification de PCR et R correspond au rendement de l'amplification compris entre 0 et 1. Les valeurs de Ct des différents points de la gamme étalon permettent d'obtenir une droite dont la pente est directement liée au rendement d'amplification. Ainsi, pour un rendement de PCR compris entre 0,75 (75 %) et 1 (100 %), la pente de la droite est comprise entre -4,1 et -3,3.

Les premiers travaux relatifs à l'utilisation de la PCR en temps réel pour la quantification de *Giardia* sont publiés en 2003. Ainsi, Johnson *et al.* (2003) publient la première étude concernant la quantification spécifique des génotypes A et B de *Giardia lamblia*. La spécificité de chaque système permet la quantification de population mixte de ces deux génotypes en suspension purifiée. Cette technique est également utilisée pour la détection de

Giardia lamblia dans les selles (Amar *et al.*, 2003 ; Verweij *et al.*, 2003 ; Verweij *et al.*, 2004). La PCR en temps réel permet surtout la quantification de spécifique de l'espèce *G. lamblia* et de ses génotypes dans les échantillons environnementaux (Guy *et al.*, 2003).

En comparaison avec la PCR qualitative conventionnelle, la PCR quantitative présente l'avantage majeur de quantifier l'ADN ou l'ARNm initialement contenus dans un échantillon, mais elle permet également de limiter de façon notable le temps de manipulation par l'absence d'étape de révélation et surtout elle limite le risque de contamination puisque les échantillons ne sont plus ouverts après amplification. De plus, cette technique autorise l'analyse simultanée de plus de 90 échantillons par l'utilisation de plaques à puits. Malgré ces nombreux avantages, la PCR en temps réel reste une technique coûteuse et délicate à mettre en oeuvre pour l'analyse d'échantillons environnementaux.

8.2- L'intérêt de ces techniques pour la détection de Giardia.

La PCR est une technique d'analyse directe de l'ADN qui permet d'éviter la sélection des génotypes entraînée par les techniques de dékystement et de multiplication *in vitro* (Hopkins *et al.*, 1997 ; Weiss *et al.*, 1992). Par rapport aux techniques conventionnelles de détection des kystes de *Giardia*, elle présente les avantages majeurs d'être rapide, sensible, reproductible et spécifique.

Quelques études indiquent de façon précise la sensibilité des techniques de PCR utilisées pour la détection ou la quantification de kystes de *Giardia* (tableau **14**). Ces techniques permettent d'atteindre une sensibilité équivalente à un kyste par puits de PCR en suspension purifiée. Leur sensibilité est par contre plus faible lors de l'analyse d'eaux de surface ou de boues résiduaires malgré une révélation des produits d'amplification par Southern-blot pour la PCR qualitative.

Tableau 14 : Sensibilité des techniques de biologie moléculaire pour la détection des kystes de *Giardia*

Type de prélèvement	Protocole de concentration-purification	Technique de détection	Sensibilité	Références
Suspensions purifiées de kystes	Aucun	PCR, Southern-blot	1 kyste/PCR	Mahbubani *et al.* (1991, 1992)
	Aucun	PCR	1 kyste/PCR	Abbaszadegan *et al.* (1997)
	Aucun	PCR, Southern-blot	1 à 10 kystes/PCR	Rochelle *et al.* (1997)
	Aucun	PCR quantitative	63 à 87 kystes/PCR	Johnson *et al.* (2003)
Concentrats d'eaux de surface		PCR, Southern-blot	5 à 50 kystes/PCR	Rochelle *et al.* (1997)
	IMS	PCR, Southern-blot	3 à 30 kystes.mL^{-1}	Mahbubani *et al.* (1998)
Eaux de surface	Filtration sur membrane, IMS	PCR qualitative	25 kystes.L^{-1}	Rimhanen-Finne *et al.* (2002)
Boues résiduaires	IMS	PCR, Southern blot	625 kystes.mL^{-1}	Rimhanen-Finne *et al.* (2001)

Lors de leur comparaison avec une détection par microscopie conventionnelle ou par immunofluorescence dans des échantillons de selles naturellement contaminées ou des eaux usées, les techniques de PCR qualitative et quantitative montrent une sensibilité équivalente ou supérieure à ces méthodes (tableau **15**). Ainsi, Mayer et

Palmer (1996) constatent une corrélation parfaite entre la détection par IFA et par PCR qualitative lors de l'analyse d'eaux usées brutes et d'eaux usées traitées.

Tableau 15 : Comparaison des techniques conventionnelles et de biologie moléculaire dans la détection des kystes de *Giardia*

Type de prélèvement	Technique	Pourcentage d'échantillons positifs		Références
Eaux usées brutes et traitées	PCR qualitative	100 %	(n = 22)	Mayer et Palmer (1996)
	Microscopie (IFA)	100 %		
Selles de bovins	PCR qualitative	44 %	(n = 513)	Trout *et al.* (2004)
	Microscopie (IFA)	40 %	(n = 407)	
Selles humaines	PCR qualitative	94 %	(n = 35)	Amar *et al.* (2002)
	Microscopie	100 %		
	PCR quantitative	81 %	(n = 138)	Verweij *et al.* (2003)
	Immunologie	78 %		
	Microscopie	75 %		
	PCR quantitative	11 %	(n = 92)	Amar *et al.* (2004)
	Microscopie	1,1 %		
	PCR quantitative	29 %	(n = 52)	Guy *et al.* (2004)
	Microscopie	29 %		
	PCR quantitative	100 %	(n = 20)	Verweij *et al.* (2004)
	Microscopie	100 %		

Outre leur rapidité, l'avantage majeur de ces techniques est leur spécificité puisqu'elles autorisent une détection spécifique d'espèce voire de génotype. Les techniques conventionnelles de coprologie, l'immunofluorescence et les techniques immunologiques permettent uniquement une détection au niveau du genre *Giardia*. Par contre, la PCR qualitative couplée ou non à la RFLP et la PCR quantitative permettent non seulement de détecter l'espèce *G. lamblia*, mais aussi les génotypes de cette espèce et notamment les assemblages A et B pathogènes pour l'Homme.

Plusieurs études récentes font appel à la PCR en temps réel non pas pour quantifier, mais pour détecter les génotypes A et B de *G. lamblia* dans des échantillons de selles humaines (Amar *et al.*, 2003 ; Guy *et al.*, 2004 ; Verweij *et al.*, 2003, 2004). Amar *et al.* (2003) associent ainsi une PCR qualitative à une PCR quantitative pour le génotypage de kystes isolés de selles. Les auteurs de ces différentes études n'utilisent pas cette technique pour quantifier les kystes, mais ils justifient son utilisation par sa sensibilité équivalente ou supérieure à la microscopie et surtout par sa rapidité ainsi que son utilisation pour la détection simultanée de plusieurs micro-organismes pathogènes (PCR multiplex).

8.3- L'estimation de la viabilité par les techniques de biologie moléculaire.

La RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) est adaptée à la détection d'ARNm par une étape de rétro-transcription permettant la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) qui est ensuite amplifié par PCR. L'interêt de cette technique pour l'estimation de la viabilité des kystes de *Giardia* est évaluée par plusieurs études. L'évaluation de la viabilité peut alors être basée soit sur l'induction, soit sur l'augmentation de la synthèse d'ARNm.

Ainsi, Mahbubani *et al.* (1991) font appel à la RT-PCR couplée à une détection par Southern-blot pour estimer la viabilité de kystes de *Giardia* ayant subi une induction du dékystement. L'étape de Southern-blot fait

intervenir une sonde radiomarquée et l'augmentation du signal est reliée à la stimulation de la synthèse de l'ARNm de la giardine. Les auteurs montrent que l'induction du dékystement entraîne une augmentation de synthèse de l'ARNm de la giardine pour des suspensions de kystes dont la viabilité est préalablement validée par microscopie et dékystement *in vivo*. Toutefois, la RT-PCR qualitative n'est pas la technique de choix pour réaliser une quantification de l'ARNm puisque les résultats ne correspondent pas à la quantité initiale d'ARNm et dépendent donc du rendement de l'amplification. En faisant appel à la RT-PCR quantitative, Maux (2003) observe un abattement de la quantité d'ARNm de la giardine sur des kystes inactivés par la chaleur (80°C, 1 heure). Malgré cet abattement, une détection est possible sur une durée de 40 jours. De plus, parmi les températures testées (65°C, 37°C et -20°C) aucune n'a montré d'effet inductif sur la synthèse de l'ARNm et elles ne peuvent être pas envisagées comme stimulus pour l'estimation de la viabilité des kystes de *Giardia*.

Abbaszadeggan *et al.* (1997) étudient l'induction de la synthèse de l'ARNm d'une protéine de choc thermique, l'HSP 70, pour l'évaluation de la viabilité des kystes de *Giardia* par RT-PCR. L'exposition des kystes viables à une température de 42°C pendant 20 minutes permet l'induction de la synthèse de l'ARNm. Par contre, pour les kystes tués par la chaleur ou par traitement au chlore, seul l'ADN de l'HSP 70 est détecté. Ainsi, d'après ces auteurs la détection d'ARNm de l'HSP 70 après un choc thermique peut suffire à la mise en évidence de la viabilité des kystes de *Giardia*. Toutefois, l'ADN ou l'ARNm de cette protéine n'ont pu être détectés par PCR ou RT-PCR par d'autres équipes (Kaucner et Stinear, 1998 ; Maux *et al.*, 2002).

Au final, l'utilisation des RT-PCR qualitative ou quantitative est une source de renseignements précieux quand à la persistance de l'ARNm. Actuellement, ces techniques se révèlent malheureusement soit difficilement reproductibles, soit peu efficaces pour l'estimation de la viabilité des kystes de *Giardia*.

8.4- La quantification de Giardia par PCR en temps réel.

Plusieurs études récentes concernent la quantification de bactéries (Bach *et al.*, 2002 ; Ibekwe et Grieve, 2003), virus (Donaldson *et al.*, 2002 ; Monpoeho *et al.*, 2001) et protozoaires notamment *Cryptosporidium* (Fontaine et Guillot, 2003) dans des prélèvements environnementaux. Par contre, les études qui décrivent l'utilisation de la PCR en temps réel pour la quantification des kystes de *Giardia* sont très récentes et encore peu nombreuses.

Ainsi, Johnson *et al.* (2003) développent deux PCR quantitatives variant par leur amorce sens et permettant la quantification spécifique des génotypes A et B de l'espèce *G. lamblia*. Les séquences des amorces sens sont basées sur la signature nucléotidique de l'ARNr mise en évidence par van Keulen *et al.* (1995). Les PCR sont évaluées tout d'abord sur des suspensions purifiées de trophozoïtes de chaque génotype, puis sur des suspensions mixtes. Toutefois, ces PCR quantitatives destinées à l'étude des génotypes A et B n'ont pas été évaluées sur des kystes de *Giardia* provenant d'échantillons environnementaux.

Par contre, Guy *et al.* (2003) développent deux PCR en temps réel, spécifiques des génotypes A et B de *G. lamblia*. Ces PCR sont destinées à la quantification de ces deux génotypes dans des prélèvements d'eaux usées et d'eaux de surface. Les auteurs développent également une PCR multiplex permettant la quantification simultanée de *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*. En effet, la PCR en temps réel permet la quantification simultanée de plusieurs cibles grâce à l'utilisation de sondes marquées par des fluorochromes différents (FAM,

VIC, HEX, JOE). Lors de ces travaux, la cible utilisée pour la quantification des kystes de *Giardia* est la β-giardine. Les résultats obtenus pour les génotypes A et B par PCR quantitative sont comparés aux concentrations obtenues par immunofluorescence. Les concentrations en kystes observées par ces deux techniques sont considérées comme similaires, toutefois cette comparaison n'est réalisée que sur six prélèvements d'eaux usées.

Au vu de ses nombreux avantages et malgré son coût élevé, cette technique de quantification par PCR en temps réel devrait se développer dans les années à venir notamment pour la mise en évidence des micro-organismes pathogènes dans les prélèvements biologiques et les échantillons environnementaux.

8.5- Les problèmes liés à l'analyse de prélèvements biologiques ou d'échantillons environnementaux.

8.5.1- Les problèmes d'inhibition.

L'analyse d'échantillons environnementaux pose le problème de l'obtention de faux résultats négatifs dus à la présence d'inhibiteurs. De nombreuses molécules sont considérées comme inhibitrices de l'amplification des acides nucléiques. Ainsi, les acides humiques et fulviques constituent la partie hydrophobe de la matière organique naturelle contenue dans les eaux et sont considérés comme les principales substances inhibitrices de la PCR (Abbaszadegan *et al.*, 1993 ; Mayer et Palmer, 1996). Les acides humiques sont stables à pH basique mais précipitent à pH acide alors que les acides fulviques restent en solution à pH acide (Abbaszadegan *et al.*, 1993). Les phénols qui proviennent de la biodégradation des substances humiques, des lignines et des tanins, mais aussi des plastiques et de la dégradation des pesticides et des herbicides issus de l'activité humaine peuvent jouer un rôle inhibiteur lors de l'analyse d'échantillons environnementaux (Guy *et al.*, 2003). L'EDTA, le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), le Triton X-100 et le NaCl sont également reconnus ou suspectés comme étant des molécules inhibitrices de la PCR (Kreader, 1996). Les ions divalents (Ca^{2+}, Mg^{2+}) auraient un effet inhibiteur supérieur aux ions monovalents (K^+, Na^+) (Abu Al-Soud et Radström, 1998). L'hémine, les sels biliaires et la bilirubine sont des substances inhibitrices lors de l'analyse de prélèvements biologiques (Kreader, 1996). Le formaldéhyde couramment utilisé lors de l'observation microscopique de kystes de *Giardia*, est également un inhibiteur de la PCR (Johnson *et al.*, 1995). De plus, il faut souligner que la PCR peut être inhibée par la présence de fortes concentrations d'ADN autre que l'ADN cible (Tebbe et Vahjen, 1993). Au final, l'effet inhibiteur de très nombreuses molécules est avéré ou fortement suspecté. Globalement, tout élément présent en excès dans le milieu réactionnel peut s'avérer inhibiteur des réactions d'amplification.

Les substances inhibitrices peuvent interférer à plusieurs niveaux lors de la détection des acides nucléiques dans les échantillons biologiques et les prélèvements environnementaux. Ainsi, elles peuvent inhiber l'étape de lyse des micro-organismes, interférer avec les acides nucléiques ou les dégrader, mais elles peuvent également inhiber l'enzyme d'amplification (ADN polymérase) (Abu Al-Soud et Radström, 2000 ; Wilson, 1997). Afin de limiter l'action des inhibiteurs, plusieurs procédés sont proposés soit pour éliminer ces molécules, soit pour masquer leur effet (tableau **16**).

Tableau 16 : Les procédés visant à limiter l'action des molécules inhibitrices lors de la détection de différents micro-organismes

Type de prélèvement	Inhibiteurs	Procédés		Commentaires	Références
		Avant l'amplification	Pendant l'amplification		
Eau souterraine	Acides humiques	Chromatographie sur colonne de Sephadex (G-50, G-100, G-200) Chelex-100		La combinaison la plus performante : Sephadex G-100 et Chelex-100.	Abbaszadegan *et al.* (1993)
Eau de surface	Acides humiques		BSA (10 $\mu g.mL^{-1}$), glycérol (5 %), DMSO (5 %), T4 Gene 32 (5 $\mu g.mL^{-1}$)	Molécule la plus efficace : BSA.	Rochelle *et al.* (1997)
		Cycles congélation-décongélation, billes magnétiques avec oligo$(dT)_{25}$ pour la purification de l'ARNm			Kaucner et Stinear (1998)
		Cycles congélation-décongélation, Chelex-100, IMS		L'IMS associée au Chelex-100 permet d'améliorer nettement le seuil de détection.	Lowery *et al.* (2000)
Eau usée	Acides humiques Acides fulviques		Double PCR, dilution des acides nucléiques	Augmentation de la sensibilité	Mayer et Palmer (1996)
	Phénols Acides humiques Acides fulviques	Cycles congélation-décongélation, ultra-sons, Chelex-100 (20 %), PVP-360 (2 %)	BSA (20 $ng.\mu L^{-1}$)	La PVP forme des complexes avec les molécules contenant un groupement phénolique.	Guy *et al.* (2003)
		Chromatographie sur colonne de Sephadex G-200		Augmentation de la sensibilité	Tsai *et al.* (1993)
Boues résiduaires	Composés organiques	PVP	T4 gene 32, PVP	L'utilisation de la PVP et de la protéine T4 Gene 32 permet d'améliorer les valeurs de Ct en PCR quantitative	Monpoeho *et al.* (2000)
Selles			16 molécules testées : Acétamide, Bétaïne, BSA, Dextran 40, Dextran 500, DMSO, Formamide, Glycérol, T4 Gene 32, Nonidet P-40, PEG 400, PEG 4000, Inhibiteurs de protéinases, CTMA, Tween 20, Tween 80	PCR qualitative : la BSA et la protéine T4 gene 32 sont les molécules les plus efficaces. Toutefois les résultats obtenus avec la T4 gene 32 s'avèrent peu reproductibles. PCR quantitative : la bétaïne est la molécule la plus efficace.	Abu Al-Soud et Radström (2000)
		PVP		Augmentation de la sensibilité	Lawson *et al.* (1997)
Sol	Métaux lourds Acides humiques	Extraction au phénol-chloroforme, précipitation à l'éthanol, Chromatographie sur colonne de Sephadex G-50, Chelex-100	Semi-nested PCR, double PCR	Combinaison la plus intéresssante : Chromatographie sur colonne de Sephadex G-50, Chelex-100, semi-nested-PCR.	Straub *et al.* (1995)

BSA : Bovine Serum Albumine ; DMSO : Diméthyle sulfoxide ; CTMA : Chlorure de tétraméthylammonium ; PEG : Polyéthylène glycol ; PVP : polyvinylpyrrolidone

La première catégorie de techniques vise à éliminer les molécules inhibitrices lors de la purification-concentration des micro-organismes ou plus généralement lors de l'extraction des acides nucléiques. La deuxième possibilité consiste généralement à faire intervenir, lors de l'amplification, des molécules pouvant masquer partiellement ou totalement l'effet des inhibiteurs.

Les techniques de purification des kystes en éliminant une partie des débris permettent de diminuer la concentration en inhibiteurs avant l'extraction de l'ADN. Ainsi, l'IMS qui s'est récemment développée peut permettre la récupération des kystes de *Giardia* ou des oocystes de *Cryptosporidium* et une élimination performante des inhibiteurs (Johnson *et al.*, 1995 ; Lowery *et al.*, 2000). Sur le même principe, Kaucner et Stinear (1998) utilisent des billes marqués par des séquences poly-T (oligo-d(T)n) pour la purification de l'ARNm suite à la lyse des kystes de *Giardia* par des cycles de congélation-décongélation. L'IMS a prouvé son efficacité pour des échantillons peu turbides, mais aussi ses limites lors de l'analyse d'échantillons fortement chargés. Cette technique dont le rendement peut être influencé par la composition du milieu est dans certains cas associée à une purification par des résines, notamment le Chelex-100 (Lowery *et al.*, 2000). En effet, les procédés visant à piéger les inhibiteurs de la PCR sur colonnes de Sephadex ou par utilisation de PVP (polyvinylpyrrolidone) et surtout de Chelex-100 semblent efficaces. Le Chelex-100 est une résine échangeuse d'ions capable de chélater les ions plurivalents (Mygind *et al.*, 2002). La PVP serait capable de piéger les molécules caractérisées par un groupement phénolique notamment les acides humiques (Guy *et al.*, 2003). Certains auteurs associent le Chelex-100 à des cycles de congélation-décongélation visant à rompre la paroi des kystes de *Giardia* et surtout des oocystes de *Cryptosporidium*, et ainsi à améliorer l'étape de libération des acides nucléiques (Fontaine et Guillot, 2003). De nombreuses publications récentes associent l'IMS, les cycles de congélation-décongélation et/ou l'emploi de Chelex-100 aux kits d'extraction des acides nucléiques dont certains sont destinés à l'analyse d'échantillons très chargés en matière organique (selles, sols) (Guy *et al.*, 2003 ; Sumlaiman *et al.*, 2004 ; Verweij *et al.*, 2003).

La deuxième voie d'optimisation consiste à agir au niveau de l'amplification des acides nucléiques. La BSA (Bovine Serum Albumin) et la protéine T4 Gene 32 apparaissent comme les molécules les plus efficaces pour masquer l'effet des inhibiteurs co-extraits avec l'ADN ou l'ARN. L'action de la BSA pourrait être expliquée par sa capacité à se lier aux inhibiteurs (Abu Al-Soud et Radström, 2000). La protéine T4 Gene 32 jouerait essentiellement un rôle lors de l'étape de rétro-transcription de l'ARNm en ADNc car elle augmenterait l'efficacité de la synthèse du brin d'ADN complémentaire (Chandler *et al.*, 1998). Malheureusement, la combinaison de ces molécules ne permet pas d'obtenir une synergie d'élimination des inhibiteurs (Abu Al-Soud et Radström, 2000). La BSA et la protéine T4 Gene 32 semblent n'avoir aucun effet sur l'inhibition due à la présence de NaCl (0,1 M), SDS (0,1 mM), Triton X-100 (100 %) et sels biliaires (1 à 10 $\mu g.\mu L^{-1}$) (Kreader, 1996).

La Taq polymérase peut être inhibée par une CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) en acides humiques de 0,1 $\mu g.mL^{-1}$ (Tebbe et Vahjen, 1993). Toutefois, certaines ADN polymérases présentent une résistance beaucoup plus importante vis-à-vis des acides humiques (Tebbe et Vahjen, 1993). Ainsi, Abu Al-Soud et Radström (1998) comparent neuf ADN polymérases et constatent que la sensibilité de la PCR aux inhibiteurs

varie suivant l'enzyme utilisée. Schwieger et Tebbe (1997) montrent une meilleure résistance de la PCR qualitative aux acides humiques en présence de T4 Gene 32, mais aussi suivant l'enzyme d'amplification utilisée.

Afin d'éviter l'obtention de faux négatifs, il est également possible soit de diluer l'échantillon, soit de réaliser une double amplification de l'ADN par semi-nested PCR, nested PCR, voire par double PCR. La dilution de l'échantillon peut dans certains cas poser un problème de sensibilité pour les échantillons contenant de trop faibles concentrations d'ADN cible (Rodgers *et al.*, 1993). L'emploi d'une double amplification est réalisée par certains auteurs lorsque les techniques testées en amont de la PCR se révèlent insuffisantes (Mayer et Palmer, 1996 ; Straub *et al.*, 1995). Toutefois, ce procédé présente le risque majeur d'entraîner de faux positifs suite à une contamination par de l'ADN amplifié.

Le problème majeur pour l'ensemble des techniques décrites ci-dessus reste le choix d'un protocole adapté à la nature de l'échantillon à analyser (eau potable, eau de surface, eau usée, boue) dont la composition physico-chimique est susceptible de varier d'un prélèvement à l'autre. Certaines équipes mettent alors en place un contrôle interne positif afin d'évaluer le niveau d'inhibition. Ainsi, Kaucner et Stinear (1998) utilisent un contrôle interne qui est une séquence oligonucléotidique amplifiée par des amorces distinctes de celles utilisées pour la détection des kystes de *Giardia*, afin de s'assurer de l'absence d'inhibition lors de leurs expérimentations. Globalement, le contrôle interne reste une technique peu employée pour la détection des kystes de *Giardia* par rapport à d'autres micro-organismes, notamment les virus. La plupart des auteurs évaluent le rendement de leur protocole par dopage d'échantillons environnementaux (Rimhanen-Finne *et al.*, 2001 et 2002) ou comparent les résultats de la PCR qualitative ou quantitative avec ceux obtenus par immunofluorescence (Guy *et al.*, 2003 ; Mayer et Palmer, 1996).

8.5.2- Les problèmes de spécificité.

La sélection d'amorces et de sondes nécessite de disposer d'un nombre suffisant de séquences pour que les expérimentations n'aboutissent pas à des résultats faussement positifs et à des conclusions erronées (Monis *et al.*, 2002). Ainsi Baruch *et al.* (1996) ont développé une PCR-RFLP en se basant uniquement sur des séquences appartenant aux génotypes A et B de *G. lamblia* et l'ont proposée pour l'étude épidémiologique de *Giardia*. Il s'est ensuite avéré que cette PCR-RFLP pouvait entraîner de faux positifs à partir de kystes appartenant à d'autres génotypes ou à d'autres espèces (Monis et Andrews, 1998). Ainsi l'utilisation de cibles séquencées pour un grand nombre d'isolats et la vérification de la spécificité des amorces et des sondes à partir des séquences disponibles dans les bases de données sont indispensables avant toute analyse d'échantillons environnementaux, afin de limiter le risque de faux positifs.

9- Les voies de contamination de Giardia.

9.1- Les mammifères en tant que réservoir de Giardia lamblia.

L'Homme, les animaux domestiques ou d'élevage et enfin les animaux sauvages constituent des réservoirs potentiels de *Giardia*. Les études concernant les animaux sont plus récentes et moins nombreuses. Ainsi, l'importance de chacune de ces sources est actuellement mal connue (Heitman *et al.*, 2002).

Giardia lamblia est considérée comme étant la seule espèce pathogène pour l'Homme, mais elle est également isolée chez les animaux domestiques et d'élevage. Les mammifères sauvages peuvent également être porteurs de *G. lamblia*, mais aussi des espèces *G. muris* et *G. microti* qui sont spécifiques des rongeurs (tableau **2**, page 6). Les génotypes A et B de *G. lamblia* sont pathogènes pour l'Homme, mais aussi pour d'autres mammifères. Dans notre étude concernant les différents réservoirs de *Giardia*, nous nous sommes intéressés à la prévalence de ce protozoaire pour l'ensemble des réservoirs potentiels, mais aussi aux résultats récents concernant le génotypage des isolats provenant de l'Homme et des animaux domestiques et d'élevage.

9.1.1.- Réservoir en milieu urbain.

9.1.1.1- *Giardia lamblia* chez l'Homme : prévalence et génotypage.

Les études concernant la détection de *G. lamblia* chez l'Homme en France (tableau **17**) aboutissent généralement à des prévalences faibles avec des cas particuliers suivant l'âge et la profession. Ainsi, chez l'adulte, la prévalence peut être estimée entre 1 et 3 %. Par contre, pour des professions plus exposées comme les égoutiers, la prévalence peut être plus élevée et atteindre 16,5 %. Le personnel de crèche ferait également partie d'une population à risque plus élevé de giardiose. Lors d'une étude réalisée dans une crèche, Dupouy-Camet *et al.* (1990) observent une prévalence de 35,5 % chez les enfants (n = 62) et constatent également que 20 % (n = 20) du personnel de cet établissement est porteur.

Tableau 17 : Prévalence de *Giardia lamblia* chez l'Homme en France

Population	Prévalence	Localisation	Références
Population globale	6 % (n = 10 000)	Gard	Fontaine *et al.* (1984)
Adultes	2,5 % (n = 300) 3,5 % (n = 300)	Rennes	Doby *et al.* (1983)
Hommes jeunes	1,6 % (n = 1 000)	Ile-de-France et régions ouest	Hernandez *et al.* (1997)
Sida déclaré avec diarrhée chronique	5,8 % (n = 51)	Lyon	Cotte *et al.* (1993)
Egoutiers	5 % (n = 56)	Brest	Lejeune *et al.* (1982)
	16,5 % (n = 54)	Rennes	Doby *et al.* (1983)
	5,5 % (n = 52)		
	3,5 % (n = 480)	Paris	Schlosser *et al.* (1999)
Emploi dans l'alimentation	0 % (n = 60)	Brest	Lejeune *et al.* (1982)
	2,9 % (n = 307)	Paris	Rousset *et al.* (1993)
	1,4 % (n = 363)	Paris	Schlosser *et al.* (1999)
Personnel de crèches	4,6 % (n = 86)	Paris	Rousset *et al.* (1993)
	20 % (n = 20)	Essonne	Dupouy-Camet *et al.* (1990)
Enfants (crèches)			
7 à 35 mois	35,5 % (n = 62)	Essonne	Dupouy-Camet *et al.* (1990)
Fratrie	9,4 % (n = 32)		

Le tableau **18** regroupe les valeurs de prévalence de *G. lamblia* chez les enfants et les adultes dans différents pays. Globalement la prévalence varie suivant le niveau d'hygiène du pays. Ainsi, dans les pays développés la prévalence est généralement comprise entre 1 et 5 %, alors qu'elle varie de 20 à 50 % dans les pays en voie de développement (Gendrel *et al.*, 2003). Toutefois, des études réalisés au Vietnam ou en Jamaïque relèvent des prévalences nettement inférieures à 20 %. Par contre, les populations vivant dans des conditions d'hygiène non satisfaisantes présentent des prévalences élevées chez les adultes (12,5 %) et surtout chez les enfants (32,1 %) (Meloni *et al.*, 1993).

Tableau 18 : Prévalence de *Giardia lamblia* chez l'Homme dans le reste du monde

Population	Localisation	Prévalence	Références
Population globale			
	Arabie Saoudite	28,5 % (n = 600)	Al-Tukhi *et al.* (1996)
	Brésil	33 % (n = 90)	Rocha *et al.* (1999)
	Inde	53,8 % (n = 78)	Kang *et al.* (1998)
	Inde	8,8 % (n = 330)	Traub *et al.* (2004)
	Italie	2 % (n = 300)	Capelli *et al.* (2003)
	Jamaïque	5,2 % (n = 328)	Lindo *et al.* (1998)
	Nouvelle-Zélande	7,5 % (n = 66)	Learmonth *et al.* (2003)
	Pacifique	1,2 % (n = 4941)	Small *et al.* (2003)
	Vietnam	3,2 % (n = 2522)	Verle *et al.* (2003)
Aucun signe clinique	Pays-Bas	3,3 % (n = 574)	de Wit *et al.* (2001)
Gastro-entérite		5,4 % (n = 857)	
Adultes			
	Arabie Saoudite	17,8 % (n = 492)	Al-Tukhi *et al.* (1996)
	Inde	30 % (n = 32)*	Kang *et al.* (1998)
Soldats	Afghanistan	12,94 % (n = 595)	Jalili et Cerven (1993)
20 à 80 ans, aborigènes	Australie	12,5 % (n = 24)	Meloni *et al.* (1993)
Résidents étrangers depuis plus de 2 ans	Népal	16 % (n = 77)	Shlim *et al.* (1999)
Enfants			
	Arabie Saoudite	76,8 % (n = 108)	Al-Tukhi *et al.* (1996)
0 à > 20 ans	Argentine	23 % (n = 396)	Guignard *et al.* (2000)
0 à 13 ans, aborigènes	Australie	32,1 % (n = 361)	Meloni *et al.* (1993)
< 5 ans, crèches	Australie	7,6 % (n = 353)	Read *et al.* (2002)
2 à 12 ans	Brésil	27,6 % (n = 127)	Souza *et al.* (2003)
0 à 6 ans, crèche	Brésil	63,3 % (n = 147) séroprévalence : 82 %	Guimaraes *et al.* (2002)
0 à 24 mois	Brésil	27,4 % (n = 157)*	Newman *et al.* (2001)
0 à 4 ans, crèche	Cuba	20 % (n = 365)	Nunez *et al.* (1999)
6 à 48 mois, crèche	Espagne	25,3 % (n = 170)	Rodriguez-Hernandez *et al.* (1996)
1 à 3 ans	Etats-Unis	7,1 % (n = 518)	Harter *et al.* (1982)
Enfants scolarisés	Gabon	25,1 % (n = 395)	Gendrel *et al.* (2003)
0 à 15 ans	Inde	> 60 % (n = 46)	Kang *et al.* (1998)
Bédouins,0 à 2 ans, asymptomatiques	Israël	28,5 % (n = 164)	Fraser *et al.* (1997)
0 à 2 ans	Jamaïque	5,1 % (n = 78)	Lindo *et al.* (1998)
Cancéreux sous chimiothérapie, 9 mois à 11 ans	Malaisie	6 % (n = 50)	Menon *et al.* (1999)
1 à 14 ans	Mexique	18,3 % (n = 1478)	Morales-Espinoza *et al.* (2003)
6 mois à 14 ans, fratrie d'enfants porteurs	Sénégal	32 % (n = 403)	Faye *et al.* (1997)

* : prévalence déterminée suite à l'analyse de plusieurs selles par patient

Comme nous l'avons précédemment constaté pour les études réalisées en France, les enfants présentent une prévalence plus élevée que les adultes. En Inde, Kang *et al.* (1998) observent une prévalence supérieure ou égale à 60 % chez les enfants jusqu'à 15 ans. Dans ce pays, Traub *et al.* (2004) montrent une prévalence plus élevée chez les enfants entre 0 et 15 ans, avec un pic de prévalence de 21 % pour les enfants âgés de 6 à 9 ans. Al-Tukhi *et al.* (1996) constatent que 76,8 % des enfants et 17,8 % des adultes sont porteurs de *Giardia* en Arabie Saoudite. Les prévalences sont généralement élevées chez les enfants, quelque soit le pays étudié. Ainsi, Guimaraes *et al.* (2002) observent une prévalence de 63,3 % pour 147 enfants brésiliens. En Espagne, Rodriguez-Hernandez *et al.* (1996) constatent que 25,3 % (n = 170) des enfants d'une crèche sont porteurs de *Giardia*.

Lors d'une étude réalisée sur deux ans, Read *et al.* (2002) ont constaté que pour 35 % des enfants porteurs de *Giardia* (n = 353), les selles étaient positives pour deux analyses au minimum. Malheureusement, la

détermination des génotypes n'a pas permis de montrer s'il s'agissait d'une giardiose chronique ou d'une nouvelle contamination.

La première étude concernant le génotypage de kystes isolés de selles humaines est publiée par Hopkins *et al.* en 1997. La majorité des résultats présentés dans le tableau **19** proviennent d'études publiées depuis 2000, ce qui souligne l'intérêt croissant pour une identification plus précise des isolats.

Tableau 19 : Génotypes de *Giardia lamblia* isolés chez l'Homme

Localisation	Cible	Technique	Génotype / Assemblage			Références
Allemagne	VSP, TSP, TSA, GDH	PCR-RFLP	42 % : A-I 50 % : A-II 8 % : B	*	n = 12	Karanis *et al.* (1998)
Australie	ARNr	Séquençage	92 % : B 8 % : A et B		n = 13	Hopkins *et al.* (1997)
		Electrophorèse allozymique	18 % : A-I 18 % : A-II 36 % : B-III 28 % : B-IV	*	n = 11	Andrews *et al.* (1998)
	ARNr	Séquençage	30 % : A 70 % : B		n = 23	Read *et al.* (2002)
	GDH	PCR-RFLP	12,5 % : A-I 12,5% : A-II 75 % : B		n = 8	Read *et al.* (2004)
Canada	β-giardine	PCR quantitative	20 % : A 60 % : B 20 % : A et B		n = 15	Guy *et al.* (2004)
Chine	TPI	Séquençage	66 % : B 33 % : A-I et B		n = 3	Lu *et al.* (1998)
	ARNr	Séquençage	50 % : A 50 % : B		n = 8	Yong *et al.* (2000)
Corée	ARNr	Séquençage	100 % : A	*	n = 7	Yong *et al.* (2000)
Etats-Unis	TPI	Séquençage	Epidémie : 100 % : B		n = 2	Sulaiman *et al.* (2003)
Grande-Bretagne	TPI	PCR-RFLP	Cas sporadiques : 27 % : A-II 64 % : B 9 % : A-II et B Epidémie dans une crèche : 100 % : B		n = 33 n = 21	Amar *et al.* (2002)
Inde	TPI	Séquençage	100 % : A		n = 10	Sulaiman *et al.* (2003)
Italie	ARNr β-giardine	Séquençage PCR-RFLP	80 % : A 20 % : B		n = 30	Caccio *et al.* (2002)
Mexique	VSP	PCR-RFLP	100 % : A-II	*	n = 19	Ponce-Macotela *et al.* (2002)
	GDH et VSP	PCR-RFLP	100 % : A-I	*	n = 26	Cedillo-Rivera *et al.* (2003)
Pays-Bas	TSA GDH	PCR-RFLP	60 % : A 40 % : B		n = 15	Homan *et al.* (1998)
	GDH	PCR-RFLP	50 % : A 50 % : B		n = 18	Homan et Mank (2001)
Pérou	TPI	Séquençage	24 % : A 76 % : B		n = 25	Sulaiman *et al.* (2003)

* = analyse après culture *in vitro* ou *in vivo*. TSA : antigène de surface des trophozoïtes / TSP : protéine de surface des trophozoïtes

Dans ce tableau, les données bibliographiques concernant le génotypage de *Giardia* isolés de selles humaines ont été reportées quel que soit le traitement subi par les kystes avant leur génotypage. Ainsi, pour cinq études, le génotypage est réalisé après multiplication des kystes en laboratoire. Or, ces méthodes peuvent

entraîner une sélection des génotypes présents initialement dans l'échantillon et peuvent donc être responsables de biais dans l'analyse des génotypes (paragraphe 5.6, page 20). En effet, parmi ces cinq études, trois identifient uniquement le génotype A.

Pour les 12 études réalisées directement sur des kystes isolés de selles et correspondant à des cas sporadiques, le génotype A est isolé dans 45 % des échantillons et le génotype B présente un pourcentage plus élevé puisqu'il est identifié pour 59 % des patients. La présence concomitante de deux génotypes chez un même patient est actuellement réportée pour seulement quatre études et concerne globalement un nombre de prélèvements assez faible (8 échantillons, 4 %). Ainsi, Hopkins *et al.* (1997) ont retrouvé les séquences de ces deux génotypes dans un seul échantillon (n = 13) et Lu *et al.* (1998) ont identifié les assemblages A-I et B dans une selle (n = 3). Plus récemment, Amar *et al.* (2002) ont isolé les sous-génotypes A-II et B dans trois échantillons (n = 33) et Guy *et al.* (2004) ont mis en évidence les génotypes A et B pour trois prélèvements (n = 15).

Seules deux études reportent des résultats de génotypage à partir d'échantillons provenant d'épidémies. L'étude portant sur le plus grand nombre de cas est réalisée par Amar *et al.* (2002) qui ont isolé uniquement l'assemblage B sur les 21 prélèvements de selles provenant d'une épidémie de giardiose dans une crèche en Grande-Bretagne décrite initialement par Linnane *et al.* (2001). Sulaiman *et al.* (2003) ont isolé l'assemblage B dans seulement deux isolats provenant d'une épidémie d'origine alimentaire aux Etats-Unis.

Actuellement, le nombre encore trop restreint d'études et d'échantillons, ne permet pas de déterminer si l'un de ses deux génotypes est plus fréquent, plus virulent ou présente une résistance plus importante aux traitements classiques par les nitro-5 imidazolés.

9.1.1.2- *Giardia lamblia* chez les animaux domestiques : prévalence et génotypage.

La plupart des études portant sur la prévalence de *Giardia lamblia* chez les animaux domestiques (chiens et chats) sont récentes (tableau **20**). Des prévalences supérieures à 10 % sont fréquemment observées quelque soit le pays concerné. Barutzki et Schaper (2003) ont ainsi montré que chez les chiens et les chats, *Giardia* est l'endoparasite dont la prévalence est la plus élevée. Bugg *et al.* (1999) constatent également que *Giardia* est le parasite intestinal le plus fréquent chez les chiens. Hackett et Lappin (2003) n'observent pas de différence de prévalence en présence ou en l'absence de diarrhées chez le chien.

Tableau 20 : Données bibliographiques concernant la prévalence de *Giardia* chez les animaux domestiques

Animal	Localisation	Prévalence	Références
Chiens	Allemagne	16,6 % (n = 8438)	Barutzki et Schaper (2003)
	Australie	17 % (n = 182)	Meloni *et al.* (1993)
		22,1 % (n = 421) < 6 mois : 11,4 % > 6 mois : 1,0 %	Bugg *et al.* (1999)
	Espagne	< 6 mois : 21.9 % (n = 105) > 6 mois : 10,8 % (n = 813)	Diaz *et al.* (1996)
	Etats-Unis	5,4 % (n = 130)	Hackett et Lappin (2003)
	Grande-Bretagne	11,1 % (n = 100)	Grimason *et al.* (1993)
	Inde	3 % par microsocpie / 20 % par PCR (n = 101)	Traub *et al.* (2003)
	Italie	21,3 % (n = 616)	Capelli *et al.* (2003)
Chats	Allemagne	12,6 % (n = 3167)	Barutzki et Schaper (2003)
	Australie	5 % par microscopie / 80 % par PCR (n = 40)	McGlade *et al.* (2002)

Le tableau **21** présente les données concernant le génotypage de kystes de *Giardia* isolés de chats et de chiens. La plupart des études détectent des kystes appartenant aux génotypes A et B, pathogènes pour l'Homme dans ces prélèvements. Toutefois, ces génotypes semblent moins fréquemment isolés que les génotypes C et D considérés comme spécifiques à ces animaux domestiques. Ces études, encore peu nombreuses, prouvent toutefois que ces animaux constituent un réservoir potentiel de kystes de *Giardia* pathogènes pour l'Homme et qu'une transmission zoonotique par ces animaux domestiques ne peut être totalement exclue.

Tableau 21 : Génotypes de *Giardia lamblia* isolés chez les animaux domestiques

Animal	Localisation	Cible	Technique	Génotype / Assemblage		Références
Chats	Australie	ARNr, GDH	Séquençage, PCR-RFLP	17 % : B-IV 17 % : C 66 % : D	n = 12	Read *et al.* (2004)
	Italie	ARNr	Séquençage	100 % : A	n = 1	Berrilli *et al.* (2004)
	Mexique	VSP	PCR-RFLP	100 % : A-II	n = 1*	Ponce-Macotela *et al.* (2002)
Chiens	Australie	ARNr	Séquençage	11 % : C et B 78 % : C 11 % : D	n = 9	Hopkins *et al.* (1997)
	Australie	ARNr, GDH	Séquençage, PCR-RFLP	11 % :A-I 22 % : B-IV 44 % : C 22 % : D	n = 9	Read *et al.* (2004)
	Etats-Unis	TPI	Séquençage	100 % : C	n = 15	Sulaiman *et al.* (2003)
	Inde	TPI	Séquençage	A et B	n = 32	Traub *et al.* (2003)
	Italie	ARNr	Séquençage	23,5 % : A ou A et C 76,5 % : C, D ou C et D	n = 17	Berrilli *et al.* (2004)
	Japon	GDH	Séquençage	100 % : D	n = 4	Abe *et al.* (2003)
	Mexique	VSP	PCR-RFLP	100 % : A-II	n = 2*	Ponce-Macotela *et al.* (2002)

9.1.2- Réservoir en milieu extra-urbain.

En milieu extra-urbain, le réservoir de kystes de *Giardia* peut être constitué soit par les animaux d'élevage, soit par les animaux sauvages. Bien entendu, les animaux d'élevage est un réservoir mieux connu que les animaux sauvages qui constituent un réservoir difficile à étudier et pour lesquels peu d'études sont publiées à l'heure actuelle.

9.1.2.1- *Giardia lamblia* chez les animaux d'élevage : prévalence et génotypage.

Le tableau **22** regroupe les données bibliographiques concernant la prévalence de *Giardia* chez les animaux d'élevage, les bovins constituant la majorité des études réalisées sur ces animaux.

Tableau 22 : Données concernant la prévalence de *Giardia* chez les animaux d'élevage (bovins, caprins, ovins et porcins)

	Localisation	Nombre de sites	Classe d'âge	Prévalence		Références
BOVINS	Australie	2	Veaux : 2 à 10 semaines	58 % (n = 36)		O'Handley *et al.* (2000)
	Canada	6	veaux adultes	22,7 % (n = 23) 0 % (n = 26)		Buret *et al.* (1990)
		6	< 6 mois > 6 mois	31 % (n = 25) 11 % (n = 54)		Olson *et al.* (1997a)
		20	0 à 24 semaines	73 % (n = 386)		Olson *et al.* (1997b)
		1	2 à 10 semaines	57 % (n = 28)		O'Handley *et al.* (2000)
		7 4	Veaux et adultes	20,27 % (n = 893) 46,53 % (n = 518)		Heitman *et al.* (2002)
		9	2 à 10 semaines	34 % (n = 495)		Appelbee *et al.* (2003)
		1	Veaux : 1 semaine 5 semaines 25 à 27 semaines	 0 % 85 % 21 %	(n = 20)	Ralston *et al.* (2003)
			Mères : Au vêlage 1 semaine après vêlage 25 à 28 semaines après vêlage	 10 % 15 % 0 %	(n = 20)	
	Etats-Unis	2	0 à 6 mois, avec diarrhées	100 % (n = 14)		Xiao *et al.* (1993)
		3	Vaches laitières Génisses (2 à 12 mois) Veaux (7 à 9 mois)	0 % (n = 24) 10,5 % (n = 19) 17,4 % (n = 23) 37,3 % (n = 118)		Fayer *et al.* (2000)
		109	0 à 6 mois 6 à 24 mois > 24 mois	20 % (n = 1135) 3,5 % (n = 810) 0,2 % (n = 998)		Wade *et al.* (2000)
		25	Adultes	6,5 % (n = 557)		Hoar *et al.* (2001)
		NR	0 à 6 mois, avec diarrhées	53 % (n = 19)		Hoet *et al.* (2003)
	Nouvelle-Zélande	13	0 à 8 semaines	40,6 % (n = 715)		Hunt *et al.* (2000)
		36	Veaux Adultes	10,5 % (n = 304) 4,5 % (n = 354)		Learmonth *et al.* (2003)
	Ouganda	5	Animaux sevrés et non sevrés	12 % (n = 50)		Nizeyi *et al.* (2002)
	Pays-Bas	1	< 1 mois 4 à 5 mois 2 mois à 2 ans	0,9 % (n = 112) 54,5 % (n = 22) 0,8 à 15,1 % (n = 125)		Huetink *et al.* (2001)
	Suède	75	Veaux laitiers, 0 à 3 mois Diarrhées Aucun signe clinique	 29 % (n = 146) 23 % (n = 124)		Björkman *et al.* (2003)
CAPRINS	Espagne	NR	NR	4 % (n = 574)		Diaz *et al.* (1996)
EQUINS	Canada	6	< 6 mois > 6 mois	0 % (n = 10) 25 % (n = 24)		Olson *et al.* (1997a)
	Etats-Unis	9	1 à 8 semaines 4 à 17 semaines 4 à 24 semaines 1 an > 1 an Juments	35 % (n = 20) 29 % (n = 17) 17 % (n = 29) 0 % (n = 24) 5 % (n = 18) 2 % (n = 18)	 9 % (n = 22) 17 % (n = 21) 28 % (n = 53)	Xiao et Herd (1994)
		16	Adultes de 4 à 24 ans	0 % (n = 91)		Johnson *et al.* (1997b)
OVINS	Canada	6	Agneaux sous la mère 2 à 8 mois Adultes	35,6 % (n = 73) 12,5 % (n = 58) 4,1 % (n = 74)		Buret *et al.* (1990)
		6	< 6 mois > 6 mois	57 % (n = 40) 9 % (n = 22)		Olson *et al.* (1997a)
	Espagne	NR	NR	6,26 % (n = 1165)		Diaz *et al.* (1996)
PORCINS	Canada	6	< 6 mois > 6 mois	3 % (n = 147) 18 % (n = 71)		Olson *et al.* (1997a)
		1	NR	18 % (n = 40)		Heitman *et al.* (2002)

Globalement, on constate que les prévalences sont nettement plus élevées chez les jeunes animaux que chez les adultes. Chez les jeunes bovins la prévalence varie de 10 à 50 % suivant les études, alors qu'elle est généralement inférieure à 10 % chez les bovins adultes. Ralston *et al.* (2003) observent une prévalence cumulée de 100 % sur un groupe de 20 veaux, c'est-à-dire que pour chaque animal au minimum une analyse s'est révélée positive pour *Giardia*. Xiao *et al.* (1993) ont également observé une prévalence cumulée de 100 % lors d'une étude réalisée aux Etats-Unis sur 47 veaux de moins de 20 semaines. Chez les ovins et les équins, la prévalence est également plus élevée pour les animaux de moins de six mois. Ainsi, Xiao et Herd (1994) observent une prévalence cumulée de 71 % pour des poulains âgés de 1 à 24 semaines.

Björkman *et al.* (2003) comparent les prévalences de *Giardia*, *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli* K99+, ainsi que des *Rotavirus* et *Coronavirus* chez des veaux laitiers et constatent que parmi ces cinq agents pathogènes, *Giardia intestinalis* présente la prévalence la plus élevée. Le tableau **23** présente les caractéristiques de l'excrétion des kystes de *Giardia* chez les bovins à partir du regroupement de plusieurs études (Olson *et al.*, 2004).

Tableau 23 : Caractéristiques de l'excrétion des kystes de *Giardia* chez les bovins (Olson *et al.*, 2004)

Tranche d'âge pour l'excrétion des kystes	2 à 10 semaines
Durée de l'excrétion des kystes	> 30 semaines
Age du bovin au pic d'excrétion	≈ 5 semaines
Age du bovin au début de la diarrhée	3 à 8 semaines
Durée de la diarrhée	1 à 2 semaines
Durée de l'excrétion des kystes à la période du vêlage	0 à 3 semaines

On constate que cette parasitose présente un pic d'excrétion chez les bovins âgés de cinq semaines. Toutefois, des pics de prévalence plus tardifs dus au mode d'élevage peuvent être observés. Lors de l'étude d'un troupeau de 386 veaux laitiers, Olson *et al.* (1997b) observent également une prévalence significativement plus faible (37 %) chez les animaux de moins de deux semaines par rapport aux veaux de 12 à 24 semaines (75 à 81 %). L'organisation de l'exploitation et le type d'élevage peuvent expliquer les différences observées entre les études ou les sites d'exploitation. Ainsi, Huetink *et al.* (2001) mettent en évidence des kystes de *Giardia* chez toutes les catégories d'âges dans une ferme laitière, mais observent un pic entre 4 et 5 mois. Ce pic de prévalence plus tardif que celui observé dans d'autres études pouvant être expliqué par le fonctionnement de l'exploitation car les veaux sont isolés en boxe jusqu'à l'âge de deux mois. Lors d'une étude réalisée au Canada dans des élevages bovins et laitiers, Heitman *et al.* (2002) constatent une prévalence plus faible dans les élevages laitiers. L'hypothèse principale pour expliquer cette différence de prévalence est la source d'alimentation en eau qui provenait essentiellement de captage souterrain pour les élevages laitiers.

Globalement, aucune corrélation ne semble pouvoir être montrée entre des symptômes diarrhéiques et l'excrétion de kystes de *Giardia* pour l'ensemble des animaux étudiés (Buret *et al.*, 1990 ; Hunt *et al.*, 2000 ; Xiao *et al.*, 1994). La durée d'excrétion de 30 semaines peut être expliquée par un passage à la chronicité chez certains animaux. Xiao *et al.* (1994) relèvent une durée d'excrétion de 1 à 16 semaines chez des poulains.

La quantité de kystes excrétés peut atteindre des valeurs relativement élevées puisque O'Handley *et al.* (2000) observent des concentrations comprises entre 839 à 3475 kystes.g^{-1} de selles chez des veaux de 2 à 10

semaines. Ralston *et al.* (2003) relèvent une excrétion moyenne de 2230 kystes.g^{-1} de selles chez des veaux. Olson *et al.* (1997b) indiquent une excrétion moyenne de 1180 kystes.g^{-1} de selles mais pouvant atteindre jusqu'à $2,7.10^5$ kystes.g^{-1} de selles chez ces animaux. Ils observent également un niveau d'excrétion plus important pour des veaux de 0 à 12 semaines que pour ceux 12 à 24 semaines.

Ralston *et al.* (2003) mettent en évidence une augmentation de la prévalence chez les bovins durant le vêlage et la semaine suivante, alors que le pourcentage devient nul pour les mêmes animaux 25 semaines après la mise bas. Xiao *et al.* (1994) observent également une prévalence plus élevée chez les juments venant de pouliner (28 %) qui pourrait être expliquée par une baisse de l'immunité. Dans les élevages, les mères pourraient alors être une source de contamination pour les jeunes animaux (Xiao *et al.*, 1994).

Les études portant sur le génotypage des kystes de *G. lamblia* isolés chez les animaux d'élevage, présentées dans le tableau **24**, sont très récentes, concernent exclusivement les bovins et montrent une nette prédominance du génotype E.

Tableau 24 : *Génotypes de Giardia lamblia* isolés chez les animaux d'élevage

Animal	Localisation	Cible	Technique	Génotype / Assemblage		Références
Bovins adultes						
	Australie	ARNr	Séquençage	20 % : A 80 % : E	n = 5	O'Handley *et al.* (2000)
		GDH	PCR-RFLP Séquençage	100 % : E	n = 16	Read *et al.* (2004)
		ARNr	Séquançage	100 % : E	n = 31	Becher *et al.* (2004)
	Canada	ARNr	Séquençage	20 % : A 80 % : E	n = 10	O'Handley *et al.* (2000)
		ARNr	Séquençage	2,5 % : A 97,5 % : E	n = 42	Appelbee *et al.* (2003)
	Etats-Unis	ARNr	PCR-RFLP	83 % : A 17 % : B	n = 6	Van Keulen *et al.* (2002)
		TPI	Séquençage	100 % : E	n = 7	Sulaiman *et al.* (2003)
Veaux						
	Australie	ARNr	Séquençage	100 % : E	n = 31	Becher *et al.* (2004)
	Etats-Unis	ARNr, TPI, β-giardine	Séquençage	15 % : A 85 % : E	n = 164	Trout *et al.* (2004)
	Italie	ARNr	Séquençage	100 % : E	n = 3	Berrilli *et al.* (2004)
	Nouvelle-Zélande	ARNr	Séquençage	54 % : A 46 % : B	n = 48	Learmonth *et al.* (2003)
	Ouganda	ARNr	Séquençage	100 % : A	n = 5	Graczyk *et al.* (2002)
	Pays-Bas	GDH	PCR-RFLP	55 % : A 45 % : ni A ni B	n = 9	Huetink *et al.* (2001)

D'après ces études, le génotype E est détecté dans 75 % des échantillons de selles de bovins (n = 377) et les génotypes A et B concernent 25% des prélèvements. Le génotype A est détecté dans 19 % des cas, par contre le génotype B n'est isolé que lors de deux études (Learmonth *et al.*, 2003 ; van Keulen *et al.*, 2002) et représente 6 % des isolats. Ainsi, les bovins peuvent constituer un réservoir potentiel de kystes de *Giardia* pathogènes pour l'Homme. Ils peuvent également être un réservoir de kystes pathogènes pour les autres animaux d'élevage mais aussi pour les animaux sauvages. Ainsi, Hoar *et al.* (2001) suggèrent que les bovins adultes ne représentent qu'un risque limité de contamination directe de l'environnement. Par contre, ils peuvent être la source primaire de

contamination pour les veaux qui vont éliminer des quantités beaucoup plus élevées de kystes dans l'environnement.

9.1.2.2- *Giardia lamblia* chez les animaux sauvages.

Plusieurs études essentiellement réalisées en Amérique du Nord ont mis en évidence la présence de kystes de *Giardia* dans les selles d'animaux sauvages. Ainsi, Roach *et al.* (1993) isolent des kystes de *Giardia* dans des selles de castors, rats musqués, coyotes, ours et loups au Nord du Canada. Le tableau **25** présente des valeurs de prévalence de *Giardia* observées pour des animaux sauvages.

Tableau 25 : Données concernant la prévalence de *Giardia* chez les animaux sauvages

Animal	Prévalence	Localisation	Références
Bison	14,6 % (n = 41)	Canada	Heitman *et al.* (2002)
Elan	15,8 % (n = 38)	Canada	Heitman *et al.* (2002)
Canard sauvage	28 % (n = 69)	Etats-Unis	Kuhn *et al.* (2002)
Castor	Selles : 9,2 % (n = 662) Muqueuse intestinale : 13,7 % (n = 302)	Etats-Unis	Erlandsen *et al.* (1990)
	10 % (n = 94)	Canada	Dixon *et al.* (1997)
	8,68 % (n = 334)	Canada	Heitman *et al.* (2002)
Rat musqué	Selles : 36,6 % (n = 790) Muqueuse intestinale : 95,9 % (n = 219)	Etats-Unis	Erlandsen *et al.* (1990)
	75,2 % (n = 176)	Allemagne	Karanis *et al.* (1996)
	78,26 % (n = 23)	Canada	Heitman *et al.* (2002)

Erlandsen *et al.* (1990) reportent des études ayant mis en évidence des prévalences comprises entre 3,4 et 18 % chez le castor et entre 0 et 70 % chez le rat musqué, mais ces études avaient été réalisées uniquement sur des échantillons de selles prélevés dans l'environnement. La détection de trophozoïtes sur la muqueuse intestinale révèle des prévalences plus élevées chez les castors et les rats musqués par rapport à l'analyse des selles. En effet, la prévalence est alors proche de 100 % chez les rats musqués et les auteurs estiment la quantité de kystes excrétés par cette espèce à 10^5 kystes.g^{-1} de selles. Ces mammifères aquatiques pourraient donc jouer un rôle non négligeable dans la contamination des eaux de surface (Erlandsen *et al.*, 1990).

Lors d'une étude réalisée sur des canards sauvages, Kuhn *et al.* (2002) ont conclu que les kystes excrétés par ces animaux n'appartenaient pas à l'espèce *Giardia lamblia* suite à l'absence d'amplification par deux PCR qualitatives ciblant les gènes de la giardine et de la HSP (Heat Shock Protein), toutefois aucun résultat de séquençage n'est publié pour ces travaux. Lors de l'analyse de selles d'oies sauvages provenant de neuf sites distincts aux Etats-Unis, Graczyck *et al.* (1998) isolent des kystes de *Giardia* dans la totalité des prélèvements. L'excrétion est estimée à 436 kystes.g^{-1} dans des selles de canards sauvages (Kuhn *et al.*, 2002).

D'après les études concernant le génotypage de kystes provenant d'animaux sauvages (tableau **26**), ces animaux peuvent constituer un réservoir de kystes de *Giardia lamblia* potentiellement pathogènes pour l'Homme.

Tableau 26 : Détermination des génotypes et des espèces chez des animaux sauvages

Animal	Localisation	Cible	Technique	Génotype ou espèce		Références
Castors	Etats-Unis	TPI	Séquençage	100 % : B	n = 7	Sulaiman *et al.* (2003)
Gorilles	Ouganda	ARNr	Séquençage	100 % : A	n = 2	Graczyk *et al.* (2002)
Rats musqués	Etats-Unis	TPI	Séquençage	62,5 % : B 37,5 % : *Giardia microti*	n = 8	Sulaiman *et al.* (2003)

9.2- Contamination de l'environnement.

9.2.1- Les eaux usées et les boues.

9.2.1.1- Contamination des eaux usées brutes.

Les valeurs concernant la contamination des eaux usées brutes en Europe, en Amérique du Nord et dans divers pays sont présentées dans le tableau **27**. Globalement, les pourcentages d'échantillons positifs sont compris entre 37 % et 100 %, mais la majorité des études observent des kystes dans la totalité des prélèvements. Les concentrations en kystes sont élevées et généralement comprises entre 10^2 et 10^4 kystes.L^{-1}. Toutefois, certains auteurs notent des concentrations inférieures à 10 kystes.L^{-1}, alors que d'autres observent des concentrations atteignant $5{,}2.10^4$ kystes.L^{-1}. Une partie des variations observées entre les différentes études peut être expliquée par le protocole d'analyse. Roberston *et al* (2000) observent ainsi des concentrations comprises entre 10^3 et 10^4 kystes.L^{-1} avec le protocole utilisant uniquement une centrifugation et aucune étape de purification, alors que les concentrations s'échelonnent entre 10 et 10^4 kystes.L^{-1} et sont généralement inférieures ou égales à 10^3 kystes.L^{-1} pour les protocoles utilisant une ou deux étapes de purification.

Des variations horaires et surtout saisonnières des concentrations sont constatées par certains auteurs. Gassman et Schwartzbrod (1991) observent un pic à 10 h, par contre Bukhari *et al.* (1997) ne montrent pas de variation au cours de la journée. Des concentrations plus élevées en kystes de *Giardia* sont généralement observées durant la saison froide ou au début du printemps (Gassman et Schwartzbrod, 1991 ; Sykora *et al.*, 1991 ; Wiandt *et al.*, 1995 et 1998). Ces variations pourraient être en partie expliquées par une survie plus longue des kystes aux basses températures.

Concernant la viabilité des kystes dans ces eaux usées brutes, Wallis *et al.* (1996) observent 38,9 % de kystes qui seraient potentiellement viables par marquage au PI et 22,2 % qui sont infectieux par inoculation à des gerbilles. Des études récentes se sont intéressées à la présence des génotypes pathogènes pour l'Homme dans ces eaux usées. Ainsi, Caccio *et al.* (2003) mettent en évidence la présence des génotypes A et/ou B dans des eaux usées prélevées dans quatre stations d'épuration. Guy *et al.* (2003) quantifient les génotypes A et B dans des eaux usées par PCR en temps réel et montrent la présence de ces deux assemblages dans six échantillons prélevés dans deux stations. Lors de l'analyse de 131 prélèvements d'eaux usées, Sulaiman *et al.* (2004) mettent en évidence les génotypes A et B dans 85 % et 15 % des cas respectivement.

Tableau 27 : Niveau de contamination des eaux usées brutes en kystes de *Giardia*

Localisation	Protocole de concentration et purification des kystes	Technique de détection	Pourcentage d'échantillons positifs	Concentration (kystes.L^{-1})	Références
Europe					
France	Floculation au carbonate de calcium ou filtration sur cartouche en polypropylène, méthode de Bailenger	IFA	100 % (n = 38)	$2,3.10^2$ à $2,5.10^4$	Wiandt *et al.* (1995)
	Floculation au carbonate de calcium, méthode de Bailenger	IFA	100 % (n = 26)	$2,3.10^2$ à $2,5.10^4$ m = $4,37.10^3$	Grimason *et al.* (1996)
	Floculation au sulfate d'aluminium, méthode de Bailenger	IFA	100 % (n = 20)	$1,78.10^2$ à $8,03.10^3$	Wiandt *et al.* (1998)
Italie	Filtration sur toile de porosité 300 µm, filtration sur membrane en acétate de cellulose, centrifugation (4620 g, 10 min)	IFA	100 % (n = 16)	$2,1.10^3$ à $4,2.10^4$	Caccio *et al.* (2003)
Grande-Bretagne	Filtration sur gaze, centrifugation (1500 g, 15 min), flottation sur solution de saccharose (d : 1,18), clarification à l'éther.	IFA	70 à 90 % (n = 80)	10 à $1,3.10^4$	Bukhari *et al.* (1997)
	Centrifugation (1500 g, 15 min)	IFA	100 % (n = 42)	$1,1.10^3$ à $5,2.10^4$	Robertson *et al.* (2000)
Amérique du Nord					
Etats-Unis	Filtration sur cartouche en polypropylène, centrifugation, flottation sur solution de citrate de potassium (d : 1,16)	IFA	100 %	0,7 à $1,9.10^2$ m = 51	Rose *et al.* (1988)
	Centrifugation	Lugol	100 %	6 à $1,4.10^4$	Jakubowski *et al.* (1991)
	Centrifugation (600 g, 3 min)	Lugol	100 %	4 à $1,4.10^4$	Sykora *et al.* (1991)
	Centrifugation (2450 g, 10 min), flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d: 1,10)	IFA	NR (n = 11)	m = $1,3.10^4$	Mayer et Palmer (1996)
	Centrifugation, flottation sur solution de citrate de potassium	IFA	100 % (n = 12)	1.10^2 à $1,3.10^4$	Rose *et al* (1996)
Canada	Centrifugation (500 g, 10 min)	IFA	100 % (n = 8)	$2,6.10^1$ à $3,2.10^3$	Roach *et al.* (1993)
	Centrifugation (650 g), flottation sur solution de Percoll™ ou de saccharose	IFA	72,6 % (n = 1 760)	Généralement inférieure à 1.10^3, mais jusqu'à $8,8.10^4$	Wallis *et al.* (1996)
	Centrifugation (3000 g, 30 min), flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,12)	IFA	100 % (n = 79)	1.10^2 à $9,2.10^3$	Payment *et al.* (2001)
	Centrifugation (800 g, 10 min)	IFA	48,8 % (n = 166)	NR	Heitman *et al.* (2002)
	Centrifugation (12000 g, 15 min)	IFA PCR quantitative	100 % (n = 6)	$2,4.10^3$ à $9,9.10^3$ $2,6.10^3$ à $1,3.10^4$	Guy *et al.* (2003)
Pays divers					
Afrique du sud	Décantation	IFA	50 %	Valeur maximale : $1,8.10^2$	Kfir *et al.* (1995)
Kenya	Centrifugation (1050 g, 5 min)	IFA	37 % (n = 71)	$1,0.10^3$ à $2,5.10^4$ m = 3.10^3	Grimason *et al.* (1996)
Israel	Filtration sur cartouche en polypropylène, flottation sur solution de citrate de potassium	IFA	75 % (n = 4)	Valeur maximale : 3.10^2	Zuckerman *et al.* (1997)

9.2.1.2- Contamination des boues résiduaires.

Quelques études (tableau **28**) sont menées sur les boues résiduaires, dans certains cas en parallèle de l'analyse d'eaux usées (Chauret *et al.*, 1999 ; Rose *et al.*, 1996). Les modes d'expression des résultats et les disparités au niveau du type de boues analysées suivant les études rendent délicate la comparaison des concentrations en kystes de *Giardia*. Toutefois, on constate qu'une majorité de prélèvements voire la totalité contient des kystes de *Giardia* avec des concentrations pouvant atteindre des valeurs élevées de l'ordre de 10^6 kystes.g^{-1} de boues. Ainsi, Hu *et al.* (1995) détectent $2,5.10^4$ kystes.g^{-1} de boues secondaires, Thiriat *et al.* (1997) et Soares *et al.* (1994) reportent respectivement des concentrations maximales de $8,7.10^4$ et $3,3.10^4$ kystes.g^{-1} de boues primaires.

Très peu d'études apportent des renseignements concernant la viabilité de ces kystes, ainsi Thiriat *et al.* (1997) détectent seulement 1 à 3 % de kystes viables par utilisation de DAPI, PI et DIC.

Tableau 28 : Niveau de contamination des boues en kystes de *Giardia*

Pays	Prélèvement	Echantillons positifs (%)	Concentration	Références
Australie	Boues secondaires	100 % (n = 3)	m = $2,5.10^4$ kystes.g^{-1}	Hu *et al.* (1995)
	Boues après digestion anaérobie	100 % (n = 5)	m = $7,4.10^4$ kystes.g^{-1}	
	Boues deshydratées	100 % (n = 2)	m = $3,4.10^3$ kystes.g^{-1}	
Canada	Boues mixtes	100 % (n = 4)	< $2,5.10^1$ à $1,18.10^3$ kystes.100 g^{-1}	Chauret *et al.* (1999)
	Boues après digestion anaérobie mésophile et déshydratation	100 % (n = 4)	< $2,5.10^1$ à $2,82.10^3$ kystes.100 g^{-1}	
Etats-Unis	Sortie de station	80 % (n =127)	7.10^1 à 3.10^4 kystes.L^{-1}	Sykora *et al.* (1991)
	Boues primaires et secondaires	100% (n = 12)	$7,73.10^2$ à $3,3.10^4$ kystes.g^{-1}	Soares *et al.* (1994)
	Boues après digestion anaérobie mésophile (35°C)	100 % (n = 13)	$1,03.10^3$ à $4,14.10^4$ kystes.g^{-1}	
	Boues brutes	50 %	m = $2,8.10^2 \pm 4,8.10^2$ kystes.g^{-1}	Rose *et al.* (1996)
	Sortie de station (épaississement chimique, digestion, déshydratation)	25 %	m = 35 kystes.g^{-1}	
	Boues après 10 semaines de compostage	44 % (n = 16)	0 à 3 kystes.450 mg^{-1}	Rimhanen-Finne *et al.* (2004)
	Sortie de station (30 semaines de compostage, chaulage)	35 % (n = 18)	0 à 1 kystes.450 mg^{-1}	
Finlande		20 % (n = 44)	NR (PCR qualitative)	Rimhanen-Finne *et al.* (2001)
France	Boues primaires	100 % (n = 6)	$0,9.10^4$ à $8,7.10^4$ kystes.g^{-1}	Thiriat *et al.* (1997)
	Boues après digestion anaérobie mésophile (35°C)	100 % (n = 4)	$3,1.10^4$à $5,3.10^4$ kystes.g^{-1}	

L'efficacité du traitement des boues sur l'élimination des kystes de *Giardia* est abordée dans le paragraphe 10.2.2.2.

9.2.1.3- Contamination des eaux usées épurées.

Quelques études reportent des données de concentration en kystes de *Giardia* pour des eaux en sortie de station d'épuration (tableau **29**). Globalement, de 15 à 100 % des échantillons sont positifs et les concentrations présentent des variations importantes entre les études mais aussi entre les prélèvements pour une même étude. Les concentrations en kystes de *Giardia* sont généralement inférieures à 1.10^2 kystes.L^{-1}, mais des valeurs plus élevées de l'ordre de $3,5.10^3$ et $1,5.10^4$ kystes.L^{-1} sont observées par certains auteurs

(Roach *et al.*, 1993 ; Roberston *et al.*, 2000). Les eaux usées épurées peuvent donc constituer une voie de contamination relativement importante pour les eaux de surface dans lesquelles elles sont rejetées. Concernant la viabilité, Wallis *et al.* (1996) constatent que 7,6 % des kystes provenant de ces eaux sont infectieux par inoculation à des gerbilles. Garcia *et al.* (2002) évaluent à 26 % la proportion de kystes qui seraient viables par marquage au PI. Lors de l'inoculation à des gerbilles, de kystes provenant d'effluents primaires et d'eaux épurées en sortie de station, ces auteurs observent que seuls les kystes provenant des effluents primaires sont capables de provoquer une giardiose chez ces rongeurs. L'efficacité des différentes étapes du traitement d'épuration est abordée dans le paragraphe 10.2.2.1.

Tableau 29 : Concentration en kystes de *Giardia* dans les eaux usées épurées

Localisation	Pourcentage d'échantillons positifs	Concentration (kystes.L^{-1})	Références
Europe			
France	23 % (n = 13)	1,2	Wiandt *et al.* (1995)
	44 % (n = 16)	0,1 à 2,5 / m = 1	Grimason *et al.* (1996)
	80 % (n = 20)	1 à $1,1.10^2$	Wiandt *et al.* (1998)
Grande-Bretagne	15,4 à 91,7 % (n = 84)	10 à $7,2.10^2$	Bukhari *et al.* (1997)
	NR (n = 42)	7 à $1,5.10^4$	Robertson *et al.* (2000)
Amérique du Nord			
Canada	100 % (n = 5)	2 à $3,5.10^3$	Roach *et al.* (1993)
	100 % (n = 79)	2 à $8,9.10^2$	Payment *et al.* (2001)
Etats-Unis	40 %	m = 1,3	Rose *et al.* (1988)
	44 %	< 1 à 44	Sykora *et al.* (1991)
	NR (n = 10)	m = 11	Mayer et Palmer (1996)
Pays divers			
Afrique du sud	30 %	m = 120 valeur maximale = $3,9.10^2$	Kfir *et al.* (1995)
Kenya	100 % (n = 10)	21 à 90 / m = 34	Grimason *et al.* (1996)

9.2.2- Les eaux de surface.

De nombreuses études sont réalisées sur les eaux de surface (tableau **30**). Les pourcentages d'échantillons positifs présentent de grandes variations suivant les études et s'échelonnent de 6,7 à 100 % pour une détection par immunofluorescence. Lorsque les eaux analysées reçoivent des rejets urbains ou agricoles, les pourcentages d'échantillons positifs sont généralement plus élevés. Ainsi, Rose *et al.* (1991) constatent que les pourcentages d'échantillons positifs sont trois à quatre fois plus importants pour des eaux de rivière ou de lac recevant des rejets urbains ou agricoles que pour des eaux protégées.

Pour les échantillons positifs, les concentrations sont généralement comprises entre 10^1 et 10^2 kystes.100 L^{-1}. Toutefois, certains auteurs observent des concentrations plus élevées de l'ordre de 10^6 kystes.100 L^{-1}. Pour certaines études, ces valeurs sont expliquées par un rejet d'eau usée non traitée à proximité du site de prélèvement (Alame *et al.*, 1998 ; Hachich *et al.*, 2004 ; Ho et Tam, 1998a).

Tableau 30 : Niveau de contamination des eaux de surface en kystes de *Giardia*

Localisation	Type de prélèvement	Protocole de concentration et purification des kystes	Technique de détection	Rejets urbains	Rejets agricoles	Pourcentage d'échantillons positifs	Concentration en kystes	Références
Europe								
Allemagne	Rivières	Filtration sur cartouche en polypropylène, flottation sur saccharose (1,5 M d :)	IFA	NR	NR	83,3 % (n = 12)	2 à 1.10^2 kystes.100 L^{-1}	Karanis *et al* (1996)
France	Rivières	Filtration sur membrane d'acétate de cellulose	IFA	Oui	NR	64,5 % (n = 31)	2 à $9,6.10^2$ kystes.L^{-1}	Alame *et al.* (1998)
Finlande	Rivières, lacs et site de captage	Filtration sur membrane en polycarbonate, séparation immunomagnétique	PCR	NR	NR	1,8 % (n = 54)	NR	Rimhanen-Finne *et al.* (2002)
	Rivières et lacs	Filtration sur membrane en polycarbonate, séparation immunomagnétique	IFA, PCR	NR	NR	13,7 % (n = 139)	NR	Hörman *et al.* (2004)
Grande-Bretagne	NR	Filtration sur cartouche en polypropylène, flottation sur solution de saccharose,	IFA	NR	NR	46,6 % (n = 58)	m = 0,14 kyste.L^{-1}	Gilmour *et al.* (1991)
Italie	Rivière	Filtration sur cartouche en polypropylène, flottation sur solution de Percoll™-saccharose (US-EPA, 1995)	IFA	Oui	Oui	100 % (n = 11)	10 à $5,6.10^2$ kystes.100 L^{-1} m = $1,4.10^2$ kystes.100 L^{-1}	Bertolucci *et al.* (1998)
Norvège	Lacs et rivières	Filtration sur membrane, séparation immunomagnétique	IFA	Fonction du site	Fonction du site	11,8 % (n = 408)	1 à 4 kystes.10 L^{-1}	Robertson et Gjerde (2001b)
Amérique du Nord								
Canada	Eau de surface	Filtration sur cartouche en polypropylène, sonication, flottation sur solution de Percoll™ -saccharose (d : 1,10)	IFA	Oui	Oui	81,2 % (n = 85)	4.10^{-2} à 66 kystes.L^{-1} m = 2,77 kystes.L^{-1}	LeChevallier *et al.* (1991a)
	Eau de surface		IFA	Oui	NR	32 % (n = 22)	NR	Roach *et al.* (1993)
	Eau de surface		IFA	Fonction du site	Fonction du site	20,9 % (n = 1173)	Généralement < 2 kystes.L^{-1}	Wallis *et al.* (1996)
		Centrifugation (3000 g, 30 min), flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,12)	IFA	Fonction du site	Fonction du site	60 % (n = 391)		Payment *et al.* (2000)
Etats-Unis	Rivière Rivière Lac	Filtration sur cartouche en polypropylène, centrifugation, flottation sur solution de citrate de potassium (d : 1,16)	IFA	Oui Oui Non	Oui Non Non	90,4 % (n = 21)	1,2 kystes.L^{-1} $3,5.10^{-1}$ kystes.L^{-1} 9.10^{-3} kystes.L^{-1}	Rose *et al.* (1988)
	Rivière Lac		IFA	Oui Non Oui Non	Oui Non Oui Non	26,3 % (n = 38) 6,7 % (n = 59) 33,3 % (n = 24) 11,7 % (n = 34)	m = 11 kystes.100 L^{-1} m = 0,35 kyste.100 L^{-1} m = 6,5 kystes.100 L^{-1} m = 0,5 kyste.100 L^{-1}	Rose *et al.* (1991)
	Rivière	Filtration sur cartouche en polypropylène, flottation sur solution de Percoll™-saccharose (US-EPA, 1995)	IFA	Oui	NR	100 % (n = 12)	13 à $6,5.10^3$ kystes.100 L^{-1}	Gibson *et al.* (1998)

Tableau 30 (suite) : Niveau de contamination des eaux de surface en kystes de *Giardia*

Localisation	Type de prélèvement	Protocole de concentration et purification des kystes	Technique de détection	Rejets urbains	Rejets agricoles	Pourcentage d'échantillons positifs	Concentration en kystes	Références
Pays divers								
Afrique du sud	Eau de surface	Filtration sur membrane (p : 1,2 µm), sonication	IFA	NR	NR	55 % (n = NR)	0 à 4,6.10^2 kystes.10 L^{-1} m = 30 kystes.10 L^{-1}	Kfir *et al.* (1995)
Brésil	Eau de surface	Floculation au carbonate de calcium	IFA	Oui	Oui	27 % (n = 278)	0 à 5,2.10^2 kystes.L^{-1}	Hachich *et al.* (2004)
Chine (Hong-Kong)	Rivières	Floculation carbonate de calcium, flottation sur solution de Percoll-saccharose	IFA	NR	NR	Site 1 : 50 % (n=3) Site 2 : 66 % (n=3)	1,9.10^2 à 2,8.10^2 kystes.L^{-1} 9 kystes.L^{-1}	Ho *et al.* (1995)
Chine (Hong-Kong)	Rivières	Flocculation au carbonate de calcium, flottation sur solution de Percoll-saccharose	IFA	Oui	Oui	Site 1 : 100 % (n=52) Site 2 : NR	10 à 4,7.10^2 kystes.L^{-1} 0 à 1.10^2 kystes.L^{-1}	Ho et Tam (1998a)
Israel	Rivière, sources	Filtration sur cartouche en polypropylène, flottation sur solution de citrate de potassium (d : 1,3)	IFA	Oui	Oui	42,8 % (n = 14)	5 à 78,3 kystes.100 L^{-1}	Zuckerman *et al.* (1997)
Japon	Rivière		IFA			92 % (n = 13)	40 à 5,8.10^2 kystes.1 000 L^{-1} m = 1,7.10^2 kystes.1 000 L^{-1}	Hashimoto *et al.* (2000)
Malaisie	Rivières	Filtration sur cartouche en polypropylène, flottation sur solution de saccharose	IFA	Oui Oui	Oui Oui	90 % (n = 10) 90 % (n = 10)	21,4 ± 17,7 kystes.L^{-1} 2,7 ± 2,7 kystes.L^{-1}	Ahmad *et al.* (1997)
Taiwan	Rivière	Filtration sur cartouche en polycarbonate ou en polyéthersulfone, IMS	IFA	Oui	Oui	80 %	11,4 ± 4,0 kystes.100 L^{-1}	Hsu et Yeh (2003)

Comme pour l'ensemble des échantillons environnementaux, très peu d'études reportent des valeurs concernant la viabilité des kystes dans les eaux de surface. Ainsi, LeChevallier *et al.* (1991a) constatent que 12,8 % des kystes peuvent être considérés comme viables par microscopie DIC. Wallis *et al.* (1996) montrent que seulement 2,2 % des kystes sont infectieux par inoculation à des gerbilles.

Si les eaux de surface contiennent globalement des concentrations de kystes de *Giardia* relativement faibles, ces études montrent qu'il existe un risque de contamination par la voie hydrique si le traitement de potabilisation de ces eaux ne permet pas une élimination efficace des kystes.

9.2.3- Les eaux récréationnelles.

Peu d'études rapportent des valeurs de concentration en kystes de *Giardia* dans les eaux récréationnelles (tableau **31**). Fournier *et al.* (2002) ne détectent pas de kyste de *Giardia* lors de l'analyse d'eau prélevée dans six piscines. En France, les piscines municipales utilisent l'eau potable du système de distribution et sont équipées d'un système associant une filtration et une désinfection par le chlore, le brome ou l'ozone. Si aux Etats-Unis, des épidémies dans des piscines ont mis en cause une contamination fécale associée à une déficience de la désinfection, l'étude de Fournier *et al.* (2002) montre qu'en France le risque de contamination par ce type d'eau reste limité. Ho et Tam (1998b) détectent des kystes de *Giardia* dans 41 % des eaux de mer autorisées pour la baignade, à des concentrations généralement inférieures à 10 kystes par litre. Toutefois, la viabilité de ces kystes n'est pas évaluée dans cette étude et le risque lié à la baignade reste difficile à estimer.

Tableau 31 : Concentrations en kystes de *Giardia* dans les eaux récréationnelles

Localisation	Sites de prélèvement		Pourcentage d'échantillons positifs	Concentrations en kystes	Références
France	Piscines (n = 6)		0 % (n = 48)		Fournier *et al.* (2002)
Grande-Bretagne	Lacs, rivières		85,2 % (n = 27)	1,74 kystes.L^{-1}	Gilmour *et al.* (1991)
Hong-Kong	Eau de mer	< 24 *E. coli* .100 mL^{-1}	7,1 % (n = 14)	0 à 1 kyste.L^{-1}	Ho et Tam (1998b)
		25-180 *E. coli* .100 mL^{-1}	85,7 % (n = 7)	0 à 2 kystes.L^{-1}	
		181-610 *E.coli* .100 mL^{-1}	50 %	0 à 23 kystes.L^{-1}	
		> 610 *E. coli* .100 mL^{-1}	64 %	0 à 10 kystes.L^{-1}	

9.3- Survie des kystes de Giardia aux conditions environnementales.

Le point de mort thermique qui correspond à la température minimale à partir de laquelle un micro-organisme est inactivé en 10 minutes est évalué par Schaefer *et al.* (1984) pour des kystes de *G. muris* en suspension dans de l'eau distillée. Les auteurs concluent alors à un point de mort thermique de 54°C par l'absence de dékystement *in vitro* de 100 000 kystes exposés à des températures comprises entre 50 et 58°C.

Le tableau **32** regroupe des données concernant la survie de kystes de *G. lamblia* ou de *G. muris* à différentes températures et dans différents types de milieux. La température apparaît comme le facteur déterminant pour la persistance de la viabilité des kystes dans l'environnement. Ainsi, une température comprise entre 0 et 10°C semble être la plus favorable à la survie des kystes de *Giardia muris* (deRegnier *et al.*, 1989). Par contre des températures inférieures ou égales à -4°C entraînent une inactivation totale des kystes dans l'eau, le sol et les selles en moins d'une semaine (Olson *et al.*, 1999). Pour des températures proches de 25°C, la survie des kystes dans l'environnement diminue à deux semaines. Robertson et Gjerde (2004) évaluent la survie de kystes de *Giardia lamblia* exposés aux conditions hivernales en Norvège. Les auteurs observent alors moins de 1 % de kystes

viables par marquage au PI pour des températures comprises entre -25°C et +9°C, mais ils remarquent aussi des variations de la survie des kystes suivant les isolats.

Tableau 32 : Viabilité des kystes de *Giardia* dans des conditions environnementales

Conditions expérimentales	Température	Viabilité maximale observée		Références
Selles contenant des kystes de *Giardia muris* mises en suspension dans différents types d'eaux :		**Infectiosité chez l'animal**	**Colorants vitaux (PI)**	deRegnier *et al.* (1989)
Lac	3°C	56 jours	84 jours	
	6 à 7°C	56 jours	56 jours	
	17 à 20°C	28 jours	28 jours	
Rivière	0 à 2°C	84 jours	84 jours	
	19 à 27°C	>28 jours	28 jours	
Eau potable	20 à 28°C	14 jours	14 jours	
Kystes de *Giardia lamblia* en suspension dans :			**Colorants vitaux (FDA, PI)**	Deng et Cliver (1992)
-Effluents de fosse septique	25°C		17,6* jours	
-Fumier de porcins et **effluents de fosse septique**	5°C		129,9* jours	
	15°C		26,2* jours	
	25°C		3,7* jours	
Kystes de *Giardia muris* en suspension dans :		**Dékystement *in vitro***		Johnson *et al.* (1997a)
-Eau de mer				
stockage à l'obscurité	23-25°C	≈ 2 jours* / 4 jours**		
stockage à la lumière	18-28°C	< 2 heures* / 2 heures**		
-Eau douce				
stockage à l'obscurité	23-25°C	< 3 jours*-5 jours**		
stockage à la lumière	18-28°C	< 2 heures*-2 heures**		
Kystes de *Giardia muris* en suspension dans :		**Infectiosité chez l'animal**	**Colorants vitaux (PI)**	Olson *et al.* (1999)
-Eau distillée protégée de l'évaporation et stockée à l'obscurité.	- 4°C	< 1 semaine	< 1 semaine	
	4°C	11 semaines	20 % à 11 semaines	
	25°C	2 semaines	4 semaines	
-Echantillons de **sols** avec un taux d'humidité maintenu à 17 % et stockés à l'obscurité.	- 4°C	< 1 semaine	< 1 semaine	
	4°C	7 semaines	9 semaines	
	25°C	1 semaine	3 semaines	
-Selles de bovins contaminées avec 10^5 à 10^7 kystes.g^{-1} et stockées à l'obscurité. Taux d'humidité maintenu à 50 %.	- 4°C	< 1 semaine	< 1 semaine	
	4°C	1 semaine	9 semaines	
	25°C	1 semaine	3 semaines	

* : abattement du nombre de kystes viables de 90 % (1 $\log_{10}$) / ** : abattement du nombre de kystes viables de 99 % (2 $\log_{10}$).

Lors d'essais de survie de kystes de *Giardia* dans des effluents de fosse septique mélangés à du fumier de porcins, Deng et Cliver (1992) montrent une influence négative de l'augmentation de la température de stockage de 5 à 25°C sur la survie des kystes, ainsi qu'une plus forte diminution du nombre de kystes viables lorsque la proportion d'effluents animaux augmente. La survie des kystes de *G. muris* dans l'eau de mer en présence de lumière semble très brève avec un abattement de la viabilité par dékystement *in vitro* de 99 % en moins de deux heures (Johnson *et al.*, 1997a). Si la température joue un rôle prépondérant sur la survie des kystes, la composition du milieu semble également avoir une influence.

9.4- Voies de contamination et épidémies.

9.4.1- La transmission zoonotique.

La transmission zoonotique de *Giardia* reste actuellement une voie de contamination peu étudiée. Lors d'une étude réalisée dans une communauté aborigène australienne, Hopkins *et al.* (1997) classent les kystes de *Giardia* isolés de chiens dans des génotypes spécifiques et non dans les génotypes A et B. Le regroupement des animaux pourrait alors expliquer la transmission sélective de certains génotypes. Traub *et al.* (2004) réalisent une étude au sein d'une communauté indienne où les contacts entre les personnes et leurs animaux sont très fréquents. En comparant les séquences de l'ARNr, de l'EF1A et de la TPI de kystes de *Giardia* d'origine humaine et canine les auteurs concluent alors à une transmission zoonotique confortée par le niveau de prévalence chez les personnes vivant au contact d'un animal porteur. Ainsi, si le risque de transmission zoonotique semble relativement limité, il ne peut être exclu notamment lorsque les conditions d'hygiène s'avèrent insuffisantes.

9.4.2- La transmission de personne à personne.

Ce mode de transmission par la voie féco-orale semble prépondérant lorsque les conditions d'hygiène ne sont pas suffisantes. Ainsi les crèches peuvent constituer une structure idéale pour la transmission de *Giardia* par la présence d'un grand nombre d'enfants dans un même endroit où il est plus difficile de maintenir des conditions d'hygiène adéquates (Read *et al.*, 2002). Une seule étude est publiée concernant la prévalence de *Giardia* dans une crèche française par Dupouy-Camet *et al.* (1990) qui montrent un risque de contamination des enfants par contact avec les poubelles contenant les couches. Linnane *et al.* (2001) suggèrent également une transmission par la voie féco-orale lors d'une épidémie dans une crèche britannique concernant 56 personnes dont 37 enfants. La transmission d'enfants à adultes a également été envisagée dans des épidémies alimentaires mettant en cause des personnes élevant des enfants porteurs asymptomatiques (tableau **34**, paragraphe 9.4.3).

9.4.3- La voie alimentaire.

De nombreux fruits, légumes et condiments peuvent être contaminés par des kystes de *Giardia* (tableau **33**). La menthe et la coriandre apparaissent comme fréquemment contaminées avec des concentrations élevées de kystes. Ces chiffres pourraient être expliqués par la densité de leur feuillage offrant une surface de contamination plus importante et une protection des kystes vis-à-vis des conditions environnementales (Amahmid *et al.*, 1999).

Actuellement, l'augmentation de l'exportation de fruits et légumes associée à la consommation de ces aliments crus ou insuffisamment cuits entraînent un risque accru de contamination par la voie alimentaire (Roberston et Gjerde, 2001a). L'utilisation d'eaux souterraines pour l'irrigation, la généralisation des mesures d'hygiène lors du conditionnement, l'irradiation de certains produits sont proposés pour limiter le niveau de contamination des aliments (Rose et Slifko, 1999).

Tableau 33 : Niveau de contamination de produits issus de cultures par irrigation

Produit	Pourcentage d'échantillons positifs		Concentration (kystes.100 g^{-1} de produit)	Références
Aneth	29 %	(n = 7)	4 - 8	Robertson et Gjerde (2001a)
Coriandre	44 %		25	Amahmid *et al.* (1999)
Menthe	50 %		10	
Persil	0 %	(n = 7)		Robertson et Gjerde (2001a)
Framboises	0 %	(n = 10)		
Fraises	3 %	(n = 62)	1	
Radis	83,3 %		6	Amahmid *et al.* (1999)
	17 %	(n = 6)	2	Robertson et Gjerde (2001a)
Carotte	33 %		15	Amahmid *et al.* (1999)
Pommes de terre	22 %		0,03	
Laitue	2 %	(n = 125)	2 - 3	Robertson et Gjerde (2001a)
Fèves	2 %	(n = 149)	2 - 6	
Luzerne	0 %	(n = 16)		
Champignons	0 %	(n = 55)		

Entre 1988 et 1992, les parasites représentent 2 % des micro-organismes mis en cause dans les épidémies d'origine alimentaire aux Etats-Unis. Parmi les 17 épidémies dues à des parasites, *Giardia* est incriminé dans 41 % des cas (Rose et Slifko, 1999). Le tableau **34** reporte des épidémies de giardiose d'origine alimentaire, observées aux Etats-Unis. Lorsque les aliments contaminés ont pu être identifiés, on constate que les fruits et légumes crus sont souvent mis en cause. Le manque d'hygiène et la préparation de ces aliments par des personnes porteuses asymptomatiques ou vivant avec des enfants porteurs sont les principales causes de contamination.

Tableau 34 : Exemples d'épidémies de giardiose d'origine alimentaire aux Etats-Unis

Date	Nombre de cas / nombre de personnes exposées	Aliments incriminés	Lieu Mode de contamination	Références
1979	29 / 60	Saumon	Ecole- Nourriture préparée par une personne élevant un enfant porteur âgé d'un an.	Rose et Slifko (1999)
1985	13 / 16	Salade de pâtes	Pique-nique - Nourriture préparée par une personne porteuse symptomatique, élevant des enfants porteurs asymptomatiques	
1986	10 / 25	Salade de fruits	Famille - Nourriture préparée par une personne élevant porteur asymptomatique âgé de 2 ans.	
	88 / 312	Sandwichs	Clinique - 57 % des personnes ayant préparé ces sandwichs excrétaient des kystes	
1989	21 / 108	Laitue, oignons, tomates	Diner associatif - Mode de contamination non identifié.	
1990	27 / 36	Glaces	Restaurant - un employé porteur asymptomatique et un employé élevant un enfant porteur.	
	27 / ND	Légumes crus	Entreprise - personne contaminée.	Mintz *et al.* (1993)
	75 / ND	Fruits et légumes	Restaurant - NR	Bean *et al.* (1996)
1991	32 / ND (2 épidémies)	Fruits et légumes NR	Restaurant - température de conservation NR	Bean *et al.* (1996)
1992	2 / ND	NR	Restaurant	
1994	22 / ND (2 épidémies)	NR NR	Domicile Restaurant	Olsen *et al.*(2000)
1996	6 / ND	Glace	Faute d'hygiène	
1997	17 / ND	NR	Restaurant - Faute d'hygiène	

9.4.4- La voie hydrique.

Afin d'obtenir un risque de contamination inférieur à 1 personne pour 10 000 par an, l'eau destinée à la consommation humaine ne doit pas contenir plus de 7.10^{-4} kystes.100 L^{-1} pour une consommation quotidienne de 2 L d'eau par personne (LeChevallier *et al.*, 1991a ; Hashimoto *et al.*, 2002). L'estimation du risque lié à la consommation d'eau potable nécessite ainsi l'analyse d'un nombre élevé d'échantillons et de grands volumes d'eau.

Le tableau **35** regroupe les données concernant la contamination d'eaux destinées à la consommation humaine. Globalement, la concentration en kyste de *Giardia* est inférieure au seuil de détection pour 80 % des échantillons analysés. Seuls, Isaac-Renton *et al.* (1996) observent 71 % d'échantillons positifs (n = 7), mais aucun kyste viable n'est détecté par dékystement *in vivo*. Sur le plan de la viabilité, deux études réalisées en Grande-Bretagne concluent à des pourcentages de kystes viables élevés (42 et 50 %) pour les échantillons positifs par utilisation de colorants fluorogéniques. Pour les 20 % d'échantillons contenant des kystes de *Giardia*, les concentrations sont variables mais généralement inférieures à 5 kystes.100 L^{-1}.

Tableau 35 : Niveau de contamination en kystes de *Giardia* des eaux destinées à la consommation humaine

Localisation	Technique de détection	Echantillons positifs (%)	Concentration	Echantillons contenant des kystes viables (%)	Références
Europe					
Grande-Bretagne	IFA	22,5 % (n = 151)	m = 0,08 kystes.L^{-1}	42 % *	Gilmour *et al.* (1991)
	IFA	19 % (n = 106)	0,01 à 1,67 kystes.L^{-1} m = 0,02 kystes.L^{-1}	50 % *	Smith *et al.* (1993)
Amérique du Nord					
Canada	IFA	17 % (n = 42) 0 % (n = 10)	0,2 à 1,4 kystes.100 L^{-1}	NR	Roach *et al.* (1993)
	IFA	0 %	< à la limite de détection	NR	Chauret *et al.* (1995)
	IFA	71 % (n = 7)	1,5 à 18,5 kystes.100 L^{-1}	0 %** (n = 5)	Isaac-renton *et al.* (1996)
	IFA	18,2 % (n = 423)	2 à 5 kystes.100 L^{-1}	7,6 %**	Wallis *et al.* (1996)
	IFA	0 % (n = 32)	< 0,1 kyste.100 L^{-1}	NR	Payment *et al.* (1997)
Etats-Unis	IFA	0 % (n = 36)	< 0,25 kystes.100 L^{-1}		Rose *et al.* (1991)
	IFA	17,1 % (n = 82)	m = 4,45 kystes.100 L^{-1} 0,29 à 64 kystes.100 L^{-1}	13,3 %*	LeChevallier *et al* (1991b)
	IFA	20 % (n = 30 %)	0,5 à 2 kystes.100 L^{-1}	NR	LeChevallier et Norton (1993)
Pays divers					
Afrique du Sud	IFA	12,1 % (n = NR)	0 à 4 kystes.10 L^{-1}	NR	Kfir *et al.* (1995)
Japon	IFA	12 % (n = 26)	0,5 à 2 kystes.1 000 L^{-1}	NR	Hashimoto *et al.* (2001)
Malaisie	IFA	0 % (n = 20)	< à la limite de détection	NR	Ahmad *et al.* (1997)

* : viabilité évaluée par microscopie (morphologie, colorants fluorogéniques / ** : viabilité évaluée par infectiosité chez l'animal

Giardia est généralement le micro-organisme le plus fréquemment mis en cause dans les épidémies à partir d'eau destinée à la consommation humaine aux Etats-Unis (Barwick *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2002 ; Levine *et al.*, 1990 ; Levy *et al.*, 1998). Entre 1986 et 1988, Levine *et al.* (1990) comptabilisent neuf épidémies de giardiose par consommation d'eau dont six sont dues à un traitement de potabilisation mettant en œuvre une chloration en l'absence d'un système de filtration. Les épidémies de giardiose à partir d'eau destinée à la consommation humaine observées aux Etats-Unis entre 1989 et 2002 sont présentées dans le tableau **36**. La

plupart de ces épidémies mettent en cause l'efficacité du traitement de potabilisation avec soit une chloration en l'absence de filtration, soit une chloration insuffisante. Une contamination du réseau d'eau potable par de l'eau impropre à la consommation est également observée dans certains cas.

Tableau 36 : Epidémies de giardiose aux Etats-Unis à partir d'eau destinée à la consommation humaine de 1989 à 2002

Année	Nombre d'épidémies	Nombre de cas	Cause	Références
1989-1990	7	18	Eau de surface non traitée	Herwaldt *et al.* (1992)
		19 / 23 / 308 152 / 53 / 24	Déficience du traitement de potabilisation	
1991	2	15	Déficience du système de distribution	Moore *et al.* (1993)
		13	Déficience du traitement de potabilisation	
1992	2	15	Eau souterraine non traitée	
		80	Déficience du traitement de potabilisation	
1993	2	20	Déficience du traitement de potabilisation	Kramer *et al.* (1996)
		7	Eau souterraine non traitée	
1994	3	18 / 36	Déficience du traitement de potabilisation	
		304	Déficience du système de distribution	
1995	2	10	Eau de surface non traitée	Levy *et al.* (1998)
		1449	Déficience du traitement de potabilisation	
1997	2	50	Déficience du traitement de potabilisation	Barwick *et al.* (2000)
		100	Déficience du système de distribution	
1998	2	7 / 2	Eau souterraine non traitée	
1999	1	2	Eau souterraine non traitée	Lee *et al.* (2002)
2000	5	27 / 5	Déficience du traitement de potabilisation	
		2	Déficience du système de distribution	
		12	Eau souterraine non traitée	
		4	Non déterminée	
2001	2	6	Déficience du traitement de potabilisation	Blackburn *et al.* (2004)
		6	Eau souterraine non traitée	
2002	1	6	Déficience du système de distribution	

Le tableau **37** regroupe les épidémies de giardiose à partir d'eaux récréationnelles observées aux Etats-Unis entre 1991 et 2002. Porter *et al.* (1988) reportent également une épidémie de giardiose dans une piscine concernant neuf personnes provoquée par une contamination fécale de l'eau associée à un défaut du traitement par chloration. Globalement, les épidémies de giardiose dues à une contamination des eaux récréationnelles aux Etats-Unis semblent peu nombreuses et représentent 272 personnes contaminées sur une période de 11 ans.

Tableau 37 : Epidémies de giardiose à partir d'eaux récréationnelles, aux Etats-Unis de 1991 à 2002

Année	Nombre d'épidémies	Site	Nombre de cas	Cause	Références
1991	4	Piscine	14	Non déterminée	Moore *et al.* (1993)
		Pataugeoire	9 / 7	Ingestion accidentelle d'eau contaminée	
		Lac	4		
1993	3	Lac	12 / 43		Kramer *et al.* (1996)
1994	1	Piscine	80		
1996	1	Pataugeoire	77		Levy *et al.* (1998)
1999	1	Bassin	18		Lee *et al.* (2002)
2002	1	Rivière	2		Yoder *et al.* (2004)

9.5- Schéma général des réservoirs et voies de contamination de Giardia.

La figure **12** représente de façon schématique les réservoirs et les différentes voies de contamination de *Giardia*.

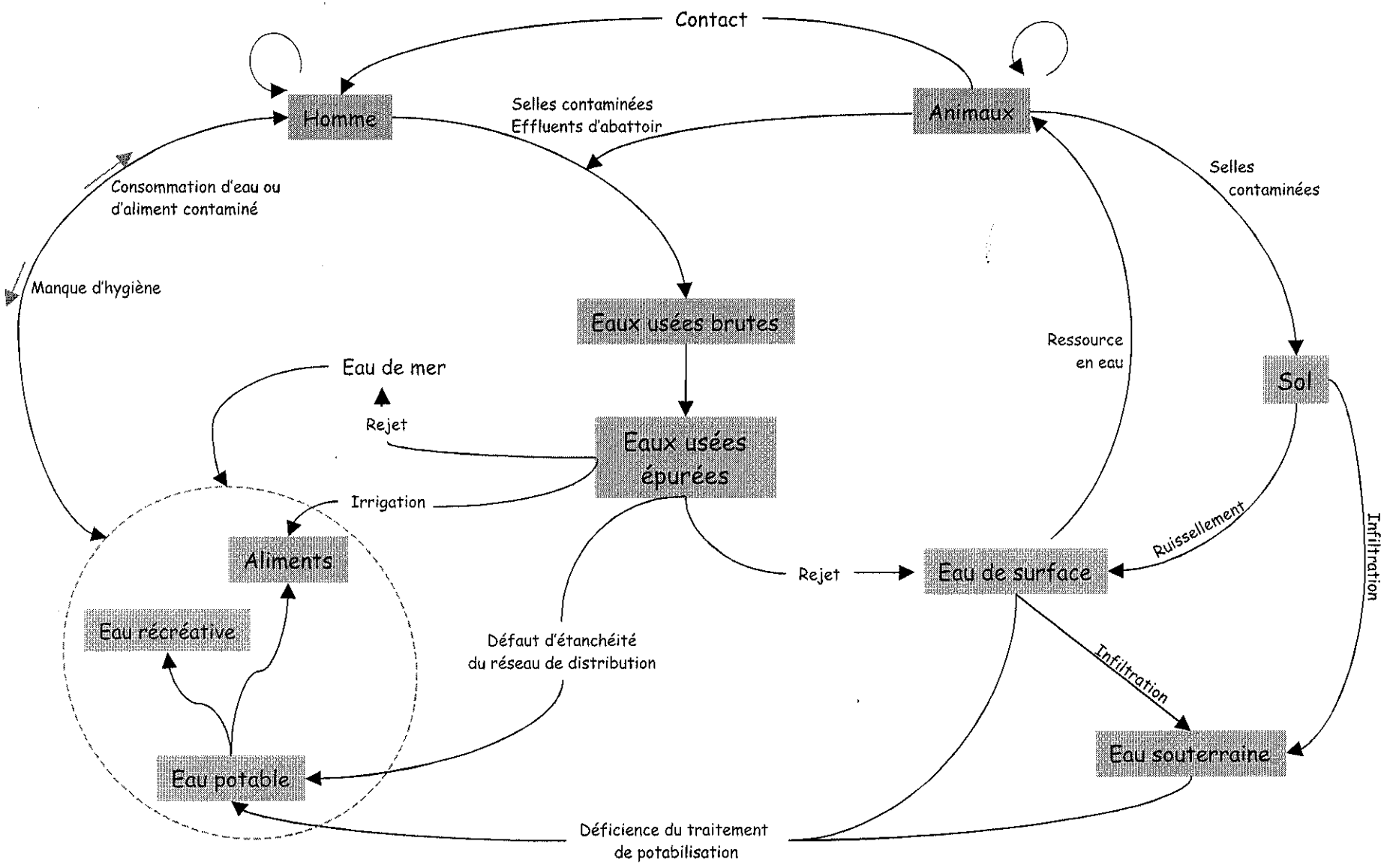


Figure 12 : Schéma des réservoirs et voies de contamination de *Giardia*

10- La rupture du cycle parasitaire.

Différents sites d'action visant à rompre le cycle parasitaire de *Giardia* peuvent être envisagés soit pour limiter les voies de contamination d'un nouvel hôte, soit pour réduire l'intensité d'excrétion des kystes par un hôte contaminé et limiter la contamination de l'environnement notamment au niveau des ressources hydriques.

L'application de traitements de potabilisation efficaces, associés à des mesures d'hygiène voire une immunoprophylaxie devrait considérablement limiter les possibilités de contamination d'un nouvel hôte. De même la mise en place d'un traitement en cas de diagnostic de giardiose ainsi que la généralisation et l'optimisation des traitements d'épuration des eaux usées et des boues résiduaires devrait réduire le niveau de contamination de l'environnement par ce protozoaire.

La figure **13** schématise les différents modes d'action envisageables pour rompre le cycle parasitaire de *Giardia lamblia.*

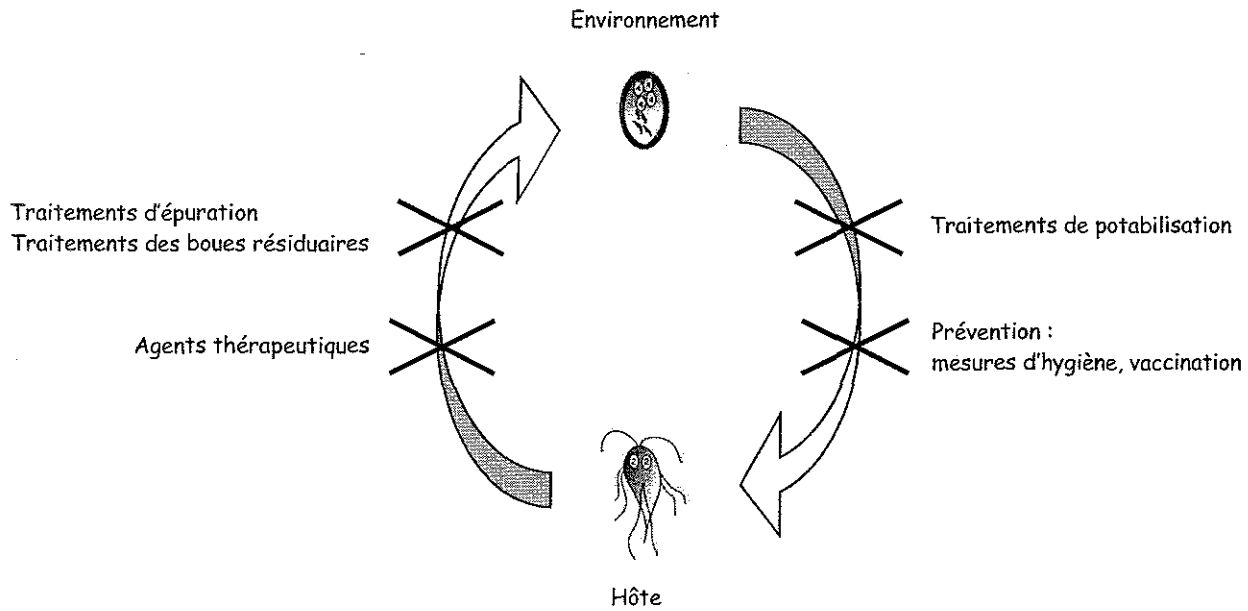


Figure 13 : Les différentes possibilités de rupture du cycle parasitaire de *Giardia lamblia*

10.1- Limitation des possibilités de contamination d'un nouvel hôte.

Deux niveaux d'action peuvent permettre de limiter la contamination d'un nouvel hôte. Il s'agit d'une part de limiter le risque de contamination par les eaux destinées à la consommation grâce à la mise en place et au maintien de traitements de potabilisation efficaces pour éliminer les kystes de *Giardia.* L'action au niveau de cette étape du cycle parasitaire consiste d'autre part à favoriser le développement d'une immunoprophylaxie et surtout à mettre en place des mesures d'hygiène strictes notamment dans les structures collectives destinées aux enfants.

10.1.1 Les traitements de potabilisation.

La réglementation américaine pour le traitement des eaux de surface (SWTR : Surface Water Treatment Rule) publiée par l'US-EPA préconise l'élimination de 99,9999 % des bactéries, 99,99 % des virus et 99,9 % des protozoaires pathogènes pour l'Homme par filtration et désinfection (LeChevallier *et al.*, 1993 ;

Sivaganesan et Rice, 2003). La concentration résiduelle en désinfectant doit être supérieure ou égale à 0,2 $mg.L^{-1}$ dans le système de distribution permettant un abattement supplémentaire d'au moins 0,5 log_{10}. La turbidité de l'eau après filtration ne doit pas être supérieure à 0,5 NTU pour 95 % des analyses (LeChevallier *et al.*, 1993).

L'obtention d'une eau de boisson répondant aux critères de l'US-EPA et permettant de limiter le risque à 1 personne pour 10 000 par an, dépend de l'efficacité des procédés mis en œuvre mais aussi de leur fiabilité lors de variations de la charge en particules et surtout en micro-organismes pathogènes des eaux à traiter. Le procédé le plus couramment utilisé dans le traitement des eaux destinées à la consommation humaine fait intervenir trois étapes constituées par la clarification (coagulation-floculation-sédimentation), la filtration et enfin la désinfection. Le tableau **38** présente les valeurs d'élimination des kystes de *Giardia* de différents procédés de traitements.

La clarification constitue la première étape du traitement de potabilisation en faisant intervenir des coagulants qui accélèrent la sédimentation des particules en suspension.

La filtration est une étape classique du traitement de l'eau. Différents matériaux comme le sable ou le charbon actif peuvent être utilisés. Le tableau **38** présente des valeurs d'élimination des kystes de *Giardia* pour la filtration seule ou associée à la clarification. La technique la plus répandue utilise la filtration lente ou rapide sur sable. L'ultrafiltration qui est une technique moins répandue pour des raisons de coût, permet toutefois d'obtenir une élimination des kystes supérieure 4 log_{10}. Nieminski *et al.* (1995) constatent que la filtration sur sable permet d'obtenir plus de 3 log_{10} d'inactivation dans le cas où la turbidité de l'eau traitée est comprise entre 0,1 et 0,2 NTU. Si l'eau non traitée présente une turbidité initiale ne permettant plus d'atteindre ce seuil de turbidité après traitement, alors la filtration seule ne peut suffire à obtenir une eau de qualité suffisante. Hashimoto *et al.* (2002) constatent que le rendement de la filtration rapide sur sable pourrait être influencé par la température de l'eau. La filtration est généralement combinée à la clarification. Lorsque cette technique est précédée par une clarification, les valeurs d'élimination sont comprises entre 2,24 et 3,26 log_{10} suivant les études. La filtration seule ou la combinaison clarification-filtration sont rarement suffisantes pour obtenir une élimination des kystes de 3 log_{10} ce qui souligne l'intérêt de l'étape de désinfection pour l'inactivation des kystes restants.

Tableau 38 : Impact des traitements de potabilisation sur la concentration en kystes de *Giardia*

Traitement mis en oeuvre	Elimination (log_{10})	Références
Filtration		
Ultrafiltration	> 4 log_{10}	Jacangelo *et al.* (1991)
Filtration rapide sur sable	3,30 ± 0,77	Nieminski (1997)
Clarification + filtration		
Coagulation-floculation au chlorure ferrique-alcalinisation-Filtration rapide sur sable et multicomposé	2,30	LeChevallier *et al.* (1993)
Coagulation-floculation au chlorure d'aluminium-alcalinisation-Filtration sur sable et charbon actif	2,78	
Coagulation-floculation au chlorure d'aluminium-Filtration sur sable et multicomposé	2,24	
Coagulation-floculation au sulfate d'aluminium-Filtration rapide sur sable	3,26 ± 0,67	Nieminski (1997)
Coagulation-floculation au chlorure d'aluminium-Filtration sur sable	3,1	Payment *et al.* (1997)
Coagulation-floculation au sulfate d'aluminium-Filtration rapide sur sable-chloration	2,53	Hashimoto *et al.* (2002)

La désinfection est généralement une étape indispensable pour atteindre une élimination de 3 log_{10} des kystes de *Giardia* lors du traitement de potabilisation. La désinfection est considérée comme étant l'étape décisive pour l'élimination des contaminations transmises par voie hydrique (Schoenen, 2001). Cette étape fait classiquement appel à un traitement chimique par le chlore libre, le dioxyde de chlore et l'ozone, mais elle peut également utiliser un traitement physique par les UV. Le concept de Ct (produit de la concentration en désinfectant en $mg.L^{-1}$ par le temps d'exposition en minute) est classiquement utilisé pour évaluer l'efficacité des traitements chimiques.

L'efficacité des traitements chimiques pour l'inactivation des kystes de *Giardia* est présentée dans le tableau **39**. De nombreux facteurs peuvent influencer l'inactivation des micro-organismes par chloration, notamment la température de l'eau, le pH, le temps de contact, la concentration en chlore et la turbidité de l'eau (Clark, 1990).

Tableau 39 : Efficacité des désinfectants vis-à vis des kystes de *Giardia*

Espèce	Mode d'étude de l'inactivation	Ct ($mg.min.L^{-1}$)	Niveau d'inactivation	Références
Chlore libre				
G. lamblia	Dékystement in vitro	80 à 240 (pH 6 à 8)	Inactivation totale	Jarroll *et al.* (1981)
G. lamblia	Dékystement in vitro	150 (pH 6 à 8)	1 à 2 log_{10}	Rice *et al.* (1982)
G. muris	Infectiosité chez l'animal	7,9 à 70,8	Pas d'inactivation	Faubert *et al.* (1986)
Ozone				
G. lamblia	Infectiosité chez l'animal	0,65 / 1,23 / 2,57	2 / 3 / 4 log_{10}	Finch *et al.* (1993)
G. muris		0,24 / 0,45 / 0,86	2 / 3 / 4 log_{10}	
G. lamblia	Infectiosité chez l'animal	1,5	> 3 log_{10}	Widmer *et al.* (2002)

Jarroll *et al.* (1981) constatent que la diminution de la température (25°C à 5°C) couplée à l'augmentation du pH (6 à 8) nécessite l'augmentation du Ct de 15 à 240 $mg.min.L^{-1}$. Payment *et al.* (1997) observent un abattement de 0,8 log_{10} lors de la désinfection par ozonation et chloration sur une eau traitée par clarification et filtration sur sable. Pour un Ct en chlore de 150 $mg.min.L^{-1}$, seulement 1 à 2 log_{10} de kystes sont inactivés. L'ozone semble plus efficace que le chlore d'après les travaux de Finch *et al.* (1993) et de Widmer *et al.* (2002) puisque des Ct compris entre 1 et 1,5 $mg.min.L^{-1}$ permettent une inactivation de 3 log_{10}.

Comme le montrent les valeurs du tableau **40**, les kystes de *Giardia* présentent un niveau de résistance aux oxydants chimiques (chlore, dioxyde de chlore, ozone) qui est certes inférieur à celui des oocystes de *Cryptosporidium*, mais nettement supérieur à celui des *Rotavirus*. Les valeurs de Ct observées en laboratoire pour l'inactivation des kystes sont obtenues dans des conditions idéales et seraient difficilement transposables aux traitements appliqués par les stations de traitement des eaux.

Tableau 40 : Valeurs de Ct[a] relatifs pour l'inactivation des kystes de *Giardia* par les oxydants chimiques comparés à celles des oocystes de *Cryptosporidium* et des Rotavirus (d'après Gordon et Bubnis, 2000)

Micro-organisme	Chlore	Dioxyde de chlore	Ozone
Giardia	47 à > 150	17	0,5 à 0,6
Cryptosporidium parvum	7200	78	5 à 10
Rotavirus	0,01 à 0,05	0,2 à 2	0,01 à 0,06

a : le Ct correspond au produit de la concentration en désinfectant ($mg.L^{-1}$) par le temps de contact (minutes)

L'utilisation des rayonnements UV est une alternative à la désinfection des eaux par voie chimique. Le tableau **41** présente les données bibliographiques concernant l'efficacité des UV sur l'inactivation des kystes de *Giardia*. Lors du traitement de potabilisation les doses appliquées sont généralement comprises entre 160 et 400 $J.m^{-2}$.

Tableau 41 : Efficacité des UV sur l'inactivation des kystes de *Giardia*

Espèce	Milieux de suspension	Mode d'étude de l'inactivation	Dose ($J.m^{-2}$)	Niveau d'inactivation	Références
G. muris	Eau potable filtrée	Infectiosité chez l'animal	50 80	2,2 log_{10} 2,4 log_{10}	Craik *et al.* (2000)
G. lamblia (WB)	Eau désionisée		100 200 400	1 à 2 log_{10} 2 à 3 log_{10} > 3 log_{10}	Campbell et Wallis (2002)
G. lamblia	PBS		10	> 4 log_{10}	Linden *et al.* (2002)
G. lamblia *G. muris*	Eau potable filtrée		30 30	> 2 log_{10} > 2 log_{10}	Mofidi *et al.* (2002)
G. muris	Eau désionisée		14 à 23	0,3 à > 4,4 log_{10}	Hayes *et al.* (2003)

Des variations importantes de l'inactivation par les UV sont constatées suivant les études. Ainsi, Campbell et Wallis (2002) observent 2 log_{10} d'inactivation pour des doses supérieures à 100 $J.m^{-2}$, alors que Hayes *et al.* (2003) observent une inactivation supérieure à 2,9 log_{10} pour des doses supérieures ou égales à 19 $J.m^{-2}$. Linden *et al.* (2002) observent une inactivation supérieure à 4 log_{10} pour une dose de 10 $J.m^{-2}$. D'après Craik *et al.* (2000) et Campbell et Wallis (2002) l'inactivation serait proportionnelle à la dose d'UV jusqu'à 200 $J.m^{-2}$. L'utilisation de valeurs supérieures à cette dose n'entraîne pas une augmentation significative de l'inactivation. Campbell et Wallis (2002) et Hayes *et al.* (2003) montrent respectivement que l'association PI/DAPI et le dékystement *in vitro* surestiment la viabilité des kystes après exposition aux UV. Ces deux techniques ne semblent pas adaptées à l'étude de cette méthode d'inactivation des kystes.

10.1.2- Prévention de la giardiose : mesures d'hygiène et vaccination.

10.1.2.1- Mesures d'hygiène.

La prévention de la giardiose passe essentiellement par le respect de mesures d'hygiène strictes. Le lavage des mains, des surfaces et des aliments doit permettre de limiter la transmission du parasite mais peu de données sont disponibles sur l'efficacité de ces pratiques vis-à-vis des protozoaires entériques. La plus grande résistance de *Giardia* aux désinfectants notamment par rapport aux virus entériques, pose le problème de la dose à utiliser et du temps de contact. La destruction des kystes par la chaleur (ébullition) pour l'eau contaminée est également une des possibilités envisageables (Rose et Slifko, 1999).

Lors d'une étude réalisée dans une crèche, Dupouy-Camet *et al.* (1990) montrent une forte diminution de la prévalence avec la mise en place de quelques mesures comme le traitement médical de l'ensemble des enfants et du personnel de l'établissement, l'installation de poubelles hermétiques, l'utilisation de vêtements supportant l'ébullition, la prescription d'un examen parasitologique des selles pour tous les nouveaux enfants. Cody *et al.* (1994) suggèrent également que l'amélioration des mesures d'hygiène et notamment un nettoyage efficace des tables à langer pourrait limiter le risque de transmission de *Giardia* dans les crèches.

10.1.2.2- La vaccination chez les animaux.

Le développement d'une immuno-prophylaxie efficace serait bénéfique aussi bien pour l'Homme que pour les animaux. Un vaccin permettrait d'immuniser les réservoirs de *Giardia* constitués par l'homme et les animaux favorisant la diminution du nombre de kystes excrétés dans l'environnement. Il réduirait le risque de transmission féco-orale ainsi que le niveau de contamination environnementale de l'eau et des aliments. De telles perspectives seraient extrêmement bénéfiques dans les régions où la giardiose est endémique (Olson *et al.*, 2000).

Dans le domaine vétérinaire, un vaccin destiné aux animaux domestiques ou d'élevage, est justifié par la prévalence élevée de *Giardia* chez certains animaux et le risque de transmission zoonotique. En Amérique du nord, des vaccins destinés aux chiens et aux chats sont actuellement commercialisés sous les noms GiardiaVax® et Fel-O-Vax®. Le vaccin GiardiaVax® a notamment montré son efficacité sur les jeunes animaux qui présentent généralement des prévalences plus élevées. Dans le cas où la protection n'est pas totale, la vaccination permet de limiter l'intensité des signes cliniques, la durée du portage et donc la quantité de kystes excrétés. La vaccination des animaux domestiques et d'élevage devrait également permettre de limiter la transmission intra et inter-espèce notamment avec les animaux sauvages (Olson *et al.*, 2000).

10.2- Limitation de la contamination de l'environnement.

10.2.1- Agents thérapeutiques.

La giardiose se traduit habituellement par une résolution spontanée en six semaines dans 90 % des cas. Toutefois, un traitement approprié permet une résorption rapide des symptômes et l'éradication du parasite dans 94 à 100 % des cas (Butcher *et al.*, 1994). Actuellement, le traitement de la giardiose est encore le sujet de nombreuses controverses (Campanati et Monteiro-Leal, 2002). La furazolidone et surtout le métronidazole constituent les principaux traitements utilisés pour cette parasitose (Campanati et Monteiro-Leal, 2002 ; Gardner et Hill, 2001 ; Vesy et Peterson, 1999). *In vitro*, la concentration inhibitrice 50 % (CI50) qui correspond à la concentration diminuant de 50 % la croissance des trophozoïtes et la concentration minimale inhibitrice (CMI) sont utilisées pour évaluer et comparer la sensibilité des molécules (Butcher *et al.*, 1994).

10.2.1.1- Les nitro-5 imidazolés.

Cette classe d'agents thérapeutiques qui regroupe le métronidazole, le tinidazole, l'ornidazole et le secnidazole, a été découverte en 1955 et a montré son efficacité contre de nombreuses infections à protozoaires. Ainsi, l'activité antiparasitaire du métronidazole a tout d'abord été montrée contre *Trichomonas vaginalis* et *Entamoeba histolytica* (Gardner et Hill, 2001).

Le métronidazole (MTZ), molécule dont le mécanisme d'action est le plus étudié pour cette classe thérapeutique, utilise la voie métabolique anaérobie. Après le passage de la paroi des trophozoïtes, le métronidazole est transformé en forme active suite à la réduction de son groupement nitro, il joue alors le rôle d'accepteur terminal d'électron et se lie de façon covalente à l'ADN. Ce phénomène entraîne la perte de la structure hélicoïdale de l'ADN et inhibe les étapes de réplication et transcription provoquant la mort des trophozoïtes. De plus, le métronidazole inhibe totalement la respiration et la mobilité des trophozoïtes, par

contre les kystes et les trophozoïtes au stade d'enkystement sont résistants (Jarroll *et al.*, 2001). La réduction de cette molécule entraîne également la formation de radicaux libres toxiques (Gardner et Hill, 2001).

Le tinidazole, l'ornidazole et le secnidazole ont une demi-vie plus longue que le métronidazole autorisant un traitement monodose ce qui favorise la compliance et permet d'obtenir une efficacité clinique comprise entre 80 et 100 % (Gardner et Hill, 2001).

Bien qu'il ait montré son efficacité lors d'essais cliniques et *in vitro*, et qu'il constitue l'agent thérapeutique couramment prescrit dans le traitement de la giardiose, le métronidazole n'est pas approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour cette indication (Ali et Hill, 2003). En France, le métronidazole, le tinidazole et l'ornidazole sont indiqués dans le traitement de cette parasitose. Les posologies adulte et enfant, l'efficacité et les principaux effets secondaires des nitro-5 imidazolés sont présentés dans le tableau **42**.

10.2.1.2- Traitements alternatifs.

La résistance occasionnelle de *Giardia* aux nitro-5 imidazolés ainsi que les effets secondaires de ces molécules entraînent le recours à des traitements alternatifs.

La quinacrine initialement indiquée dans le traitement du paludisme et reconnue comme traitement de la giardiose après la seconde guerre mondiale, avec une efficacité clinique supérieure ou égale à 90 % (Gardner et Hill, 2001). Malgré l'approbation de la FDA pour cette indication, sa production est arrêtée aux Etats-Unis à partir de 1992 (Ali et Hill, 2003). En France, cette molécule a également été retirée du marché. Le mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé, toutefois, cette molécule est capable de s'intercaler entre les deux brins d'ADN (Gardner et Hill, 2001).

La paromomycine est un antibiotique de la famille des aminosides, elle est indiquée dans le traitement *d'Entamoeba histolytica* et de *Trichomonas vaginalis*. Elle est proposée comme alternative lors d'infections résistantes et durant une grossesse. Son absorption intestinale est très faible et son action giardicide est due à la perturbation de la synthèse protéique. *In vitro*, la paromomycine montre une efficacité inférieure aux nitroimidazolés, à la quinacrine et à la furazolidone (Gardner et Hill, 2001).

La furazolidone (synonymes : furaxone, nifurazolidone) est un antibactérien intestinal appartenant à la classe des nitrofuranes. Elle est utilisée dans le traitement de la giardiose à partir des années 1950 avec l'approbation de la FDA (Gardner et Hill, 2001). Cette molécule est la moins tératogène des traitements possibles de la giardiose (Vesy et Peterson, 1999). La toxicité de la furazolidone serait due notamment à la production de radicaux toxiques lors de sa réduction (Gardner et Hill, 2001). *In vitro*, l'efficacité de la furazolidone sur la croissance des trophozoïtes est supérieure à celle du métronidazole (Campanati et Monteiro-Leal, 2002).

Les benzimidazolés et plus particulièrement l'albendazole et le mébendazole sont des antihelminthiques pouvant être utilisés comme traitement alternatif au métronidazole. Le site d'action des benzimidazoles se situerait au niveau du cytosquelette. L'albendazole a montré une CI50 inférieure au métronidazole dans des tests d'adhésion *in vitro* (Ali et Hill, 2003). Hall et Nahar (1993) ont montré une efficacité identique de l'albendazole (95 %) et du métronidazole (97 %) chez des enfants pour une posologie de 400 mg par jour, pendant cinq jours. Ces molécules ne peuvent être utilisées en traitement monodose, par contre elles présentent les avantages d'avoir peu d'effets secondaires du fait de leur faible absorption intestinale et d'être efficaces contre de

nombreux helminthes ce qui permet un traitement unique contre plusieurs parasites (Gardner et Hill, 2001). En France, ces molécules n'ont pas actuellement la giardiose comme indication thérapeutique.

Les posologies recommandées, ainsi que l'efficacité et les principaux effets secondaires de ces traitements alternatifs au métronidazole sont présentés dans le tableau **42**.

Tableau 42 : Dénomination, posologies recommandées, efficacité et principaux effets secondaires des molécules utilisées dans le traitement de la giardiose (Gardner et Hill, 2001 ; Vesy et Peterson, 1999)

	DCI (nom commercial)	Posologie Adulte	Enfant	Efficacité	Principaux effets secondaires
Nitroimidazolés	métronidazole (FLAGYL®)	250 mg, 3 fois / jour 5 à 7jours	5 $mg.kg^{-1}$, 3 fois / jour 5 à 7jours	60-100 %	Céphalées, vertiges, rash cutané, urticaire, nausées, neutropénie, bouche sèche, effet antabuse
	tinidazole (FASIGYNE®)	2 g traitement monodose	50 $mg.kg^{-1}$ (max : 2 g) traitement monodose	80-100 %	
	ornidazole (TIBERAL®)	2 g traitement monodose	40-50 $mg.kg^{-1}$ (max : 2 g) traitement monodose	95-100 %	
	secnidazole (FLAGENTYL®)	2 g traitement monodose	30 $mg.kg^{-1}$ (max : 2 g) 1 ou 2 doses	85-100 %	
	quinacrine	100 mg, 3 fois / jour 5 à 7 jours	2 $mg.kg^{-1}$, 3 fois / jour 7 jours	90-100 %	Nausées, vomissements, céphalées, vertiges, coloration orangé de la peau et des muqueuses.
	paromomycine	500 mg, 3 fois / jour 5 à 10 jours	10 $mg.kg^{-1}$, 3 fois / jour 5 à 10 jours	55-88 %	Ototoxicité, néphrotoxicité.
	furazolidone	100 mg, 4 fois / jour 7 à 10 jours	2 $mg.kg^{-1}$, 4 fois / jour 10 jours	80-95 %	Nausées, vomissements, diarrhées, inhibiteur des MAO.
Benzimi-dazolés	albendazole (ZENTEL®)	400 mg, 1 fois / jour 5 jours	15 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ 5 à 7 jours	90-100 %	Anorexie, constipation.
	mébendazole	200-400 mg, 1 fois / jour 5 jours	15 $mg.kg^{-1}.jour^{-1}$ 5 à 7 jours		

10.2.1.3- Nouvelles molécules.

Le nitazoxanide (NTZ) est décrit en 1984 comme efficace contre les parasitoses à cestodes, mais c'est en 1994 que son activité contre les protozoaires est mise en évidence. Cette molécule présente l'avantage majeur d'être efficace vis-à-vis de *Giardia* mais aussi de *Cryptosporidium* et des helminthes (Gilles et Hoffman, 2002). Cette molécule a été approuvée aux Etats-Unis en 2003 pour le traitement des diarrhées à *Giardia* et *Cryptosporidium* chez les enfants de 1 à 11 ans. *In vitro*, le métabolite actif du nitazoxanide, le tizoxanide montre une efficacité nettement supérieure au métronidazole (Ali et Hill, 2003).

Des dérivés de la pentamidine et des flavonoïdes auraient également une activité giardicide. Les protéines spécifiques de surface de la paroi des trophozoïtes (VSP) et les giardines font partie des nouvelles cibles pour la recherche de traitement (Mineno et Avery, 2003).

10.2.2- Le traitement des eaux usées et des boues.

10.2.2.1- Traitement d'épuration des eaux usées.

Les stations d'épuration font appel à une succession de traitements afin d'éliminer la pollution des eaux usées et permettre la production d'eau épurée répondant aux normes de rejet dans l'environnement. Un prétraitement (dégrillage, dessablage, déshuilage) est tout d'abord appliqué aux eaux usées brutes qui sont

ensuite acheminées dans un décanteur primaire. La décantation primaire peut dans certains cas être réalisée avec un ajout de sels de fer ou d'aluminium (traitement physico-chimique) afin d'éliminer les polluants par coagulation-floculation. Un traitement secondaire est ensuite appliqué avec pour objectif l'élimination de la pollution carbonée, azotée et phosphorée. Un traitement tertiaire par filtration sur sable, traitement UV ou chloration peut également être réalisé sur certaines eaux épurées suivant leur utilisation.

Le tableau **43** regroupe les données bibliographiques concernant l'élimination des kystes de *Giardia* par différentes étapes d'épuration des eaux puis par la combinaison de ces méthodes lorsque la totalité du traitement est étudié.

Tableau 43 : Elimination des kystes de *Giardia* lors du traitement d'épuration des eaux usées

Traitement	Elimination	Références
Elimination séquentielle des kystes de *Giardia*		
- Traitement primaire	Station 1 : 0 à 0,53 log_{10} Station 2 : 0,63 à 0,90 log_{10}	Casson *et al.* (1990)
- Coagulation au chlorure ferrique - Traitement par boues activées	1 log_{10} 2 log_{10}	Mayer et Palmer (1996)
- Traitement biologique par boues activées et décantation - Filtration sur sable - Chloration	93 % / 1,19 log_{10} 99 % / 2,00 log_{10} 78,0 % / 0,65 log_{10}	Rose *et al.* (1996)
- Traitement primaire	0,11 log_{10}	Chauret *et al.* (1999)
- Traitement primaire - Traitement secondaire	24 à 47 % 66 à 94 %	Robertson *et al.* (2000)
- Traitement UV (160 $mWs.cm^{-2}$) sur eau clarifiée - Traitement UV (100 $mWs.cm^{-2}$) sur eau clarifiée et filtrée	55 % 62 %	Liberti *et al.* (2002)
Elimination des kystes de *Giardia* au cours de la totalité du traitement d'épuration		
- Lagunage (3 bassins)	99,97 à 100 %	Wiandt *et al.* (1995)
- Traitement biologique par boues activées et décantation / Filtration sur sable / Chloration / Stockage	99,993 % 4,14 log_{10}	Rose *et al.* (1996)
- Stations d'épuration avec ou sans traitement tertiaire	26 à 93,8 %	Bukhari *et al.* (1997)
- Décantation primaire / boues activées / chloration	1,40 log_{10}	Chauret *et al.* (1999)
- Traitement primaire et traitement secondaire	66 à 99 %	Robertson *et al.* (2000)
- Station d'épuration avec traitement physico-chimique	76 %	Payment *et al.* (2001)
		Rose *et al.* (2001)
- Décantation primaire / boues activées et décantation / chloration	93,47 à 99,91 %	Bonadonna *et al.* (2002)
- Dégrillage, dessablage / oxydation / pas de traitement tertiaire - Dégrillage, dessablage / décantation / boues activées / chloration (0,05 à 1 ppm) - Dégrillage, dessablage / décantation / boues activées / filtration (60 µm) et acide péracétique (4 ppm)	94,5 % 87 - 96 % 98,4 %	Caccio *et al.* (2003)

Les différences de traitement mis en œuvre suivant les stations d'épuration étudiées, ainsi que les variations de contamination de l'eau usée en entrée de station, rendent délicate l'analyse de ces données. Toutefois, on peut constater que le traitement primaire est nettement moins efficace pour éliminer les kystes de *Giardia* que le traitement secondaire par boues activées (Robertson *et al.*, 2000). L'association de plusieurs barrières de traitement permet dans les cas les plus favorables d'éliminer plus de 99,9 % des kystes. Toutefois, certaines stations présentent des variations importantes de rendement avec des abattements de l'ordre de 66 à 76 % (Payment *et al.*, 2001 ; Robertson *et al.*, 2000). L'application d'un traitement tertiaire semble se développer. Rose *et al.* (1996) étudient l'efficacité d'une station comportant une étape de filtration sur sable qui permet une élimination de 99 % des kystes. L'utilisation de ce type de traitement peut être justifié par l'utilisation de l'eau

traitée pour l'irrigation. La chloration permettrait l'élimination supplémentaire de 78 % des kystes d'après Rose *et al.* (1996). D'autres auteurs n'observent pas de variation significative de l'élimination des kystes de *Giardia* entre les stations effectuant ou non un traitement tertiaire (Bukhari *et al.*, 1997 ; Caccio *et al.*, 2003 ; Robertson *et al.*, 2000). Bien que le traitement d'épuration permette l'élimination d'une grande partie des kystes présents dans les eaux usées brutes, des quantités non négligeables de kystes peuvent être rejetées dans l'environnement via les eaux usées épurées (Robertson *et al.*, 2000).

10.2.2.2- Traitement des boues résiduaires.

L'épuration des eaux usées entraîne la production de boues résiduaires qui doivent être éliminées. La stabilisation des boues vise à réduire leur teneur en matière organique fermentescible par traitement biologique, chimique ou thermique.

La stabilisation biologique est basée sur la consommation de la matière organique et des composés nutritifs (azote, phosphore...) par la microflore, aérobie ou anaérobie, présente naturellement dans les eaux usées. La stabilisation biologique peut se faire par voie aérobie ou par voie anaérobie (digestion anaérobie) et peut être psychrophile (10 à 20°C), mésophile (35°C) ou thermophile (53°C). Le compostage constitue un procédé de stabilisation aérobie réalisé sur un milieu solide et carboné. La stabilisation chimique est réalisée par chaulage de la boue afin d'éliminer l'azote ammoniacal, de favoriser la décomposition de la matière organique. Le chaulage est souvent employé sur des boues stabilisées biologiquement et constitue un traitement complémentaire de stabilisation. La stabilisation thermique est réalisée sur des boues déjà déshydratées.

La diminution de la teneur en eau des boues, qui peuvent contenir 95 à 99 % d'eau après stabilisation biologique, est réalisable par épaississement, déshydratation (filtration ou centrifugation) ou séchage. Des traitements tertiaires (déphosphatation, décontamination, élimination de la pollution non biodégradable) peuvent également être appliqués.

Le tableau **44** présente quelques valeurs d'élimination des kystes de *Giardia* dans le traitement des boues.

Tableau 44 : Elimination des kystes de *Giardia* lors du traitement des boues

Traitement	Elimination	Références
Digestion anaérobie mésophile (35°C)	Pas de diminution.	Soares *et al.* (1994)
	Pas de diminution.	Hu *et al.* (1995)
	< 1 %	Rose *et al.* (1996)
	Pas de diminution du nombre de kystes. Mais diminution du nombre de kystes viables.	Thiriat *et al.* (1997)
	Pas de diminution.	Chauret *et al.* (1999)
Epaississement	> 0,96 $\log_{10}$, > 89 %	Rose *et al.* (1996)
Déshydratation	1 $\log_{10}$	Hu *et al.* (1995)
	0,63 $\log_{10}$, 77 %	Rose *et al.* (1996)
	Pas de diminution.	Chauret *et al.* (1999)

Globalement, on constate que la digestion anaérobie mésophile, qui est une des techniques les plus fréquemment évaluées, se révèle inefficace pour éliminer les kystes de *Giardia*. Concernant les techniques de déshydratation et d'épaississement, elles pourraient permettre l'élimination d'environ 90 % des kystes d'après les

travaux de Hu *et al.* (1996) et de Rose *et al.* (1996). Très peu de données sont disponibles concernant la viabilité des kystes suite à ces traitements. On peut toutefois citer les travaux de Thiriat *et al.* (1997) qui ne détectent aucun kyste viable par microscopie optique suite à la digestion anaérobie mésophile des boues.

Les boues résiduaires peuvent être utilisées soit en amendement, soit sous forme de compost (Hu *et al.*, 1996). La valorisation agricole des boues stabilisées tend à se développer pour des raisons économiques et environnementales (Chauret *et al.*, 1999). Comme nous l'avons vu précédemment, le traitement des eaux usées entraîne la concentration d'une partie des micro-organismes et notamment des kystes de *Giardia* dans les boues. L'épandage de ces boues contenant un grand nombre de micro-organismes peut dans certaines conditions entraîner la contamination des eaux de surface et des eaux souterraines par ruissellement (Chauret *et al.*, 1999). L'absence d'un nombre suffisant de données concernant la viabilité et l'infectiosité des kystes, mais aussi le manque de spécificité des techniques de détection couramment utilisées vis-à-vis des espèces et des génotypes, ne permet pas actuellement une évaluation correcte du risque lié à l'utilisation de ces boues.

Description du sujet de thèse et des objectifs

✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣

Les méthodes de référence actuellement développées pour la détection des kystes de *Giardia* dans le milieu hydrique, sont adaptées à l'analyse d'eau potable, d'eau de surface ou d'eau souterraine. Par contre, aucune norme n'est proposée pour la détection de ce protozoaire dans les matrices complexes et notamment les eaux usées brutes ou pré-traitées qui constituent pourtant une des voies de contamination des ressources hydriques environnementales.

A l'heure actuelle, le rôle des différents hôtes de *Giardia* dans la contamination de leur environnement est mal connu, notamment pour *Giardia lamblia* qui est une espèce complexe composée de sept génotypes dont seulement deux, A et B, sont pathogènes pour l'Homme. Ainsi, les premières d'études concernant l'évaluation des différentes espèces de *Giardia* ou des génotypes de *G. lamblia* dans la contamination au niveau du milieu hydrique ont été publiées récemment. De plus, aucune étude française ne porte sur la détection spécifique de *Giardia lamblia* ou de ses génotypes dans des prélèvements environnementaux ou des échantillons biologiques correspondant à des cas sporadiques de giardiose ou à des épidémies.

Si l'analyse d'eaux usées ou de prélèvements de selles humaines ou animales constitue un des moyens d'évaluation du rôle des différents hôtes en tant que réservoir pour ce protozoaire, ce type d'étude nécessite de disposer d'une technique de détection spécifique au niveau des espèces et des génotypes. Malheureusement, l'étape finale de détection des protocoles de référence est réalisée par immunofluorescence qui ne permet pas de distinguer ni les six espèces qui composent le genre *Giardia*, ni les génotypes de l'espèce *Giardia lamblia*.

Les objectifs de notre étude sont de détecter et de quantifier spécifiquement les kystes appartenant aux espèces *Giardia lamblia* et *Giardia muris*, mais aussi d'être capables de distinguer les principaux génotypes de *Giardia lamblia* dans différents types d'échantillons environnementaux ou biologiques. La présence de ces kystes est alors étudiée dans des eaux usées pré-traitées provenant de trois sites sélectionnés en fonction leur contamination fécale d'origine humaine et/ou animale. Des échantillons biologiques constitués par des selles humaines naturellement contaminées par des kystes de *Giardia* et provenant de différents hôpitaux sont également analysés lors de notre étude.

La première partie de nos travaux, réalisée à partir de suspensions purifiées de kystes de *Giardia*, concerne le développement de systèmes de PCR en temps réel et de PCR qualitative destinés à une détection spécifique d'espèce et de génotype. Cette partie primordiale pour la mise en place de notre étude comporte trois étapes principales destinées à l'obtention de ces outils de détection :

* Un bilan et une sélection des gènes cibles permettant soit de distinguer les espèces *G. lamblia* et *G. muris*, soit de détecter spécifiquement les génotypes de l'espèce *G. lamblia*, suivis par une sélection des différentes amorces et sondes à partir de ces séquences cibles.
* L'optimisation des conditions d'amplification au niveau des paramètres constitués par les concentrations en amorces et en sonde.
* La validation des étapes d'extraction de l'ADN et d'amplification à partir de ces suspensions purifiées de kystes.

La deuxième partie de nos travaux concerne le transfert de ces outils à l'analyse d'échantillons d'eaux usées et de selles contenant des concentrations élevées en matière organique et en inhibiteurs pouvant entraîner la production de faux résultats négatifs. Lors de cette étude, l'immunofluorescence est réalisée en parallèle de la détection par PCR de façon systématique. Ainsi, un protocole est également nécessaire pour l'application de cette technique aux eaux usées. Cette deuxième partie de nos expérimentations comprend quatre étapes :

* Une comparaison des techniques de concentration et de purification pour la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence.
* Une comparaison de protocoles d'extraction de l'ADN afin d'adapter les systèmes de détection à l'analyse d'échantillons d'eaux usées.
* Une comparaison de techniques de purification des kystes et de protocoles destinés à limiter l'effet des inhibiteurs de PCR.
* Une évaluation de l'IMS pour la détection par immunofluorescence et PCR en temps réel lors de l'analyse d'eaux usées pré-traitées.

La troisième partie de nos expérimentations concerne la détection spécifique d'espèce et de génotype par PCR à partir de prélèvements provenant de deux stations d'épuration et d'un abattoir, mais aussi de selles humaines naturellement contaminées. Cette troisième partie est basée sur les protocoles développés au cours des deux étapes précédentes. Les objectifs de ces différentes analyses sont de réaliser :

* Une détection par PCR en temps réel des kystes de *G. lamblia*, en parallèle de l'analyse par immunofluorescence, dans des eaux usées caractérisées par une contamination d'origine domestique (station d'épuration de Nancy), animale (abattoir de Metz) ou mixte (station d'épuration de Metz), ainsi qu'une comparaison de leur niveau de contamination par ce protozoaire.
* Une détection par PCR en temps réel des deux génotypes A et B pathogènes pour l'Homme pour l'espèce *G. lamblia*. Une détection des génotypes C et E considérés comme respectivement spécifiques d'animaux domestiques et d'élevage dans ces mêmes échantillons par PCR qualitative. L'évaluation du rôle de chacun de ces génotypes dans la contamination de ces trois types d'eau par *G. lamblia*.
* Le génotypage de kystes de *G. lamblia* isolés de selles humaines par PCR afin de déterminer notamment la proportion de génotypes A et B.

Matériel et Méthodes

❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖

1- Schéma général des expérimentations.

La figure **1** présente les différentes étapes suivies par les suspensions purifiées de kystes de *Giardia*, les prélèvements d'eaux usées et les selles humaines lors de notre étude. Les techniques d'immunofluorescence et de PCR (en temps réel ou qualitative) sont appliquées en parallèle sur ces trois types d'échantillons.

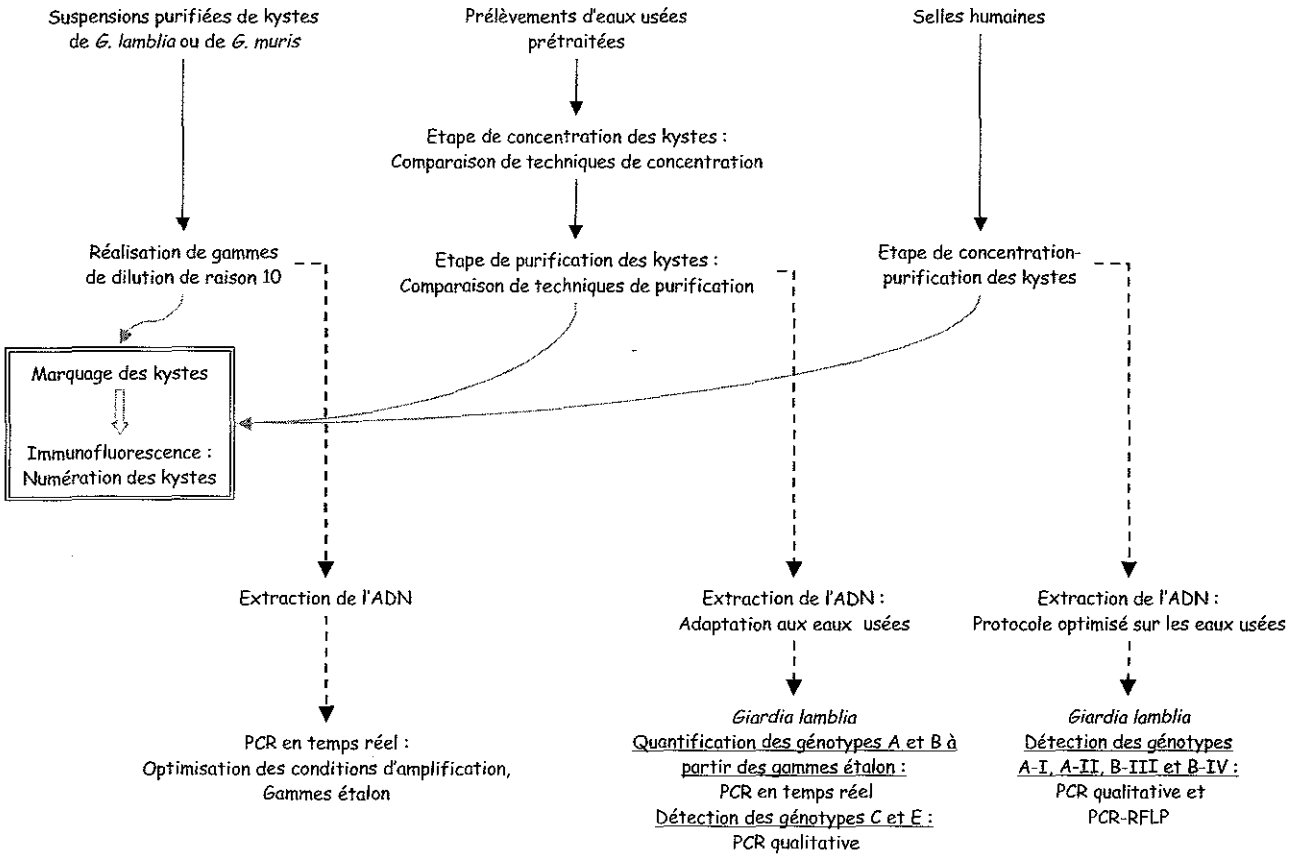


Figure 1 : Schéma général des différentes étapes réalisées sur chaque type d'échantillon (suspensions purifiées de kystes, prélèvements d'eaux usées, selles humaines)

2- Matériel commun à plusieurs protocoles.

- Centrifugeuse à godets oscillants (Jouan, réf. GT422) pour les tubes de 15 et 50 mL.
- Centrifugeuse à rotor fixe (Beckman Coulter, réf. Microfuge® 22R centrifuge) pour les tubes de 1,5 et 2 mL.
- pH mètre (Hanna instruments, réf. HI9622).
- Tampon PBS pH 7,2 (Phosphate Buffer Saline) (Biomérieux, réf. 75511).
- Tubes de 50 mL à fond conique en polypropylène NUNC (Polylabo, réf. 13260.01).
- Tubes de 15 mL à fond conique en polypropylène Greiner Bio-One (Dutscher, réf. 227261).
- Tubes de 1,5 mL Safe-lock en polypropylène (Eppendorf, réf. 0030.120.086).
- Tubes de 2 mL Safe-lock en polypropylène (Eppendorf, réf. 0030.120.094).

Le matériel spécifique à chaque protocole est présenté dans le paragraphe correspondant.

3- Suspensions purifiées de kystes de Giardia lamblia et Giardia muris.

3.1- Suspensions purifiées de kystes fournies par Waterborne ™.

Actuellement, *G. lamblia* et *G. muris* sont les seules espèces pour lesquelles des suspensions purifiées de kystes sont commercialisées. Les suspensions purifiées de kystes utilisées dans le cadre de cette étude sont fournies par Waterborne™, Inc (New Orleans, USA).

Les kystes de *G. lamblia* appartiennent à la souche H3 (génotype B ; Guy *et al.*, 2003), ils ont été initialement isolés de selles humaines. Leur multiplication se fait par passage sur gerbilles. Les kystes de *G. muris* appartiennent à la souche Roberts-Thompson et sont multipliés sur souris.

Avant commercialisation, ces kystes sont purifiés à 95-99 % par des gradients de Percoll™ et de saccharose et des étapes de lavage. Ils sont stockés en suspension dans du tampon PBS (pH 7,4) en présence d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, gentamicine et amphotéricine B). Au laboratoire, les suspensions de kystes sont aliquotées et stockées à -80°C.

3.2- Réalisation de gamme de dilution de kystes.

Les gammes de dilution de kystes en suspensions purifiées, de raison 10, sont réalisées dans du tampon PBS pH 7,2. Ces dilutions sont effectuées avant extraction de l'ADN. Elles sont ensuite utilisées pour la validation des PCR, mais aussi comme gamme étalon pour la quantification des kystes contenus dans les prélèvements d'eaux usées.

3.3- Extraction de l'ADN à partir de kystes en suspensions purifiées.

3.3.1- Matériel.

- QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen, réf. 51504).
- RNA Carrier®, tampon AVL (Qiagen, réf. 19073).
- Ethanol absolu Rectapur™ (VWR Prolabo, réf. 20819).

3.3.2- Protocole d'extraction de l'ADN.

Pour les suspensions purifiées de kystes de *G. lamblia* et *G. muris*, l'extraction de l'ADN est réalisée avec le kit QIAamp® DNA Stool Mini kit. Ce système d'extraction est destiné à la purification d'ADN à partir de selles humaines congelées ou non, ou à partir d'autres échantillons contenant des concentrations élevées en inhibiteurs de PCR.

Ce kit d'extraction est tout d'abord testé suivant le protocole recommandé par Qiagen® avec une première étape de lyse de la paroi des kystes qui est réalisée à 95°C (au lieu de 70°C), cette température est recommandée pour la lyse des parasites et de certaines bactéries dont la paroi est plus résistante. Sur les suspensions purifiées de kystes, une première optimisation est également évaluée, par l'incorporation de RNA Carrier® (1 $\mu g.\mu L^{-1}$ dans du tampon AVL) lors de l'étape de digestion des protéines.

Le protocole d'extraction de l'ADN incluant le RNA Carrier®, nommé REF dans notre étude, est le suivant :

1 **Lyse de la paroi des kystes**	- Ajout de 1,4 mL de tampon ASL à 200 µL de suspension purifiée de kystes dans un tube de 2 mL. - Agitation au vortex 1 minute puis incubation 5 minutes à 95°C. - Agitation au vortex 15 secondes puis centrifugation 20 000 g, 1 minute.
2 **Adsorption des inhibiteurs**	- Dépôt de 1,2 mL de surnageant dans un nouveau tube de 2 mL, ajout de la résine InhibitEX®. - Agitation au vortex 1 minute. Incubation 1 minute à 15-25°C. - Centrifugation 20 000 g, 3 minutes. - Transfert du surnageant dans un tube de 1,5 mL. - Centrifugation 20 000 g, 3 minutes.
3 **Digestion des protéines**	- Dépôt de 15 µL de protéinase K dans un nouveau tube de 1,5 mL. - Ajout de 200 µL de surnageant, 200 µL de tampon AL et 5 µL de RNA Carrier® (1 $\mu g.\mu L^{-1}$ dans du tampon AVL). - Agitation au vortex 15 secondes puis incubation 10 minutes à 70°C.
4 **Purification de l'ADN sur colonne**	- Ajout de 200 µL d'éthanol absolu et agitation au vortex. - Dépôt sur une mini-colonne QIAamp et centrifugation 20 000 g, 1 minute. - Récupération de la colonne et dépôt de 500 µL de tampon AW1. Centrifugation 20 000 g, 1 minute. - Récupération de la colonne et dépôt de 500 µL de tampon AW2. Centrifugation 20 000 g, 3 minutes. - Récupération de la colonne dans un tube de 1,5 mL et élution de l'ADN : dépôt de 200 µL de tampon AE, incubation 5 minutes à 15-25°C puis centrifugation 20 000 g, 1 minute. Stockage de l'extrait à -80°C.

4- Eaux usées.

4.1- Sites de prélèvement des eaux usées.

Les échantillons d'eaux usées ont été prélevés sur trois sites caractérisés notamment par l'origine humaine et/ou animale de leur contamination fécale. Ces trois sites sont constitués par la filière urbaine de la station d'épuration de Nancy-Maxéville (54), la station d'épuration de Metz (57) et l'abattoir de Metz. Les eaux usées analysées dans le cadre de notre étude sont prélevées après l'étape de pré-traitement (dégrillage, dessablage, déshuilage).

La station d'épuration de Nancy-Maxéville comprend deux filières distinctes, une filière urbaine et une filière industrielle traitant les effluents de la brasserie de Champigneulles. Les prélèvements sont uniquement effectués sur la filière urbaine qui reçoit les effluents des 20 communes composant la Communauté Urbaine du Grand Nancy, elle présente une capacité de 340 000 équivalents habitants. Cette filière ne reçoit pas d'eau usée contaminée par des selles d'animaux d'élevage car aucun abattoir n'est en activité sur ce site.

La station d'épuration de Metz (SIVOM) ne comprend qu'une seule filière qui reçoit les eaux usées de 25 communes et peut traiter une pollution équivalent à 444 000 habitants. Cette filière reçoit des eaux usées domestiques, mais aussi des eaux usées industrielles et notamment celles provenant de l'abattoir situé à proximité.

La filière urbaine de Nancy-Maxéville et la station d'épuration de Metz comportent une étape de pré-traitement, une décantation lamellaire, un traitement biologique avec des zones aérobies et anaérobies. Ce traitement biologique permet l'élimination de la pollution carbonée et de la pollution azotée par nitrification-dénitrification. Le traitement d'épuration se termine par une décantation secondaire et un traitement tertiaire de déphosphatation par coagulation au chlorure ferrique et décantation lamellaire.

Le traitement biologique de la filière urbaine de Nancy-Maxéville fait appel à un réacteur biologique de type BIOLIFT qui utilise la technique des bactéries fixées sur un lit de sable fluidisé. Ces deux stations d'épuration permettent de satisfaire les normes de rejets de la réglementation européenne pour la totalité des paramètres et notamment au niveau des concentrations en azote total (10 $mg.L^{-1}$) et en phosphore total (1 $mg.L^{-1}$). Le tableau 1 présente les paramètres moyens journaliers des effluents à l'entrée des stations d'épuration de Nancy-Maxéville et de Metz.

Tableau 1 : Paramètres moyens journaliers des effluents en entrée des stations d'épuration des agglomérations nancéienne et messine

Site	Nancy - Maxéville	Metz
Débit	100 000 m^3	58 340 m^3
DCO (Demande Chimique en Oxygène)	260 $mg.L^{-1}$	552 $mg.L^{-1}$
DBO5 (Demande Biologique en Oxygène)	120 $mg.L^{-1}$	272 $mg.L^{-1}$
MEST (Matière En Suspension Totale)	150 $mg.L^{-1}$	225 $mg.L^{-1}$
NTK (Azote Kjeldahl : azote organique et ammoniacal)	30 $mg.L^{-1}$	46,8 $mg.L^{-1}$
NGL (Quantité d'Azote Globale)	≈ 30 $mg.L^{-1}$	NR
PT (Phosphore Total)	10 $mg.L^{-1}$	6,9 $mg.L^{-1}$

Remarques : NGL = NTK + nitrites + nitrates

Le troisième site de prélèvement d'eaux usées est constitué par l'abattoir de Metz. Le volume d'eaux usées rejeté par l'abattoir est de 400 $m^3.jour^{-1}$. Ces eaux usées sont prétraitées avant d'être acheminées à la station d'épuration de Metz.

4.2- Description des étapes suivies par les échantillons.

La figure 2 résume de façon schématique les différentes étapes suivies par les prélèvements d'eaux usées lors de leur analyse par immunofluorescence et PCR.

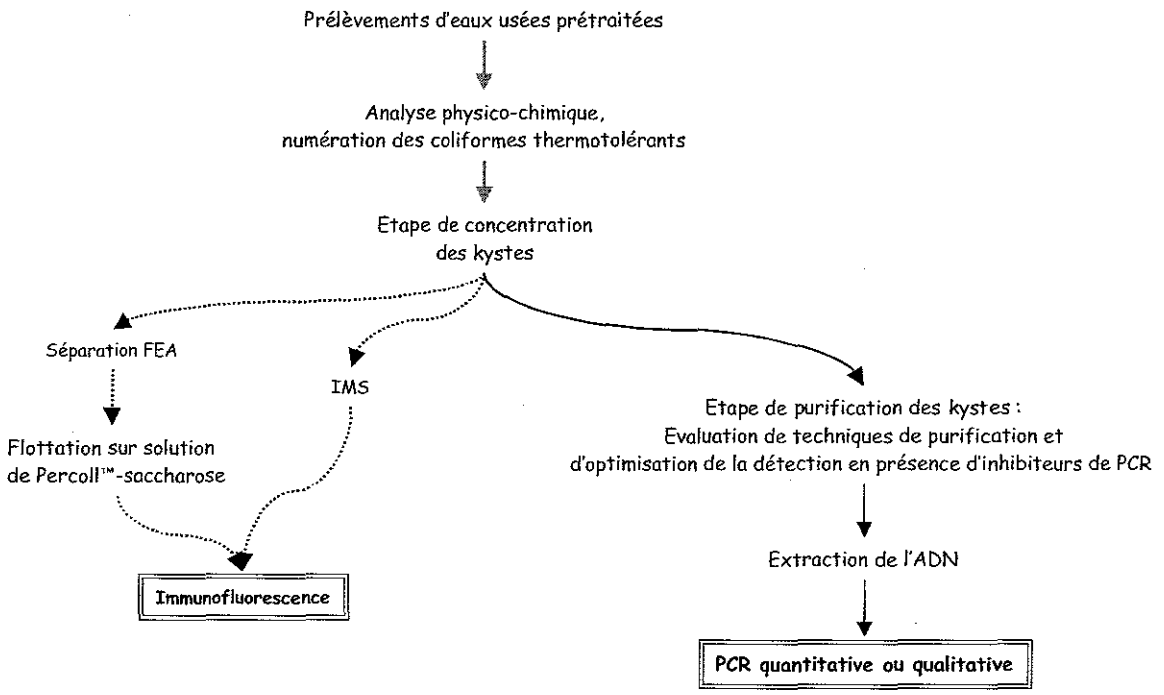


Figure 2 : Schéma des différentes étapes suivies par les prélèvements d'eaux usées prétraitées lors de leur analyse par immunofluorescence et PCR en temps réel

4.3- Analyse physico-chimique et numération des coliformes thermotolérants.

4.3.1- Mesure du pH et de la turbidité.

La mesure de pH est réalisée pour chaque prélèvement, sous agitation et à température ambiante. Le pHmètre (Hanna instruments HI 9622) est équipé d'une sonde pH préalablement étalonnée à température ambiante avec des solutions étalon à des valeurs de pH de 4,0 et 7,0.

La mesure de la turbidité des différents échantillons d'eaux usées est effectuée avec un turbidimètre de laboratoire (PC compact, Aqualytic®, réf. 4206020), la gamme de mesure de turbidité de cet appareil est comprise entre 0,1 et 1 000 NTU (Unités Néphélémétriques de Turbidité). 30 mL de chaque échantillon d'eau sont homogénéisés par retournements. Pour les échantillons présentant une turbidité supérieure à 1 000 NTU une dilution est réalisée avec de l'eau désionisée et la turbidité réelle (T) est calculée avec la formule :

$$T = Td \cdot (Vs + Vd) / Vs$$

(T : turbidité réelle ; Td : turbidité mesurée après dilution ; Vs : volume d'échantillon ; Vd : volume d'eau de dilution).

4.3.2- Numération des coliformes thermotolérants.

4.3.2.1- Matériel.

- Milieu M-FC-Agar (Merck, réf. 1.11278.0500).
- Acide rosolique (Aldrich, réf. 86,132-4) à 1 % dans NaOH 0,2 M.
- Rampe de filtration (Sartorius GmbH, réf. SM16824).
- Membranes stériles quadrillées en nitrocellulose (diamètre : 47 mm, porosité : 0,45 µm) (Millipore, réf. HAWGO4753).

- Préparation des géloses en boîtes de Pétri : 52 g de milieu M-FC-Agar sont portés à ébullition au bain-marie dans 1 L d'eau désionisée. Puis 10 mL d'acide rosolique à 1 % dans NaOH 0,2 N sont ajoutés. Le milieu est agité et porté à ébullition pendant 1 minute. Les géloses sont ensuite coulées en boîtes de Pétri (diamètre : 50 mm) et stockées à + 4°C.

4.3.2.2- Protocole.

Dans notre étude, la numération des coliformes thermotolérants est réalisée d'après la norme ISO 9308/1 (1990). 400 µL d'eau usée sont prélevés et dilués au 1/10 dans 3,6 mL de PBS stérile, des dilutions sont ensuite réalisées au 1/10. 1 mL de dilution connue est filtré sur la rampe de filtration, au travers d'une membrane stérile. Après filtration, la membrane est déposée, face de retenue vers le haut, sur une gélose au M-FC-Agar. Les différents points de la gamme de dilution sont analysés en triplicat.

Après incubation à 44°C ± 0,5°C pendant 18 à 24 heures, les colonies présentant une coloration bleue sont dénombrées. Pour chaque échantillon, le logarithme du nombre d'unités formant colonie pour 100 mL (log UFC.100 mL^{-1}) est calculé selon la formule :

log (100.N.F / V) (N : nombre de colonies comptées ; F: facteur de dilution ; V : volume analysé)

4.4- Techniques de concentration des kystes à partir des eaux usées.

La floculation au carbonate de calcium et la centrifugation sont les deux techniques de concentration des kystes de *Giardia* évaluées dans notre étude.

4.4.1- Procédure de concentration par centrifugation.

100 mL d'eau sont filtrés sur un tamis en inox de porosité 300 µm puis concentrés par deux centrifugations successives à 2000 g pendant 15 minutes dans des tubes de 50 mL. Après chaque centrifugation, le surnageant est éliminé. Les culots obtenus suite à la première centrifugation sont regroupés dans un seul tube avec de l'eau désionisée. Le culot résultant de la deuxième centrifugation est conservé dans les 4 derniers mL à 4°C avant l'étape de purification des kystes. La filtration sur tamis permet d'éliminer les débris les plus volumineux présents notamment dans l'eau usée d'abattoir.

4.4.2- Protocole de concentration par floculation au carbonate de calcium.

La floculation au carbonate de calcium est réalisée sur 10 litres d'eau usée brute selon la méthode décrite par Vesey *et al.* (1993).

4.4.2.1- Matériel.

- Cuve en polypropylène Nalgène (Bioblock, réf. F99131).
- Agitateur à palles (Heidolph, réf. RZR1).
- Pots à centrifuger de 250 mL en polypropylène (Beckman, réf. 356 987).
- Acide sulfamique à 10 % (VWR Prolabo,réf. 20671.366).
- Tween 80 (VWR Prolabo, réf. 28830.291).
- $CaCl_2$ (1 M), $NaHCO_3$ (1 M), NaOH (1 M), HCl (1 M).

4.4.2.2- Procédure de concentration par floculation.

10 L d'eau usée sont versés dans une cuve en polypropylène, mesure du pH initial sous agitation.

Ajout de 100 mL de $CaCl_2$ (1 M), puis de 100 mL de $NaHCO_3$ (1 M).

Le pH est ajusté à 10 par ajout de NaOH (1 M).

Sédimentation du floculat pendant 4 heures à température ambiante.

↓

Le surnageant est éliminé. Le floculat est dissous dans 200 mL d'acide sulfamique,

puis réparti dans les pots à centrifuger de 250 mL.

La cuve est rincée par 200 mL puis 100 mL de tween 80 (0,01 %) répartis dans les pots à centrifuger.

↓

Centrifugation 3 000 g, 10 minutes.

Les culots sont remis en suspension par agitation au vortex et transvasés dans un tube de 250 mL.

↓

Centrifugation 3000 g, 10 minutes.

Le surnageant est éliminé puis le volume est ajusté à 200 mL avec de l'eau désionisée.

Le pH est ajusté à 7 (papier pH). L'échantillon est conservé à + 4°C avant purification.

4.5- Techniques de purification des kystes.

4.5.1- Filtration.

Deux filtrations sous pression négative sont réalisées sur des toiles à bluter Scrynel en polyester de porosité décroissante de 102 µm et 59 µm (Polylabo, réf. 87440.02 et 87442.01). Le filtrat est ensuite concentré par centrifugation (2000 g, 15 min, paragraphe 4.4.1).

4.5.2- Technique de séparation Formaldéhyde-Acétate d'éthyle (FEA).

Il s'agit d'une séparation biphasique réalisée selon le protocole initialement décrit par Weber *et al.* (1992) pour la purification des oocystes de *Cryptosporidium* à partir de selles humaines. Les graisses contenues dans les selles se concentrent sous forme d'un gâteau dans la phase hydrophobe que constitue l'acétate d'éthyle, alors que les matières en suspension hydrophiles (y compris les kystes de *Giardia* et les oocystes de *Cryptosporidium*) s'accumulent dans la phase hydrophile constituée par le formaldéhyde dilué (10 %).

4.5.2.1-Matériel.

- Formaldéhyde à 10 % dans de l'eau désionisée à partir de formaldéhyde à 37 % dans l'eau, stabilisé par 10-15 % de méthanol (Acros, réf. 11969).
- Acétate d'éthyle (Riedel-deHaën, réf. 33211).

4.5.2.2- Protocole de purification FEA.

La figure **3** décrit le protocole de la séparation biphasique Formaldéhyde-Acétate d'éthyle.

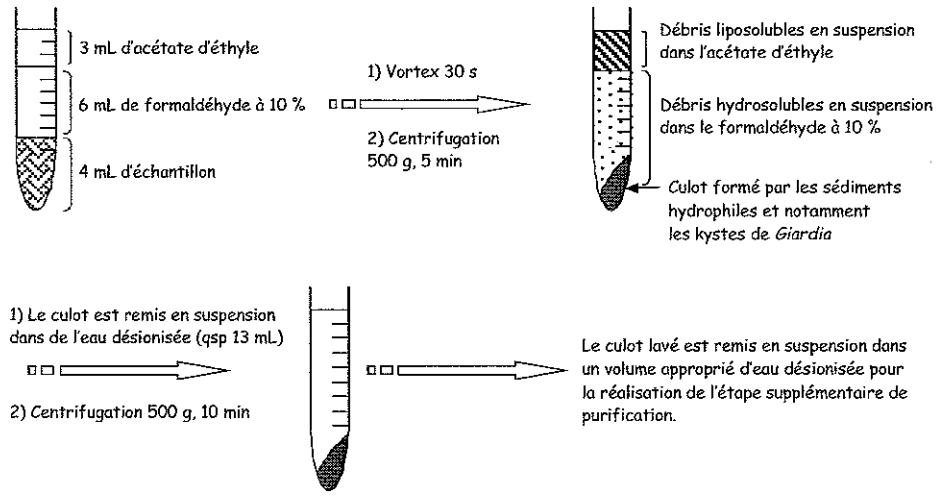


Figure 3 : Procédure de séparation biphasique Formaldéhyde-Acétate d'éthyle d'après Weber *et al.* (1992)

4.5.3- Technique de séparation à l'acétate d'éthyle.

La technique de séparation à l'acétate d'éthyle est basée sur le protocole de la séparation FEA. Dans un tube en polypropylène de 15 mL, le volume de culot est porté à 10 mL avec de l'eau désionisée et 3 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés. Les étapes de centrifugation et de lavage sont identiques à celles appliquées pour la séparation FEA.

4.5.4- Flottation sur solution de Percoll-saccharose.

Cette technique de purification des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium* à partir d'eaux de surface a été proposée par LeChevallier *et al.* (1995). La norme US-EPA de 1995 recommande son utilisation pour la détection de ces deux parasites par immunofluorescence dans les eaux.

4.5.4.1- Matériel.

- Percoll™ (Sigma, réf. P-1644).
- Saccharose (Acros, réf. 42450).
- Préparation de 100 mL de solution de Percoll™-saccharose de densité 1,10 : 10 mL de saccharose (2,5 M), 45 mL d'eau désionisée et 45 mL de Percoll™.

4.5.4.2- Procédure de flottation sur solution de Percoll™-saccharose.

La figure **4** présente le protocole de la purification sur solution de Percoll™-saccharose (densité : 1,10).

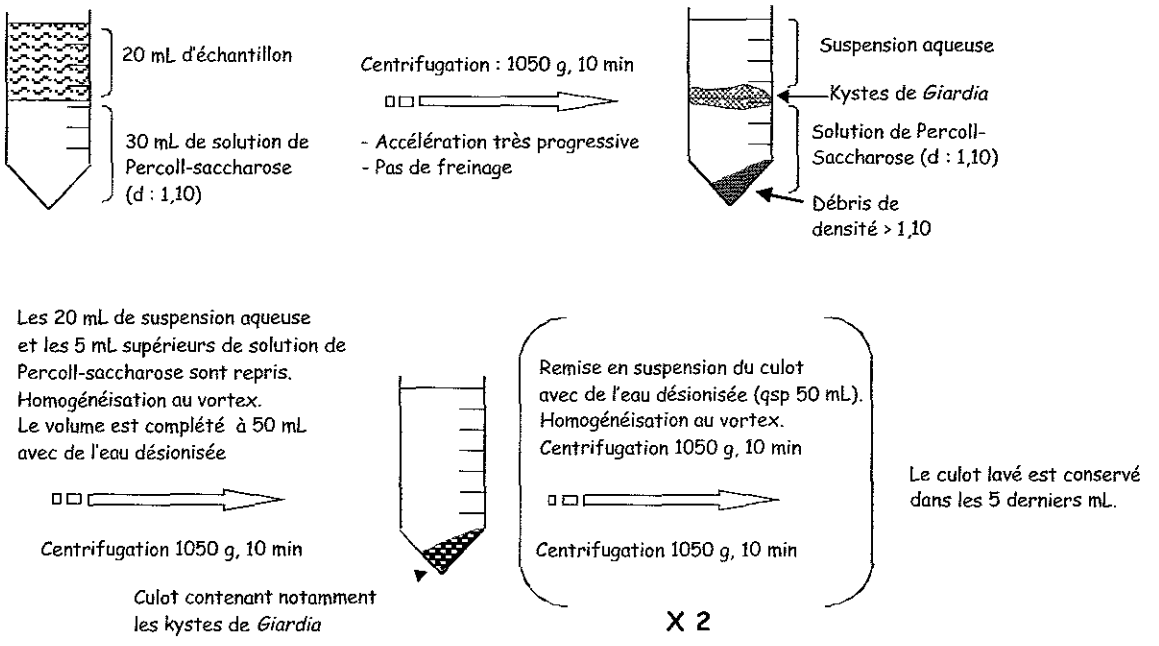


Figure 4 : Procédure de purification par flottation sur solution de Percoll™-saccharose

4.5.5- Gradient de densité sur solutions de bromure de potassium.

Lors de la comparaison de différentes procédures de purification des kystes de *Giardia*, nous évaluons notamment le gradient de densité sur solutions de bromure de potassium. Le protocole utilisé a été proposé par Chesnot et Schwartzbrod (2004) et fait intervenir quatre couches de densité 1,01, 1,04, 1,12 et 1,23. Ces auteurs ont développé ce protocole pour la purification des oocystes de *Cryptosporidium* dont la densité est très proche de celle des kystes de *Giardia*. La figure **5** décrit la mise en œuvre de ce protocole et le tableau **2** rapporte la composition des solutions de bromure de potassium. Trois lavages des solutions récupérées sont réalisés à l'eau désionisée par centrifugation (1050 g, 10 min).

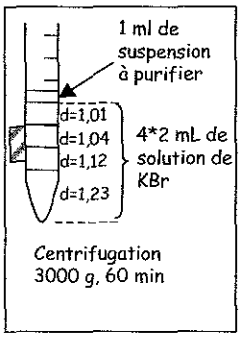


Figure 5 : Protocole proposé par Chesnot et Schwartzbrod (2004). La zone grisée correspond à la partie récupérée après centrifugation.

Tableau 2 : Composition des solutions de bromure de potassium

Densité de la solution	Masse de KBr dissoute dans du Tris-EDTA (pH 7,2) en $g.L^{-1}$
1,01	20,25
1,04	62,56
1,12	179,90
1,23	346,70

4.5.6- Gradient de densité sur solutions de saccharose.

Le protocole de purification sur solutions de saccharose est comparable à celui basé sur les solutions de bromure de potassium. Quatre couches de densité 1,01, 1,04, 1,11 et 1,30 sont utilisées. La figure **6** décrit le protocole de purification et le tableau **3** précise les concentrations en saccharose des solutions utilisées. Trois lavages des solutions récupérées sont réalisés à l'eau désionisée par centrifugation (1050 g, 10 min).

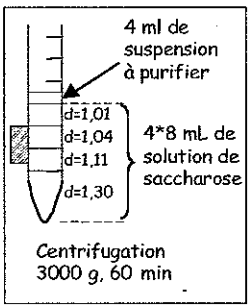


Figure 6 : Protocole de purification sur solutions de saccharose

Tableau 3 : Composition des solutions de saccharose

Densité de la solution	Masse de saccharose dissoute dans de l'eau désionisée ($g.L^{-1}$)
1,01	30,3
1,04	114,7
1,11	300,5
1,30	804,9

4.5.7- Gradient de densité sur solutions de Nycodenz™.

Un protocole de gradient de densité sur solutions de Nycodenz™ (Sigma D-2158) est réalisé suivant le mode opératoire développé par Chesnot et Schwartzbrod (2004) pour la purification des oocystes de *Cryptosporidium*. Comme dans le cas des gradients de densité sur solutions de saccharose et de bromure de potassium, l'échantillon à purifier est déposé sur quatre couches de densité décroissante. Le protocole est décrit sur la figure **7**. Trois lavages des solutions récupérées sont réalisés à l'eau désionisée par centrifugation (1050 g, 10 min).

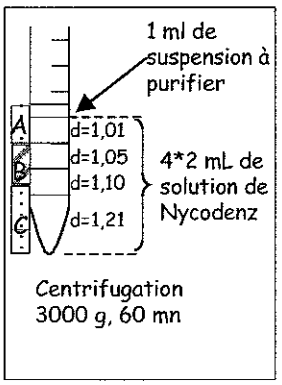


Figure 7 : Protocole de purification sur solutions de Nycodenz™

Les densités de ces couches sont 1,01, 1,05, 1,10 et 1,21, leur composition est reportée dans le tableau **4**.

Tableau 4 : Composition des solutions de Nycodenz™

Densité de la solution	Masse de Nycodenz™ dissoute dans du Tris-EDTA pH 7,2 en $g.L^{-1}$
1,01	25
1,05	50
1,10	100
1,21	200

4.5.8- Séparation immunomagnétique (IMS).

Le kit IMS utilisé dans cette étude est basé sur l'utilisation de billes microscopiques, uniformes, monodispersées, paramagnétiques, recouvertes d'anticorps purifiés dirigés contre les kystes de *Giardia* et liés par covalence à leur surface. Cette purification des kystes de *Giardia* est s'effectue en deux étapes principales :

- La séparation immunomagnétique est réalisée par la formation des complexes billes-kystes, suivie de leur séparation de l'échantillon environnemental.
- La dissociation des complexes billes-kystes de *Giardia*.

4.5.8.1- Matériel.

- Kit Dynabeads® GC-Combo (Dynal, réf. 730.12) contenant : tampon™ SL-A 10 X, tampon™ SL-B 10 X, billes Dynabeads® *Cryptosporidium* et Dynabeads® *Giardia*. Les billes sont fournies en suspension dans du tampon PBS pH 7,4 avec 0,1 % de BSA.
- Tubes Leighton à côté plat L10 (Dynal, réf.740.03).
- Agitateur rotatif MX2 (Dynal, réf.159.08).
- Concentrateur de particules magnétiques pour tubes Dynal L10 MPC®-1 (Dynal, réf. 120.01).
- Concentrateur de particules magnétiques pour tubes de 1,5 mL MPC®-S (Dynal, réf. 120.20).
- Pour chaque échantillon, préparer 1 mL de tampon SL-A à une concentration 1X à partir du tampon SL-A 10X par dilution au 1/10 dans de l'eau désionisée.
- HCl 0,1 M et NaOH 1 M.

4.5.8.2- Procédure IMS.

Dans un tube L10 à côté plat :

déposer 1 mL de tampon SL-4 10X, 1 mL de tampon SL-B 10X et les 10 mL d'échantillon.

Ajouter 100µL de billes anti-*Giardia* après les avoir bien remises en suspension par agitation au vortex.

↓

Placer le tube dans l'agitateur rotatif pendant 1 heure à température ambiante.

Placer ensuite le tube dans le concentrateur de particules MPC-1.

Incliner le tube de 90° d'un côté puis de l'autre, à raison d'un mouvement par seconde, pendant deux minutes.

Eliminer ensuite le surnageant sans enlever le tube du concentrateur de particules.

↓

Enlever le tube du concentrateur de particules,

Mettre l'échantillon en suspension dans 1 mL de tampon SL-A 1X.

Remettre les billes en suspension sans agitation au vortex et les transférer dans un tube de 1,5 mL.

↓

Placer ce tube dans le concentrateur de particules MPC-S avec la barre aimantée.

Incliner le tube de 90° d'un côté puis de l'autre à raison d'un mouvement par seconde, pendant deux minutes.

Les complexes billes-kystes forment alors une tache rouge distincte à l'arrière du tube.

Enlever la barre aimantée du concentrateur de particules et ajouter 50 µL d'HCl (0,1M).

Homogénéiser par agitation au vortex pendant 10 secondes.

Laisser reposer en position verticale pendant 10 minutes.

Homogénéiser de nouveau par agitation au vortex pendant 10 secondes.

Placer le tube dans le concentrateur de particules MPC-S et remettre la barre aimantée.

Laisser le tube au repos pendant 10 secondes.

Déposer 5 µL de NaOH (1M) dans un nouveau tube de 1,5 mL et y déposer la suspension acide contenant les kystes de *Giardia* dissociés des billes.

4.5.8.3- Modifications apportées au protocole initial.

Deux lavages des complexes billes-*Giardia*, par 5 mL de tampon PBS (pH 7,2), sont ajoutés avant la mise en suspension des complexes dans le tampon SL-A 1X afin d'améliorer l'élimination des débris présents en quantité importante dans les échantillons d'eaux usées.

L'action de la chaleur (80°C, 10 minutes dans un bain-marie) sur la dissociation des complexes billes-anticorps est comparée à l'utilisation d'acide chlorhydrique.

4.6- Procédés visant à améliorer la détection par PCR à partir d'échantillons environnementaux.

4.6.1- Techniques visant à améliorer la lyse des kystes.

Deux méthodes, les cycles de congélation-décongélation et les ultrasons, sont évalués pour l'optimisation de la lyse de la paroi des kystes présents dans les échantillons environnementaux.

Les cycles de congélation-décongélation sont constitués de deux étapes de quatre minutes chacune, à -80°C et +90°C. Ces cycles sont répétés cinq fois.

Lors du traitement par les ultrasons, les échantillons sont placés pendant 20 minutes dans un bain-marie (50°C) à ultrasons d'une puissance de 120 W (Deltasonic, réf. 011C).

4.6.2- Procédés visant à limiter l'effet des inhibiteurs lors de la détection par PCR.

Différentes molécules sont testées pour masquer l'effet des inhibiteurs lors de la détection par PCR, elles sont présentées dans le tableau **5**.

Tableau 5 : Produits testés pour masquer l'effet des inhibiteurs lors des réactions de PCR

	Produit	Référence
Avant amplification	PVP 360 (Polyvinylpyrrolidone)	Sigma, P-5288
	Chelex-100	BioRad, 142-1253
Pendant l'amplification	BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma, B-8894
	Glycérol	Sigma, G-5516
	DMSO	Sigma, D-8418

La BSA, le glycérol et le DMSO sont inclus dans le milieu réactionnel lors de la PCR.

Le Chelex-100 est soit utilisé au cours du protocole d'extraction, soit à la fin de ce protocole. Dans le premier cas, 500 µL de surnageant obtenu après traitement par la résine InhibitEx® et 500 µL de Chelex-100 à une concentration finale de 25 % sont placés à 56°C pendant 20 minutes et centrifugés à 20 000 g pendant 3

minutes. Le surnageant est récupéré et utilisé pour la suite du protocole d'extraction. Dans le deuxième cas, 200 µL d'extrait et 200 µL de Chelex-100 à une concentration finale de 25 % sont placés à 56°C pendant 20 minutes, puis centrifugés à 20 000 g pendant 3 minutes. Le surnageant est récupéré et stocké à -80°C.

Lors du traitement associant le chelex-100 et la PVP-360, 1,2 mL de surnageant obtenus suite à l'étape de lyse des kystes et 400 µL de Chelex-100 et PVP-360 à une concentration finale de 2 et 20 % sont placés 30 minutes à 55°C. Après centrifugation à 20 000 g pendant 3 minutes, 1,2 mL de surnageant sont récupérés et mis en présence de la résine InhibitEx®.

4.7- Extraction de l'ADN.

4.7.1- Matériel.

Réactifs utilisés spécifiquement pour l'extraction d'ADN à partir d'eaux usées :

- Glycogène (VWR Prolabo, réf. 24405).
- Ethanol 70 % vol. à partir d'éthanol 95-96 % vol. Rectapur™ (VWR Prolabo, réf. 20824).

4.7.2- Protocole d'extraction de l'ADN à partir d'échantillons d'eaux usées.

Pour les suspensions de kystes de *Giardia* obtenues à partir des prélèvements d'eaux usées brutes, six variantes du protocole REF sont testées.

✱ **Protocole A** : La première étape de l'extraction de l'ADN est modifiée par augmentation du volume de tampon ASL à 2,6 mL afin d'optimiser l'efficacité de la lyse de la paroi des kystes.

✱ **Protocole B** : Les étapes de lyse de la paroi des kystes et d'adsorption des inhibiteurs sur la résine InhibitEX® sont optimisées par augmentation du temps d'incubation à 95°C de 5 à 10 minutes et par augmentation du temps de contact avec la résine de 1 à 3 minutes.

✱ **Protocole C** : Les étapes de digestion des protéines et de purification sur mini-colonne sont doublées. En effet, après la première élution de la mini-colonne avec le tampon AE, le protocole est repris à l'étape de digestion des protéines avec l'éluat.

✱ **Protocole D** : La précipitation à l'éthanol du protocole de Chomczynski et Sacchi (1987) est réalisée sur l'extrait obtenu après élution de la mini-colonne avec le tampon AE.

400 µL d'éthanol absolu et 1 µL de glycogène (20 mg .mL^{-1}) sont ajoutés à l'éluat.

⊻

Incubation 60 minutes à -20°C puis centrifugation à 10 000 g, 15 minutes.

⊻

Le culot est remis en suspension dans 1 mL d'éthanol à 70 % vol. et centrifugé à 10 000 g, 15 minutes.

⊻

Le culot est remis en suspension dans 30 µL de tampon AE est stocké à -80°C.

✱ **Protocole E** : Cette alternative au protocole REF est une combinaison des protocoles B et C.

✱ **Protocole F** : Cette alternative au protocole REF est une combinaison des protocoles A et C.

Le tableau **6** présente les différents niveaux d'action des six variantes du protocole REF.

Tableau 6 : Les différents niveaux d'action des six variantes du protocole REF (protocoles A, B, C, D, E et F)

Etapes du protocole d'extraction				ADN extrait
1- Lyse de la paroi des kystes	2- Adsorption des inhibiteurs	3- Digestion des protéines	4- Purification de l'ADN sur colonne	
Protocole A				
Protocole B	Protocole B			
		Protocole C	Protocole C	
				Protocole D
Protocole E	Protocole E	Protocole E	Protocole E	
Protocole F		Protocole F	Protocole F	

5- Selles humaines.

5.2- Origine des prélèvements analysés.

41 prélèvements de selles provenant de patients de différents hôpitaux sont analysés dans le cadre de cette étude. Parmi ces échantillons, 26 correspondent à des cas sporadiques de giardiase et proviennent des hôpitaux publics de Nancy-Brabois (n = 11), de la Pitié-Salpêtrière (n = 6) et Bichat (n = 1) à Paris ou de l'hôpital militaire Legouest à Metz (n = 8). Par contre, 15 échantillons correspondent à des cas regroupés de giardiase et proviennent de l'hôpital militaire Legouest. Les échantillons sont conservés à +4°C et analysés dans les 24 heures suivant leur arrivée au laboratoire.

5.2- Procédures de purification-concentration des kystes de Giardia à partir de selles.

L'étape de purification concentration est réalisée soit avec le protocole développé par Thiriat *et al.* (1998) qui correspond à une chromatographie gel filtration, soit par une séparation à l'acétate d'éthyle.

5.2.1- Séparation à l'acétate d'éthyle.

Le protocole de séparation diphasique à l'acétate d'éthyle est décrit dans le paragraphe 4.5.3.

5.2.2- Purification-concentration par chromatographie gel-filtration.

Ce protocole développé dans ce laboratoire par Thiriat *et al.* (1998) est constitué d'une première étape de filtration sur des toiles à bluter en polyester de porosité décroissante suivie par une chromatographie sur gel de Sephadex.

5.2.2.1- Matériel.

Matériel utilisé pour l'étape de filtration :

Cette première étape est réalisée sous pression négative en utilisant une trompe à vide.

- Fiole à vide en pyrex, 250 mL (Polylabo, réf. 11311).
- Entonnoir 100 mL (Millipore, réf. XX1004706).
- Embase avec bouchon, sans grille (Millipore, réf. XX1004733).
- Pince d'assemblage, 47 mm (Millipore, réf. XX1004703).

- Toiles à bluter Scrynel en polyester de porosité décroissante : 300 µm, 102 µm et 59 µm (Polylabo, réf. 87435.01, 87440.02 et 87442.01).
- Tween 20 (VWR Prolabo, réf. 20880.296).

Matériel utilisé pour l'étape de chromatographie gel filtration :

- 4,5 g de Sephadex G-50 medium (Pharmacia Biotech, réf. 17004302) dans 100 mL de Tween 20 à 0,001 % dans de l'eau désionisée. Incubation à température ambiante pendant trois heures.
- Une seringue en polypropylène de 60 cm^3 est utilisée comme colonne (hauteur 11 cm, diamètre 2,5 cm) (Polylabo, réf. 49808).
- Disque de toile à bluter Scrynel (diamètre : 2,5 cm) de porosité 59 µm pour retenir le gel de Sephadex dans la colonne.

5.2.2.2- Protocole.

Triturer la selle avec la solution de Tween 20 à 0,001 %.

↓

Filtrer sur les 3 toiles à bluter Scrynel de porosité décroissante (300, 102 et 59 µm).

↓

Centrifuger le filtrat dans les tubes de 50 mL à 1050 g pendant 10 minutes.

Regrouper les culots avec la solution de Tween 20 à 0,001 %.

↓

Filtrer le culot sur le gel de Sephadex.

Eluer 7 fractions de 50 mL avec la solution de Tween 20 à 0,001 %.

↓

Centrifuger les éluats 10 minutes à 1050 g.

Regrouper les culots avec la solution de Tween 20 à 0,001 %.

5.3-Obtention d'une suspension purifiée de kystes à partir de selles humaines.

Une suspension purifiée de kystes de *G. lamblia* appartenant à l'assemblage A est obtenue à partir d'une selle humaine d'un patient du C.H.U. de Nancy-Brabois. Trois étapes sont réalisées successivement afin d'obtenir un niveau de purification satisfaisant. La première étape est une purification à l'acétate d'éthyle (paragraphe 4.5.3), suivie par une flottation sur solution de Percoll™-saccharose de densité 1,10 (paragraphe 4.5.4) et enfin par une purification sur gradient de saccharose (paragraphe 4.5.6).

5.4- Extraction de l'ADN.

L'extraction d'ADN à partir des kystes isolés de selles humaines est réalisée avec le protocole E décrit dans le paragraphe 4.7.2.

6- Quantification des kystes de Giardia en immunofluorescence.

Dans notre étude, la quantification microscopique des kystes de *Giardia* est réalisée grâce à un double marquage afin de détecter l'ensemble des kystes de *Giardia* et les kystes contenant encore leurs noyaux.

L'immunofluorescence directe est réalisée grâce à un anticorps monoclonal couplé à un fluorochrome constitué par le FITC (IsoThioCyanate de Fluorescéine). Cet anticorps produit sur souris est spécifique de la paroi externe des kystes, il permet d'identifier les kystes mais n'autorise pas la spécification de l'espèce.

La coloration fluorogénique est réalisée grâce à l'utilisation de PI (iodure de propidium). L'iodure de propidium est un colorant basique, marqueur de létalité car il est inclus uniquement dans les cellules non viables dont la membrane est endommagée (Schupp et Erlandsen, 1987). Le PI permet le marquage de l'ADN des cellules non viables. Ainsi, nous utilisons ce colorant sur les échantillons congelés à - 80°C ce qui entraîne la mort des kystes de *Giardia*. Il autorise alors la mise en évidence des noyaux dans les kystes ce qui permet de connaître les concentrations en kystes contenant leur matériel nucléaire et pouvant être détectés par PCR en temps réel lors de l'utilisation en parallèle de ces deux techniques de quantification.

6.1- Matériel.

Pour le marquage :

- Anticorps monoclonal conjugué au FITC : Giardia-a-Glo (Waterborne™ Inc., réf. A300FLR-20 X).
- BSA 1 % (Bovine Serum Albumin) (Sigma, réf. A9647).
- NGS 10 % (Normal Goat Serum) (Sigma, réf. G9023).
- PI (Sigma, réf. P-4170).
- L'anticorps Giardi-a-Glo™ est dilué au 1/20 dans une solution de dilution constituée par du tampon PBS pH 7,2 contenant des agents bloquants : BSA 1 % et NGS 10 %.
- La solution stock de PI à 1 $mg.mL^{-1}$ est préparée dans du tampon PBS pH 7,2.

Pour l'observation microscopique :

- Lames porte-objet en verre de dimension 76 x 26 x 1 mm (CML, réf. LLR).
- Lamelles standard en verre de dimension 24 x 32 mm (CML, réf. LCO2432M).
- Microscope à fluorescence de type Axioskop (Zeiss), lampe à vapeur de mercure (HBO, 100 W).
- Filtres chromatiques FITC (Zeiss, réf. 487909) et PI (Zeiss, réf. 487915).

6.2- Protocole de marquage.

Dans un tube Eppendorf de 1,5 mL :

100 µL de suspension de kystes purifiés, 40 µL d'anticorps dilué et 10 µL de solution stock de PI.

↓

Incuber à 37°C en étuve pendant 35 à 45 min.

↓

Laver avec 850 µL de tampon PBS. Centrifuger 6000 g, 2 min.

↓

Conserver 100 µL de culot pour l'observation microscopique.

6.3- Observation microscopique.

La totalité du culot est observée au microscope à épifluorescence en fractions de 10 µL entre lame et lamelle. Le tableau **7** présente les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du FITC et du PI.

Tableau 7 : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission du FITC et du PI

Fluorochrome	Longueurs d'onde (nm)	
	Excitation	Emission
FITC	450 à 490	520
PI	546	590

Le repérage initial des kystes est réalisé avec le filtre FITC au grossissement x 100. Les structures ovoïdes, de 8 à 16 µm sur 5 à 15 µm, présentant au niveau de leur paroi cellulaire une fluorescence verte distincte due au FITC, sont identifiées comme des kystes de *Giardia*.

L'analyse avec le filtre PI est réalisée au grossissement x 200. Les kystes présentant une coloration rouge avec le filtre chromatique PI sont comptabilisés comme des kystes contenant encore leurs noyaux et pouvant être détectés par PCR.

Le nombre total de kystes (FITC positifs) et le nombre de kystes contenant encore leurs noyaux (PI positifs) sont déterminés pour chaque échantillon. Lors de notre étude, l'observation microscopique d'un échantillon de 100 µL a nécessité de 3 à 7 heures suivant sa turbidité.

7- Détection par PCR en temps réel et PCR qualitative.

7.1- Séquences des gènes TPI et EF1A disponibles sur la base de données Genbank.

Les caractéristiques des différentes séquences des gènes TPI et EF1A disponibles sur la base de données Genbank pour plusieurs espèces du genre *Giardia* et plusieurs génotypes de l'espèce *G. lamblia* sont présentées dans les tableaux **8A** à **8D** regroupés à la fin de ce chapitre Matériels et Méthodes (pages 115 à 117). Ces séquences sont utilisées pour la réalisation des arbres phylogénétiques et pour la sélection des amorces et des sondes.

7.2- Quantification des espèces G. lamblia et G. muris et des génotypes A et B de G. lamblia par PCR en temps réel.

7.2.1- Matériel.

- Tubes PCR MicroAmp de 200 µL (Applied Biosystems, réf. N801-0540).
- Microplaque de 96 puits pour PCR quantitative (Applied Biosystems, réf. 4306737).
- Barette de capuchons pour microplaque de 96 puits (Applied Biosystems, réf. N801-0935).
- Thermocycleur ABI Prism 7700 Sequence Detector, logiciel SDS version 1.6.3 (Applied Biosystems).
- Taq Man Universal Master Mix (Applied Biosystems, réf. 4304437).
- Eau Rnase-DNase free (Sigma, réf. W4502).
- Sonde (Applied Biosystems) et amorces sens et antisens (Proligo).

7.2.1.1- Critères de sélection des amorces et des sondes TaqMan et TaqMan MGB.

Les amorces, ainsi que les sondes Taq Man et TaqMan MGB pour la PCR en temps réel sont dessinées à l'aide des logiciels Primer Express versions 1.0 et 1.5 respectivement. A partir de la séquence nucléotidique à quantifier et en tenant compte des critères de sélection présentés dans le tableau **9**, ces logiciels proposent un choix de sondes et d'amorces permettant d'obtenir un amplicon d'environ 100 paires de bases.

Tableau 9 : Critères à appliquer pour dessiner les amorces et sondes Taq Man (logiciel Primer Express, version 1.0) et TaqMan MGB (logiciel Primer Express, version 1.5) pour la PCR en temps réel (ABI Prism 7700)

Critères communs aux systèmes TaqMan et TaqMan MGB	
- Eviter les répétitions de bases identiques. - Pas de répétitions de 4 bases et plus, surtout pour la guanine. - Placer les amorces sens et antisens le plus près possible de la sonde sans la chevaucher.	
Amorces	**Sonde**
- Tm compris entre 58 et 60 °C. - Pas plus de 2 bases G ou C dans les 5 derniers nucléotides en 3'.	- Pas de base G en 5' (risque de quenching).
Critères spécifiques aux systèmes Taq Man MGB	
Amorces	**Sonde TaqMan MGB**
- Pourcentage de GC compris entre 20 et 80 %.	- Tm compris entre 65 et 67 °C. - Sonde la plus courte possible mais comportant au minimum 13 nucléotides. - Positionner la variation de séquence dans le tiers central de la sonde.
Critères spécifiques aux systèmes Taq Man	
Amorces	**Sonde TaqMan**
- Pourcentage de GC compris entre 30 et 80 %.	- Tm compris entre 68 et 70°C. - Pourcentage de GC compris entre 30 et 80 %. - Sélectionner une sonde contenant plus de bases C que de bases G.

7.2.1.2- Caractéristiques des sondes et amorces utilisées pour la quantification des espèces *G. lamblia* et *G. muris*.

Le tableau **10** présente les séquences nucléotidiques et les caractéristiques des amorces et des sondes TaqMan MGB utilisées pour la quantification spécifique des espèces *G. lamblia* et *G. muris*. Les amorces sens et antisens sont communes aux deux PCR en temps réel (PCRq-*lamblia* et PCRq-*muris*). Pour les deux sondes, les bases encadrées correspondent aux variations de séquences entre *G. lamblia* et *G. muris*.

7.2.1.3- Caractéristiques des sondes et amorces utilisées pour la quantification des assemblages A et B de l'espèce *G. lamblia*.

Les séquences et les caractéristiques des amorces et des sondes TaqMan utilisées pour la quantification des assemblages A et B de l'espèce *G. lamblia* sont présentées dans le tableau **11**.

Tableau 10 : Séquences et caractéristiques des amorces et des sondes TaqMan MGB utilisées pour la quantification de *G. lamblia* (PCRq-*lamblia*) et *G. muris* (PCRq-*muris*)

Cible	Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position
***G. lamblia* et**	GIAF2	Amorce sens	GAG ATG AYG AAG CAG CTC AAG AAC	46	58	24	338 - 361
G. muris	GIAR1	Amorce antisens	CTC GTA CCA SGG CAT CTT GTC	57	58	21	460 - 440
G. lamblia	LAP-1	Sonde	FAM - TTC GA[C] TAC AT[C] CC - NFQ	50	66	14	386 - 399
G. muris	MUP-1	Sonde	VIC -AGT TCG A[T]T ACA T[T]C C - NFQ	38	65	16	384 - 399

La position des amorces et des sondes est donnée sur la séquence de l'isolat BAH-12 (réf. Genbank : AF069569) pour *G. lamblia* et de l'isolat Ad-120 (réf. Genbank : AF069566) pour *G. muris*.

Les bases encadrées correspondent aux variations de séquence entre ces deux espèces.

Remarque : Y = C ou T et S = C ou G.

Tableau 11 : Séquences et caractéristiques des amorces et sondes TaqMan utilisées pour la quantification des génotypes A (PCRq-A) et B (PCRq-B) de *G. lamblia*.

Cible	Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position
***G. lamblia* Génotype A**	A-for	Amorce sens	GGA GAC CGA CGA GCA AAG C	63	60	19	839 - 857
	A-rev	Amorce antisens	CTT GCC AAG CGC CTC AA	59	58	17	970 - 986
	Giardia-A	Sonde	FAM - TCT TCT GCG TCG GAG AGA CCT TGG A - TAMRA	56	68	25	901 - 925
***G. lamblia* Génotype B**	B-for	Amorce sens	AAT AGC AGC ACA RAA CGT GTA TCT G	44	59	25	126 - 150
	B-rev	Amorce antisens	CCC ATG TCC AGC AGC ATC T	58	58	19	188 - 206
	Giardia-B	Sonde	FAM - CAT GGA CCG GCG AGA CAA GCG T - TAMRA	64	69	22	164 - 185

La position des amorces et des sondes est donnée sur la séquence de l'isolat WB (réf. Genbank : L02120) pour le génotype A et de l'isolat BAH-12 (réf. Genbank : AF069561) pour le génotype B.

7.2.2- Préparation du milieu réactionnel.

Les concentrations initiales et finales, ainsi que le volume de chaque réactif entrant dans la composition du milieu réactionnel de PCR quantitative sont présentés dans le tableau **12**. Le volume réactionnel est de 50 µL par puits. Les volumes utilisés et les concentrations finales des amorces et des sondes sont donnés pour des concentrations optimisées.

Tableau 12 : Composition du milieu réactionnel utilisé en PCR quantitative

Réactif	Concentration initiale	Volume par puits	Concentration finale
TaqMan Universal Master Mix	2 X	25 µL	1X
Amorce sens	10 µM		0,5 - 1 µM
Amorce antisens	10 µM		0,5 - 1 µM
Sonde	5 µM-6 µM		0,25 µM-0,30 µM
Eau RNase-DNase free			
ADN extrait		5 µL	

Le réactif TaqMan Universal Master Mix contient les différents éléments constitutifs du milieu réactionnel de PCR hormis les amorces et la sonde. Les différents composants de ce réactif sont l'AmpliTaq Gold DNA polymérase, l'AmpErase®uracil-N-glycosylase (UNG), des dNTP dont les dUTP, une référence passive (ROX) permettant la normalisation du signal lors des variations de température, un tampon PCR optimisé contenant notamment du $MgCl_2$ (5 mM). L'utilisation de ce réactif destiné à la PCR en temps réel permet de limiter l'optimisation des conditions de PCR à la détermination des concentrations optimales en amorces et en sonde.

7.2.3- Conditions d'amplification.

L'amplification de l'ADN par PCR en temps réel est réalisée en plusieurs étapes. L'étape initiale de 2 minutes à 50°C est suivie d'une activation enzymatique de 10 minutes à 95°C et enfin de 50 cycles composés chacun de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

7.2.4- Analyse des résultats en PCR quantitative.

La mesure de l'intensité de fluorescence émise par le fluorochrome libéré du quencher est réalisée lors de chaque cycle d'amplification. Le paramètre utilisé pour l'analyse des résultats est le Ct qui représente le cycle seuil à partir duquel la fluorescence est considérée comme significativement supérieure à la ligne de base ou seuil. Cette ligne de base est fixée par le logiciel et correspond à l'intensité de fluorescence mesurée soit dans des tubes témoins ne contenant pas d'ADN, soit lors des 15 premiers cycles d'amplification. La valeur du Ct est inversement proportionnelle à la quantité initiale d'ADN.

7.3- Détection des génotypes A, B, C et E de Giardia lamblia par PCR qualitative.

Concernant les prélèvements d'eaux usées de l'abattoir et des stations d'épuration de Nancy et Metz, les kystes appartenant aux génotypes A et B sont quantifiés par PCR en temps réel. En revanche, pour les kystes de *G. lamblia* des génotypes C et E, la détection est effectuée par PCR qualitative puisqu'il ne nous a pas été possible d'obtenir ces kystes en suspensions purifiées pour la réalisation d'une gamme étalon.

Les kystes de *G. lamblia* isolés de selles humaines sont analysés par PCR et PCR-RFLP afin de déterminer leur génotype. La PCR-RFLP associe l'amplification de l'ADN à une étape de digestion par une enzyme de restriction. Lors de notre étude, deux enzymes de restriction sont utilisées afin de distinguer les génotypes A-I, A-II, B-III et B-IV. La figure 8 présente les différentes étapes suivies par un extrait d'ADN obtenu à partir de kystes isolés de selles humaines.

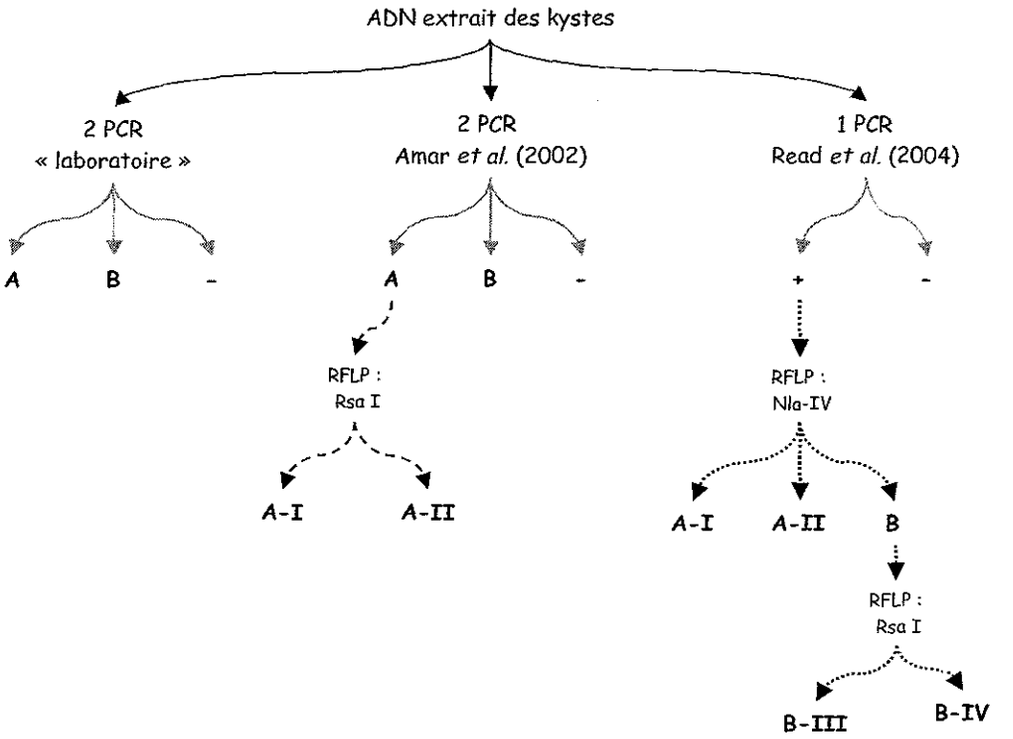


Figure 8 : Etapes suivies par un extrait d'ADN obtenu à partir de kystes de *Giardia lamblia* isolés d'une selle humaine
Les étapes d'amplification par PCR et de restriction enzymatique sont décrites dans les paragraphes 7.3.2 et 7.3.3 respectivement.

7.3.1- Matériel.

Pour l'amplification de l'ADN :

- Tubes PCR MicroAmp de 200 µL (Applied Biosystems, réf. N801-05540).
- Thermocycleur GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems).
- Amorces sens et antisens (Proligo).
- Enzyme HotStar Taq DNA polymérase et tampon PCR 10 X contenant 15 mM de $MgCl_2$ (Qiagen, réf. 203203).
- GeneAmp dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Applied Biosystems, réf. N8080260).

- Eau DNase-RNase free (Sigma, réf. W4502).

Pour la restriction enzymatique :

- enzymes de restriction : Nla IV (New England Biolabs, réf. R0126S) et Rsa I (Promega, réf. R6371)

Pour la révélation des produits d'amplification et de digestion enzymatique :

- Cuve à électrophorèse (VWR, réf. 6364301).
- Transluminateur U.V. (λ = 312 nm).
- Tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) (Sigma, réf. T-3913).
- Agarose LE, Analytical Grade (Promega, réf. V3121).
- Bromure d'éthidium (BET) à 10 $mg.mL^{-1}$ (Sigma, réf. E-1510).
- Tampon de charge et marqueur de taille, 100 pb DNA ladder (Promega, réf. G2101).

7.3.1.1- Critères de sélection des amorces pour la PCR qualitative.

Les amorces utilisées pour la détection par PCR qualitative sont sélectionnées avec le logiciel Primer Express version 1.0 (Applied Biosystems). Les critères de sélection des amorces sont présentés dans le tableau **13**.

Tableau 13 : Critères de sélection des amorces pour la PCR qualitative (logiciel Primer Express, version 1.0)

Choix d'une amorce	Choix d'un couple d'amorces
- taille : environ 20 bases. - Tm proche de 60°C. - Eviter les structures secondaires par des liaisons GC.	- Amorces de taille et de Tm homogènes. - Eviter les dimères d'amorces par complémentarité et liaisons GC.

7.3.1.1- Caractéristiques des amorces utilisées pour la détection des génotypes A et B de l'espèce *G. lamblia*

Les tableaux **14** à **18** regroupent les séquences et les caractéristiques des amorces utilisées pour la détection des génotypes A et B de l'espèce *G. lamblia*.

7.3.1.2- Caractéristiques des amorces utilisées pour la détection des génotypes C et E de l'espèce *G. lamblia*

Les tableaux **19** et **20** présentent les séquences et les caractéristiques des amorces utilisées respectivement pour la détection des génotypes C et E de l'espèce *G. lamblia*.

7.3.2- Détection par PCR.

7.3.2.1- Préparation du milieu réactionnel.

Les concentrations initiales et finales, ainsi que le volume de chaque réactif entrant dans la composition du milieu réactionnel de PCR qualitative dont le volume total est de 50 µL par tube sont présentés dans le tableau **21**.

Tableau 21 : Composition du milieu réactionnel utilisé en PCR qualitative

Réactif	Concentration initiale	Volume par tube	Concentration finale
Amorce sens	10 µM	2,5 µL	0,5 µM
Amorce antisens	10 µM	2,5 µL	0,5 µM
Tampon PCR	10 X, 15 mM de $MgCl_2$	5 µL	1 X, 1,5 mM de $MgCl_2$
dNTP	10 mM (2,5 mM de chaque)	4 µL	800 µM (200 µM de chaque)
HotStar Taq DNA polymérase		0,5 µL	2,5 U
Eau RNase-DNase free		17,5 µL	
ADN extrait		5 µL	

7.3.2.2- Conditions d'amplification par PCR.

Les conditions expérimentales d'amplification de l'ADN par PCR qualitative sont les suivantes :

- Activation de la Taq polymérase : 95°C, 15 minutes
- 50 cycles composés de trois étapes :
  - Dénaturation du double brin d'ADN : 94°C, 30 secondes.
  - Hybridation des amorces avec l'ADN cible : 62°C, 30 secondes.
  - Elongation du brin complémentaire : 72°C, 30 secondes.
- Elongation terminale des brins d'ADN : 72°C, 7 minutes.

7.3.3- Restriction enzymatique pour la détermination des génotypes des kystes isolés de selles.

Trois réactions de restriction enzymatique sont utilisées dans notre étude pour le génotypage de kystes de *Giardia lamblia* isolés de selles humaines. La restriction proposée par Amar *et al.* (2002) fait intervenir la RsaI comme enzyme de restriction et permet de distinguer les génotypes A-I et A-II. Read *et al.* (2004) utilisent la Nla IV pour diagnostiquer les génotypes A-I, A-II et B, mais aussi la Rsa I pour séparer les génotypes B-III et B-IV.

7.3.3.1- Préparation du milieu réactionnel.

La composition des milieux réactionnels, d'un volume final de 20 µL, utilisés pour les différentes restrictions enzymatiques sont présentées dans le tableau **22**. La restriction enzymatique est réalisée en 3 heures dans un bain-marie à 37°C.

Tableau 22: Composition des milieux réactionnels pour les restrictions enzymatiques

	Volumes et/ou concentrations finales	
	Nla IV (Read *et al.*, 2004)	Rsa I (Amar *et al.*, 2002 ; Read *et al.*, 2004)
Eau	13,3 µL	15,1 µL
Tampon 10 x	2 µL / 1 X	2 µL / 1 X
BSA	0,2 µL / 0,1 µg. µL^{-1}	0,2 µL / 0,1 µg. µL^{-1}
Enzyme de restriction	2 µL / 2 U	0,2 µL / 2 U
ADN amplifié	2,5 µL	2,5 µL

7.3.3.2- Profils électrophorétiques.

Les différents profils électrophorétiques attendus suite aux restrictions enzymatiques avec les enzymes Nla IV et Rsa I sont regroupés dans le tableau **23**.

Les fragments de taille inférieure ou égale à 39 pb ne sont pas observables par électrophorèse sur gel d'agarose et sont notés sous une barre en pointillés dans ce tableau.

Tableau 23 : Profils attendus suite aux différentes restrictions enzymatiques

Référence	Read *et al.* (2004)					Amar *et al.* (2002)	
Taille du fragment amplifié	432 pb					577 pb	
Enzyme de restriction	Nla IV			Rsa I		Rsa I	
Génotype	A-I	A-II	B	B-III	B-IV	A-I	A-II
Taille des fragments obtenus après restriction enzymatique	149	123	291	297	432	538	336
	123	87	123	135			202
	87	77					
		72					
	39	39	18			39	39
	18	18					
	16	16					

7.3.4- Révélation des produits d'amplification et de restriction enzymatique.

La révélation des produits de chaque PCR qualitative est réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % après PCR. Cette concentration en agarose permet la séparation de molécules d'ADN linéaire de taille comprise entre 0,1 et 2 kb (Sambrook et Russel, 2001). Pour l'analyse des produits de restriction enzymatique, le gel contient 3,2 % d'agarose. Le bromure d'éthidium (BET) est un agent intercalant qui permet la mise en évidence des produits amplifiés (BET : excitation : 302 nm, émission : 590 nm, rouge-orangé).

1,6 g (ou 2,6 g) d'agarose sont portés à ébullition pendant 10 minutes dans 80 mL de tampon TBE.

Après refroidissement 10 minutes à température ambiante, ajouter 7 µL de BET (0,9 µg.mL).

Couler le gel et le laisser refroidir.

⊽

Déposer le gel dans la cuve d'életrophorèse et le recouvrir de tampon TBE.

Déposer les échantillons : 6 µL d'ADN amplifié (ou de marqueur de taille) pour 1,5 µL de tampon de charge.

⊽

Laisser migrer 40 minutes à 160V (voltage constant) puis révéler les fragment amplifiés sur la table U.V.

8- Analyse statistique des résultats.

Les tests statistiques utilisés lors cette étude sont réalisés à l'aide du logiciel Minitab 13, il s'agit des test suivants :

- Test de Snedecor ou test d'égalité des variances, appliqué avant le test de Student pour les petits échantillons ($n < 30$).
- Test de Student ou test-t pour la comparaison des moyennes.
- Test de corrélation de Spearman (rs) pour la recherche de corrélations.

Tableau 14 : Séquences et caractéristiques des amorces dessinées au laboratoire pour la détection du génotype A de *G. lamblia* par PCR qualitative (gène cible : TPI)

Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position	Taille de l'amplicon (pb)
A-for	sens	GGA GAC CGA CGA GCA AAG C	63	60	19	839 - 857	148
A-rev	antisens	CTT GCC AAG CGC CTC AA	59	58	17	970 - 986	

Les positions des amorces sont données sur la séquence de l'isolat WB (réf. Genbank : L02120).

Tableau 15 : Séquences et caractéristiques des amorces de Amar *et al.* (2002) pour la détection du génotype A de *G. lamblia* par PCR qualitative (gène cible : TPI)

Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position	Taille de l'amplicon (pb)
TPIA-F	sens	CGA GAC AAG TGT TGA GAT G	47	48	19	758 - 776	577
TPIA-R	antisens	GGT CAA GAG CTT ACA ACA CG	50	52	20	1315 - 1334	

Les positions des amorces sont données sur la séquence de l'isolat WB (réf. Genbank : L02120).

Tableau 16 : Séquences et caractéristiques des amorces dessinées au laboratoire pour la détection du génotype B de *G. lamblia* par PCR qualitative (gène cible : TPI)

Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position	Taille de l'amplicon (pb)
B-for	sens	AAT AGC AGC ACA GAA CGT GTA TCT G	44	59	25	126 - 150	81
B-rev	antisens	CCC ATG TCC AGC AGC ATC T	58	58	19	188 - 206	

Les positions des amorces sont données sur la séquence de l'isolat BAH-12 (réf. Genbank : AF069561).

Tableau 17 : Séquences et caractéristiques des amorces de Amar *et al.* (2002) pour la détection du génotype B de *G. lamblia* par PCR qualitative(gène cible : TPI)

Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position	Taille de l'amplicon (pb)
TPIB-F	sens	GTT GCT CCC TCC TTT GTG C	58	57	19	64 - 82	209
TPIB-R	antisens	CTC TGC TCA TTG GTC TCG C	58	56	19	254 - 272	

Les positions des amorces sont données sur la séquence de l'isolat BAH-12 (réf. Genbank : AF069561).

Tableau 18 : Séquences et caractéristiques des amorces de Read *et al.* (2004) pour la détection des génotypes A et B de *G. lamblia* par PCR qualitative (cible : GDH)

Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position	Taille de l'amplicon (pb)
GDHiF	sens	CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG	57	53	20	64 - 83	432
GDHiR	antisens	GTT RTC CTT GCA CAT CTC C	50	49	19	477 - 495	

Les positions des amorces sont données pour l'isolat Ad-1 (réf. Genbank : L40509) pour l'assemblage A et pour l'isolat Ad-7 (réf. Genbank : L40508) pour l'assemblage B. Les positions sont identiques pour les deux séquences.

Y = C ou T ; R = A ou G.

Tableau 19 : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour la détection du génotype C de *G. lamblia* par PCR qualitative (cible : TPI)

Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position	Taille de l'amplicon (pb)
C-for	sens	CCT CGT CCG TGC ATC TGT CTA C	59	60	22	94 - 115	309
C-rev	antisens	CAA TGT TCA CAT CCA TAG TCT TGT TGG	41	61	27	376 - 402	

Les positions des amorces sont données sur la séquence de l'isolat Ad-136 (réf. Genbank : AF069563).

Tableau 20 : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour la détection du génotype E de *G. lamblia* par PCR qualitative (cible : TPI)

Dénomination	Fonction	Séquence (5' - 3')	GC %	Tm (°C)	Longueur (bases)	Position	Taille de l'amplicon (pb)
E-for	sens	CCC CTT CTG CCG TAC ATT TAT CA	48	61	23	91 - 113	165
E-rev	antisens	AAT GCC CTA TTA TCA CGT ACT CCA A	40	59	25	231 - 255	

Les positions des amorces sont données sur la séquence de l'isolat P-15 (réf. Genbank : AF069559).

Tableau 8(A) : Caractéristiques des séquences disponibles pour le gène de la TPI pour *G. lamblia* sur la base de données Genbank (date de mise à jour : 29/09/2004)

Génotype	Isolat	Taille	Hôte ou source	Référence Genbank	Référence bibliographique
A	WB	1583 pb	Homme	L02120	Mowatt *et al.* (1994)
	JH	1112 pb		U57897	Baruch *et al.* (1996)
	Ad-1	466 pb		AF069556	Monis *et al.* (1999)
	Ad-2	479 pb		AF069557	
	2907	467 pb		AY228647	Sulaiman *et al.* (2003)
		508 pb	Cerf	AY302562	Trout *et al.* (2003)
	4230	532 pb	Eaux usées	AY368161	Sulaiman *et al.* (2004)
	4218			AY368160	
	4220			AY368159	
	3906			AY368158	
	1503			AY368157	
B	GS/M	643 pb	Homme	L02116	communication personnelle
	BAH-12	456 pb		AF069561	Monis *et al.* (1999)
	Ad-19	479 pb		AF069560	
	2924	532 pb		AY228628	Sulaiman *et al.* (2003)
	2582	449 pb		AY228629	
	2506	468 pb		AY228630	
	2887	468 pb		AY228631	
	2902	469 pb		AY228632	
	2877	468 pb		AY228633	
	2900	468 pb		AY228634	
	2901	468 pb		AY228635	
	3470	468 pb	Rat musqué	AY228636	
	3565	469 pb		AY228637	
	3577	448 pb		AY228638	
	1758	468 pb	Lapin	AY228639	
	5409	532 pb	Eaux usées	AY368171	Sulaiman *et al.* (2004)
	2100			AY368170	
	2476			AY368169	
	7327			AY368168	
	7115			AY368167	
	3920			AY368166	
	2434			AY368165	
	1794			AY368164	
	2436			AY368163	
	2623			AY368162	
C	Ad-136	479 pb	Chien	AF069563	Monis *et al.* (1999)
	2643	532 pb		AY228641	Sulaiman *et al.* (2003)
	2669	468 pb		AY228642	
	2674	468 pb		AY228643	
	2665	468 pb		AY228644	
E	P-15	479 pb	Porcin	AF069559	Monis *et al.* (1999)
	109	457 pb	Bovin	AY228645	Sulaiman *et al.* (2003)
	15	457 pb		AY228646	
F	Ad-23	479 pb	Chat	AF069558	Monis *et al.* (1999)
G	Ad-157	468 pb	Rat	AF069562	Monis *et al.* (1999)
	2135	428 pb		AY228640	Sulaiman *et al.* (2003)

Tableau 8(B) : Caractéristiques des séquences disponibles sur la base de données Genbank pour le gène de la TPI pour les espèces *G. muris*, *G. ardeae* et *G. microti* (date de mise à jour : 29/09/2004)

Espèce	Isolat	Taille	Hôte	Référence Genbank	Référence bibliographique
Giardia ardeae					
		477 pb	Héron bleu	AF069562	Monis *et al.* (1999)
Giardia microti					
	3463	533 pb	Rat musqué	AY228648	Sulaiman *et al.* (2003)
	3460	533 pb		AY228649	
Giardia muris					
	Ad-120	456 pb	Souris	AF069565	Monis *et al.* (1999)

Tableau 8(C) : Caractéristiques des séquences disponibles sur la base de données Genbank pour le gène de l'EF1A pour les espèces *G. lamblia*, *G. muris* et *G. ardeae* (date de mise à jour : 29/09/2004)

Espèce / Génotype	Isolat	Taille	Hôte d'origine	Référence Genbank	Référence bibliographique
Giardia lamblia					
	5741	703 pb		L23957	Baldauf et Palmer (1993)
	5741	1188 pb		D14342	Hashimoto *et al.* (1994)
A	Ad-2	646 pb	Homme	AF069573	Monis *et al.* (1999)
	WB-C6	34265 pb		AACB01000124	*
B	BAH-12	643 pb	Homme	AF069569	Monis *et al.* (1999)
	Ad-28	654 pb		AF069570	
C	Ad-136	645 pb	Chien	AF069574	
D	Ad-148	623 pb	Chien	AF069575	
E	P-15	651 pb	Porcin	AF069571	
F	Ad-23	655 pb	Chat	AF069572	
G	Ad-157	642 pb	Rat	AF069568	
Giardia ardeae					Monis *et al.*, 1999
		655 pb	Héron bleu	AF069567	
Giardia muris					Monis *et al.*, 1999
	Ad-120	643 pb	Souris	AF069566	
Giardia sp.		706 pb	Rongeur	AY309065	Adams *et al.* (2004)

* : Séquence reportée sur le site NCBI et provenant du projet de séquençage du génome de *Giardia lamblia*.

Tableau 8(D) : Caractéristiques des séquences disponibles sur la base de données Genbank pour le gène de la GDH pour les espèces *G. lamblia* et *G. ardeae* (date de mise à jour : 29/09/2004)

Espèce / Génotype	Isolat	Taille	Hôte d'origine	Référence Genbank	Référence bibliographique
Giardia lamblia					
A	WB-C6	91700 pb	Homme	AACB01000014	*
	Bris-136	1122 pb		AY178738	communication personnelle
	Ad-113	1122 pb		AY178736	
	Ad-1	1128 pb		AY178735	
	Portland-1	1691 pb		M84604	
	Ad-1	690 pb		L40509	Monis *et al.* (1996)
	Ad-2			L40510	
B	FCQ-21	1108 pb	Homme	AY178756	communication personnelle
	Ad-85	1127 pb		AY178755	
	Ad-82	1121 pb		AY178754	
	Ad-45	1110 pb		AY178739	
	Ad-28	1123 pb		AY178738	
	Ad-7	690 pb		L40508	Monis *et al.* (1996)
	BAH-12	592 pb		AF069059	Monis *et al.* (1999)
	Ad-158	1115 pb	Singe	AY178753	communication personnelle
	Ad-156	1121 pb		AY178752	
	CH-105	1121 pb	Chinchilla	AY178751	
	Vanc/89/UBC/059	1121 pb	Chien	AY178750	
	CZ :D-47	1119 pb		AY178749	
C	Ad-136	1094 pb	Chien	U60982	Monis *et al.* (1998)
	Ad-137	1114 pb		U60983	
D	Ad-141	690 pb	Chien	U60984	Monis *et al.* (1998)
	Ad-147	690 pb		U60985	
	Ad-148	1120 pb		U60986	
E	Ad-133	1115 pb	Veau	AY178740	communication personnelle
	P-15	1114 pb	Porcin	AY178741	
		608 pb	Bétail	U47632	Ey *et al.* (1997)
F	Ad-131	1114 pb	Chat	AY178742	communication personnelle
	Ad-142	1121 pb		AY178743	
	Ad-154	1123 pb		AY178744	
	Ad-23	1119 pb		AF069057	Monis *et al.* (1999)
G	Ad-155	1117 pb	Rat, souris	AY178745	communication personnelle
	Ad-167	1117 pb		AY178746	
	Ad-171	1114 pb		AY178747	
	Ad-170	1111 pb		AY178748	
	Ad-157	1085 pb		AF069058	Monis *et al.* (1999)
Giardia ardeae		1080 pb	Héron	AF069060	Monis *et al.* (1999)

* : Séquence reportée sur le site NCBI et provenant du projet de séquençage du génome de *Giardia lamblia*

Pour la thèse de Isabelle BERTRAND

IL N’Y A PAS DE PAGE 118

Résultats : Chapitre 1

Développement et validation des protocoles

de détection sur des suspensions purifiées de kystes.

- Quantification spécifique de *Giardia lamblia* et *Giardia muris*.

- Détection / quantification de différents génotypes de *Giardia lamblia*.

✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣

Les premières études portant sur l'utilisation de la PCR en temps réel pour la détection ou la quantification de *Giardia lamblia* dans des prélèvements biologiques ou environnementaux ont été publiées très récemment. En 2003, Johnson *et al.* publient une étude dans laquelle ils développent deux PCR quantitatives avec pour objectif la quantification spécifique des génotypes A et B (souches : Portland-1 et BAH-12). Lors de cette étude, les PCR quantitatives sont testées uniquement sur des suspensions purifiées de trophozoïtes de *Giardia lamblia*. Amar *et al.* (2003) utilisent la technique SYBR Green I pour la détection spécifique des génotypes A et B dans des selles humaines. Toutefois, cette technique est précédée d'une PCR multiplex conventionnelle et ne permet pas la quantification des kystes. Guy *et al.* (2003) et Verweij *et al.* (2003) développent des PCR en temps réel basées sur deux cibles différentes : giardine et ARNr. Leur objectif est alors de quantifier les kystes de *G. lamblia* respectivement dans des prélèvements environnementaux (eaux de surface et eaux usées) et des selles humaines.

Lors de nos travaux, nous avons choisi de développer des PCR en temps réel pour la quantification spécifique des espèces *G. lamblia* et *G. muris* et des génotypes (ou assemblages) A et B dans des prélèvements environnementaux, mais aussi des PCR qualitatives permettant la détection des génotypes A, B, C et E dans des des selles ou dans des prélèvements environnementaux. Ce premier chapitre se compose de trois parties réalisées à partir des séquences disponibles sur la base de données Genbank et sur des suspensions purifiées de kystes de *G. lamblia* et *G. muris*. La première partie porte sur la comparaison des différentes séquences disponibles, leur évaluation pour une détection spécifique d'espèce ou de génotype et la sélection des amorces et des sondes. La deuxième partie concerne l'optimisation des concentrations en amorces et en sonde. Dans la troisième partie, nous validons les différents systèmes en évaluant leurs spécificité et sensibilité, ainsi que leurs variations intra-essai et inter-essai et enfin leur domaine de linéarité et leur rendement.

1ÈRE PARTIE : Développement des PCR quantitatives et qualitatives.

Le développement des PCR quantitatives et qualitatives est réalisé en trois étapes :

- ✦ Bilan des différents gènes cibles utilisables pour obtenir une détection spécifique des espèces *G. lamblia* ou *G. muris* ou des génotypes appartenant à l'espèce *G. lamblia*.
- ✦ Sélection des gènes cibles.
- ✦ Sélection des amorces et des sondes.

1- Gènes actuellement séquencés chez plusieurs espèces de Giardia.

Actuellement, cinq gènes sont partiellement ou entièrement séquencés pour plusieurs espèces du genre *Giardia* et plusieurs génotypes de l'espèce *G. lamblia*. Il s'agit des gènes de l'ARN18S, de l'EF1A (Facteur d'Elongation 1 Alpha), de la TPI (Triose Phosphate Isomérase), de la GDH (Glutamate Deshydrogenase) et de la β-giardine. Différentes séquences sont également disponibles pour les variants spécifiques des protéines de surface (VSP), toutefois elles concernent uniquement certains génotypes de l'espèce *G. lamblia* et ne permettent pas de s'assurer de la spécificité d'espèce. L'ensemble des séquences sont regroupées dans la base de données

Genbank sur le site NCBI (National Center for Biotechnology Information) : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Les références et caractéristiques des séquences actuellement disponibles sur cette base de données pour les gènes de l'EF1A, de la TPI et de la GDH sont présentées dans les tableaux **8(A)** à **8(D)** (chapitre Matériel et Méthodes).

Lors de la mise en place de cette étude, les séquences de quatre gènes étaient disponibles pour le développement des PCR quantitatives et qualitatives. Parmi ces gènes, seul l'ARNr 18S était séquencé pour cinq espèces : *G. lamblia, G. muris, G. microti, G. ardeae* et *G. psittaci*. Les gènes de la TPI et de l'EF1A étaient séquencés pour trois espèces : *G. lamblia, G. muris* et *G. ardeae*. Par contre, le gène de la GDH était séquencé pour seulement deux espèces : *G. lamblia* et *G. ardeae*. Actuellement, le gène de la TPI est également séquencé pour l'espèce *G. microti* (Sulaiman *et al.*, 2003).

2- Sélection des gènes cibles.

2.1- ARN18S : une cible idéale ?

L'ARN18S étant le seul gène séquencé chez cinq espèces du genre *Giardia*, il apparaît comme la cible préférentielle pour notre étude. Toutefois, les séquences de l'ARN 18S contiennent entre 70 et 75 % de bases G ou C. Or, pour les séquences des amorces et des sondes, le pourcentage de bases G et C (G-C %) doit être compris entre 20 et 80 % et il est indispensable d'éviter les répétitions de bases identiques surtout pour la guanine (Chapitre Matériel et Méthodes, tableau **9**, paragraphe 7.2.1.1). Ces critères rendent difficile la sélection de sondes et d'amorces pour cette cible. De plus, l'utilisation du logiciel Primer Express sur cette cible n'a pas permis la sélection d'amorces ou de sondes.

Lors de leurs expérimentations, Weiss *et al.* (1992) observent une amplification de l'ARN18S de *Giardia* par PCR conventionnelle uniquement après addition de glycérol (10 %) et DMSO (Diméthylsulfoxide, 5 %) dans le milieu réactionnel. En outre, les amorces amplifient également l'ADN de *G. muris, G. ardeae*, mais aussi celui d'autres protozoaires tels *Entamoeba histolytica, Leishmania major* et *Trypanosoma brucei*. L'utilisation d'une sonde permet toutefois d'obtenir une détection spécifique de *G. lamblia*. En 1997, Rochelle *et al.*, utilisent les mêmes amorces et les mêmes conditions expérimentales que Weiss *et al.* (1992), ils observent alors une amplification avec un rendement insuffisant pour des kystes en suspension purifiée et n'obtiennent aucune amplification pour des échantillons d'eaux usées brutes dopées en kystes de *Giardia*.

Etant donné les discordances observées selon les équipes, l'ARN18S n'est pas retenu comme cible pour la quantification des kystes de *G. lamblia* et *G. muris*.

2.2- La sélection des gènes cibles pour la distinction des espèces et des génotypes.

La sélection du gène cible est précédée par l'alignement des séquences avec le logiciel ClustalX qui permet également la réalisation d'arbres phylogénétiques. Le gène de la GDH n'étant séquencé que pour deux espèces, la sélection de gènes cibles est tout d'abord réalisée par l'alignement des séquences des gènes de l'EF1A et de la TPI.

Pour la quantification spécifique de *G. lamblia* ou de *G. muris*, le gène cible doit présenter un nombre de variations qui soit suffisant pour permettre le choix de sondes et d'amorces spécifiques, mais pas trop élevé afin d'obtenir une amplification de l'ensemble des assemblages de l'espèce *G. lamblia*.

Par contre, la cible à privilégier pour une distinction au niveau des génotypes de l'espèce *G. lamblia*, doit présenter un niveau d'hétérogénéité suffisant entre les génotypes.

La figure **1** correspond aux arbres phylogénétiques obtenus avec les séquences disponibles au début de notre étude pour les gènes de l'EF1A et de la TPI. L'arbre phylogénétique obtenu pour la TPI par Sulaiman *et al.* (2003) est présenté dans le paragraphe 3.3.2 (figure **3(B)**) de l'étude bibliographique.

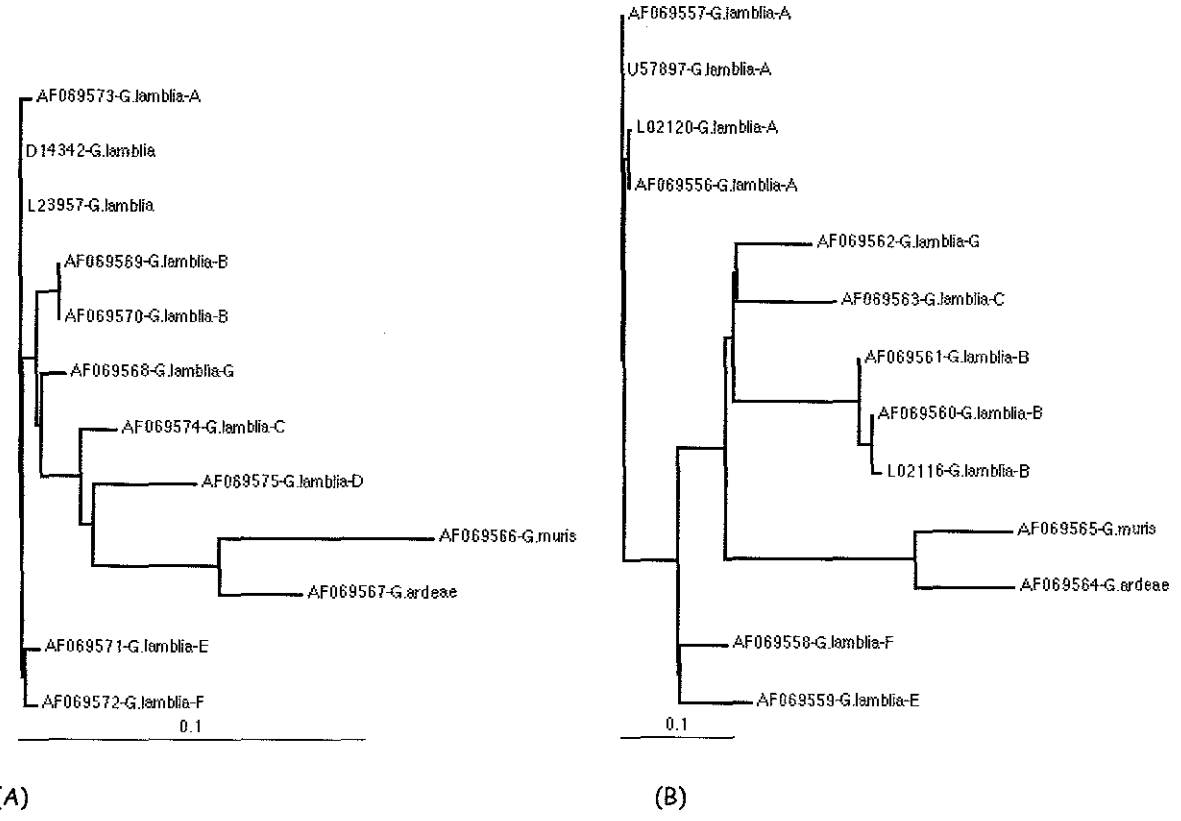


Figure 1 : Arbre phylogénétique obtenu avec la méthode Neighbour-Joining pour le gène de l'EF1A (A) et pour le gène de la TPI (B) à partir des séquences disponibles sur la base de données Genbank

Les alignements de séquences et les arbres phylogénétiques ont montré que le gène EF1A est celui pour lequel les variations de séquences entre les espèces du genre *Giardia* et les génotypes (ou assemblages) de l'espèce *G. lamblia* offraient les meilleures possibilités de choix d'amorces et de sondes spécifiques pour les espèces *G. lamblia* ou *G. muris*. Le gène de la TPI présente un niveau d'hétérogénéité plus important que celui de l'EF1A (Monis *et al.*, 1999;Sulaiman *et al.*, 2003). La TPI serait ainsi une cible à privilégier pour la distinction au niveau des génotypes. En effet, la comparaison des arbres phylogénétiques montre une meilleure séparation des génotypes composant l'espèce *G. lamblia* avec le gène de la TPI.

Ainsi, dans le cadre de notre étude, les gènes de l'EF1A et la TPI sont utilisés respectivement pour la distinction au niveau des espèces et des génotypes.

3- Sélection des amorces et des sondes.

L'alignement des séquences réalisé précédemment a mis en évidence les régions utilisables pour la sélection d'amorces et de sondes pour les PCR qualitatives et quantitatives.

3.1- Sélection d'amorces et de sondes pour les PCR en temps réel.

Deux types de sondes, Taq Man et Taq Man MGB sont utilisées dans notre étude pour la quantification par PCR en temps réel. L'alignement des séquences du gène EF1A avec le logiciel ClustalX a montré que le nombre de variations de séquences est relativement faible et l'utilisation de sondes TaqMan MGB nous a semblé plus appropriée. Ces sondes initialement destinées à la discrimination allélique, différencient deux séquences ne variant que d'un seul nucléotide. Les critères de sélection des amorces et des sondes avec les logiciels Primer Express version 1.0 et version 1.5 (Applied Biosystem) sont présentés dans le paragraphe 7.2.1.1 de la partie Matériel et Méthodes.

3.1.1- Les systèmes destinés à la quantification spécifique de G. lamblia et G. muris

En tenant compte de ces critères, un couple d'amorces et deux sondes TaqMan MGB sont sélectionnés pour la quantification des espèces *G. lamblia* et *G. muris*. Les amorces GIAF2 et GIAR1 permettent l'amplification de l'ADN de *G. lamblia* et *G. muris*, alors que les deux sondes TaqMan MGB sont spécifiques soit de *G. lamblia* (LAP-1), soit de *G. muris* (MUP-1). Les séquences des souches Ad-28 (réf. Genbank : AF069570) pour *G. lamblia* et Ad-120 (réf. Genbank : AF069566) pour *G. muris* sont représentées avec leurs amorces et leur sonde sur les figures **2(A)** et **2(B)** respectivement.

```
GGTCAAGTAC TCGAAGGAGC GCTACGACGA GATCAAGGGC GAGATGATGA 350
CCAGTTCATG AGCTTCCTCG CGATGCTGCT CTAGTTCCCG CTCTACTACT

AGCAGCTCAA GAACATCGGC TGGAAGAAGG CCGAGGAGtt cgactacatc 400
TCGTCGAGTT CTTGTAGCCG ACCTTCTTCC GGCTCCTCaa gctgatgtag

ccGACGTCCG GCTGGACCGG GGACAACATC ATGGAGAGGT CCGACAAGAT 450
ggCTGCAGGC CGACCTGGCC CCTGTTGTAG TACCTCTCCA GGCTGTTCTA

GCCCTGGTAC GAGGGCCCGT GCCTGATCGA CGCGATCGAC GGGCTCAAGG 500
CGGGACCATG CTCCCGGGCA CGGACTAGCT GCGCTAGCTG CCCGAGTTCC
```

(A) ***Giardia lamblia***

(souche Ad-28, référence Genbank : AF069570)

```
CAAGTATTCG AAGGAGCGTT ACGAGGAGAT CAAGACGGAG ATGATGAAGC 350
GTTCATAAGC TTCCTCGCAA TGCTCCTCTA GTTCTGCCTC TACTACTTCG

AGCTCAAGAA CATAGGCTGG AAGAAGGCTG AGGagttcga ttacattccG 400
TCGAGTTCTT GTATCCGACC TTCTTCCGAC TCCtcaagct aatgtaaggC

ACCTCGGGCT GGACGGGCGA CAACATCATG GAGAGGTCCG ACAAGATGCC 450
TGGAGCCCGA CCTGCCCGCT GTTGTAGTAC CTCTCCAGGC TGTTCTACGG

GTGGTACGAG GGCCCCTGTC TTATCGACGC GATCGACGGG CTCAAGGCAC 500
CACCATGCTC CCGGGGACAG AATAGCTGCG CTAGCTGCCC GAGTTCCGTG
```

(B) ***Giardia muris***

(souche Ad-120, référence Genbank : AF069566)

Figure 2 : Position des amorces et sondes TaqMan MGB pour les cibles *Giardia lamblia* (A) et *Giardia muris* (B)

3.1.2- Les systèmes destinés à la quantification spécifique des génotypes A et B.

Pour la quantification des génotypes ou assemblages A et B, deux systèmes distincts sont sélectionnés. Les amorces A-for et A-rev associées à la sonde *Giardia*-A permettent la quantification du génotype A. Les amorces B-for, B-rev et la sonde *Giardia*-B sont spécifiques du génotype B. Les séquences des souches Ad-1 (réf. Genbank : AF069556) pour le génotype A et Ad-19 (réf. Genbank : AF069560) pour le génotype B sont représentées avec leurs amorces et leur sonde sur les figures **3(A)** et **3(B)** respectivement.

```
GCACTCTGAA AGACGCAGAA TCATGGGGGA GACCGACGAG CAAAGCGCCA  300
CGTGAGACTT TCTGCGTCTT AGTACCCCCT CTGGCTGCTC GTTTCGCGGT

AGAAGGCTAA GCGTGCCCTG GAAAAGGGGA TGACGGTcat cttctgcgtc  350
TCTTCCGATT CGCACGGGAC CTTTTCCCCT ACTGCCAgta gaagacgcag

ggaGAGACCT TGGACGAGCG CAAGGCCAAC CGCACCATGG AGGTGAACAT  400
cctCTCTGGA ACCTGCTCGC GTTCCGGTTG GCGTGGTACC TCCACTTGTA

CGCCCAGCTT GAGGCGCTTG GCAAGGAGCT CGGAGAGTCC AAGATGCTCT  450
GCGGGTCGAA CTCCGCGAAC CGTTCCTCGA GCCTCTCAGG TTCTACGAGA
```

(A) *G. lamblia* - génotype A

(souche Ad-1, référence Genbank : AF069556)

```
TGTGCACCTT TCTACAGCTA TTGCGGCGAA TACTTCGAAG TGTCTGAAAA  150
ACACGTGGAA AGATGTCGAT AACGCCGCTT ATGAAGCTTC ACAGACTTTT

TAGCAGCACA GAACGTGTAT CTGGAAGGGA ACGGTGcatg gaccggcgag  200
ATCGTCGTGT CTTGCACATA GACCTTCCCT TGCCACgtac ctggccgctc

acaagcgtCG AGATGCTGCT GGACATGGGG CTGAGCCATG TAATAATAGG  250
tgttcgcaGC TCTACGACGA CCTGTACCCC GACTCGGTAC ATTATTATCC
```

(B) *G. lamblia* - génotype B

(souche Ad-19, référence Genbank : AF069560)

Figure 3 : Position des amorces et des sondes permettant la détection des génotypes A et B de *Giardia lamblia*

3.2- Sélection de couples d'amorces pour les PCR qualitatives.

Quatre PCR qualitatives sont utilisées pour la détection, soit des génotypes A et B dans les selles, soit des génotypes C et E dans des prélèvements d'eaux usées. En l'absence de source de kystes de *G. lamblia* appartenant aux génotypes C et E et permettant l'élaboration de gammes étalon, nous avons choisi de sélectionner uniquement des amorces pour une détection par PCR qualitative. Les amorces utilisées pour la détection des génotypes A et B sont identiques à celles sélectionnées pour les PCR en temps réel. La sélection d'amorces permettant la détection des génotypes C et E est effectuée avec le logiciel Primer Express version 1.0, les critères à appliquer sont présentés dans le paragraphe 7.3.1.1 du chapitre Matériel et Méthodes.

Les séquences des souches Ad-136 (réf. Genbank : AF069563) pour le génotype C et P-15 (réf. Genbank : AF069559) pour le génotype E sont représentées avec leurs amorces sur les figures **4(A)** et **4(B)** respectivement.

```
GCGTCCCACA AGATTCCCGA CTCTGTTGAT GTGATCATCG CCCCCTCGTC  100
CGCAGGGTGT TCTAAGGGCT GAGACAACTA CACTAGTAGC GGGGGAGCAG

CGTGCATCTG TCTACGGCCA TCGCAGCGAA CACATCGAAG CAGCTGAAGA  150
GCACGTAGAC AGATGCCGGT AGCGTCGCTT GTGTAGCTTC GTCGACTTCT

TAGCAGCGCA GAATGTGTAC CTCGAGGGAA ACGGCGCATG GACGGGCGAG  200
ATCGTCGCGT CTTACACATG GAGCTCCCTT TGCCGCGTAC CTGCCCGCTC

ACAAGTGTTG AGATGCTTCA GGACATGGGC CTGAGTCACG TGATAGTAGG  250
TGTTCACAAC TCTACGAAGT CCTGTACCCG GACTCAGTGC ACTATCATCC

GCACTCTGAA AGACGTAGGA TCATGGGCGA GACCAACGAG CAGAGTGCCA  300
CGTGAGACTT TCTGCATCCT AGTACCCGCT CTGGTTGCTC GTCTCACGGT

AGAAGGCTAA GCGTGCTCTG GAGAAGGGCA TGATGGTCAT CTTCTGCACT  350
TCTTCCGATT CGCACGAGAC CTCTTCCCGT ACTACCAGTA GAAGACGTGA

GGGGAGACAC TGGACGAGCG CAAGGCCAAC AAGACTATGG ATGTGAACAT  400
CCCCTCTGTG ACCTGCTCGC GTTCCGGTTG TTCTGATACC TACACTTGTA
```

(A) *G. lamblia* - génotype C

(souche Ad-136, réf. Genbank : AF069563)

```
GCTGCCCACA AGATCCCCGA TTCCATAGAC GTTGTTGTTG CCCCTTCTGC  100
CGACGGGTGT TCTAGGGGCT AAGGTATCTG CAACAACAAC GGGGAAGACG

CGTACATTTA TCAACAGCTA TTGCAGCAAA CACGTCAAAA CAGTTGAAGA  150
GCATGTAAAT AGTTGTCGAT AACGTCGTTT GTGCAGTTTT GTCAACTTCT

TAGCGGCGCA GAATGTGTAC CTAGAGGGGA ATGGAGCGTG GACTGGTGAG  200
ATCGCCGCGT CTTACACATG GATCTCCCCT TACCTCGCAC CTGACCACTC

ACGAGTGTTG AGATGCTTCA GGACATGGGC TTGGAGTACG TGATAATAGG  250
TGCTCACAAC TCTACGAAGT CCTGTACCCG AACCTCATGC ACTATTATCC

GCATTCTGAA AGGCGTAGAA TCATGGGGGA GACCGACGAG CAGAGTGCCA  300
CGTAAGACTT TCCGCATCTT AGTACCCCCT CTGGCTGCTC GTCTCACGGT
```

(B) *G. lamblia* - génotype E

(souche P-15, réf. Genbank : AF069559)

Figure 4 : Position des amorces permettant la détection des génotypes C et E de *Giardia lamblia*

En résumé,

Lors de cette première partie, quatre systèmes ont été sélectionnés pour la quantification des espèces *G. lamblia*, *G. muris* et des génotypes A et B de l'espèce *G. lamblia* dans des échantillons environnementaux. Deux couples d'amorces ont été dessinés pour la détection des génotypes C et E de *G. lamblia* dans des échantillons environnementaux. Les amorces sélectionnées pour la quantification des génotypes A et B par PCR en temps réel permettront également de génotyper les kystes de *G. lamblia* provenant de selles humaines par PCR qualitative.

2ème PARTIE : Optimisation des PCR quantitatives

Lors de cette étape, deux paramètres sont optimisés :
- ✦ La concentration en amorces
- ✦ La concentration en sonde

1- Détermination des concentrations optimales en amorces.

Pour chaque protocole d'amplification, il est indispensable d'optimiser les concentrations d'amorces sens et antisens à utiliser. En effet, selon la nature du couple d'amorces et la concentration utilisée, le cycle seuil (Ct) et l'intensité de fluorescence (If) peuvent présenter des variations. Ainsi, de faibles concentrations d'amorces peuvent diminuer le rendement d'amplification ce qui entraîne une augmentation du Ct et une baisse de l'intensité de fluorescence. De même, des concentrations trop élevées peuvent provoquer la synthèse de produits non spécifiques et une diminution du rendement d'amplification. L'analyse conjointe des valeurs de Ct et d'intensité de fluorescence permet de déterminer la concentration optimale en amorces.

Lors de cette étude, trois couples de concentrations d'amorces sont comparés. Il s'agit des couples 0,1/0,1 µM, 0,5/0,5 µM et 1/1 µM dénommés respectivement C1, C2 et C3. Seules des concentrations équilibrées sont testées car elles doivent être privilégiées lors de la sélection des concentrations optimales en amorces. La concentration en sonde est fixée arbitrairement à 0,2 µM.

Pour chaque PCR quantitative, nous plaçons sur le même graphique la moyenne des Ct observés en fonction de la moyenne des intensités de fluorescence générées lors de l'amplification d'une même quantité donnée de kystes de *Giardia*. Les concentrations initiales en kystes de *Giardia* indiquées pour les différentes PCR correspondent aux valeurs avant extraction de l'ADN pour 200 µL de suspension.

1.1- Concentration optimale en amorces pour la PCRq-lamblia.

Les Ct ainsi que les intensités de fluorescence (If) observés pour chaque combinaison de concentration sont présentés sur la figure 5.

L'analyse de la figure 5 montre que pour une même concentration initiale de kystes de *G. lamblia* ($1,8.10^5$ kystes.200 μL^{-1}), les Ct varient de 32,51 (C2) à 33,92 (C1), ce qui correspond à une différence de 1,41 Ct pour ces valeurs extrêmes. Concernant les valeurs d'intensité de fluorescence, elles sont maximales (1,05) pour les deux combinaisons C2 et C3. Ainsi, on constate que la combinaison C2 (0,5/0,5 µM) permet d'obtenir le Ct le plus faible et l'intensité de fluorescence la plus élevée.

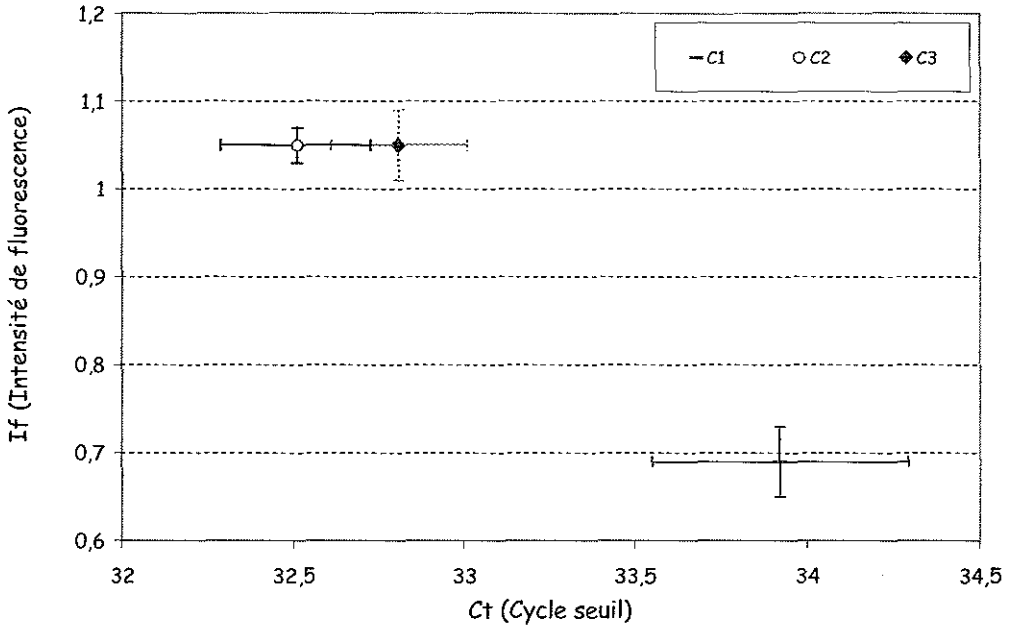


Figure 5 : Intensités de fluorescence (If) en fonction des valeurs de cycle seuil (Ct) pour trois combinaisons de concentrations en amorces (C1 : 0,1/0,1 µM ; C2 : 0,5/0,5 µM ; C3 : 1/1 µM) pour la PCRq-*lamblia*

Nos expérimentations sont réalisées avec des concentrations en amorces sens (GIAF2) et antisens (GIAR1) de 0,5 µM (C2) dans le milieu réactionnel pour la quantification des kystes de *G. lamblia.*

1.2- Concentration optimale en amorces pour la PCRq-muris.

La figure 6 regroupe les valeurs de Ct et d'intensité de fluorescence (If) observées pour chaque combinaison de concentration.

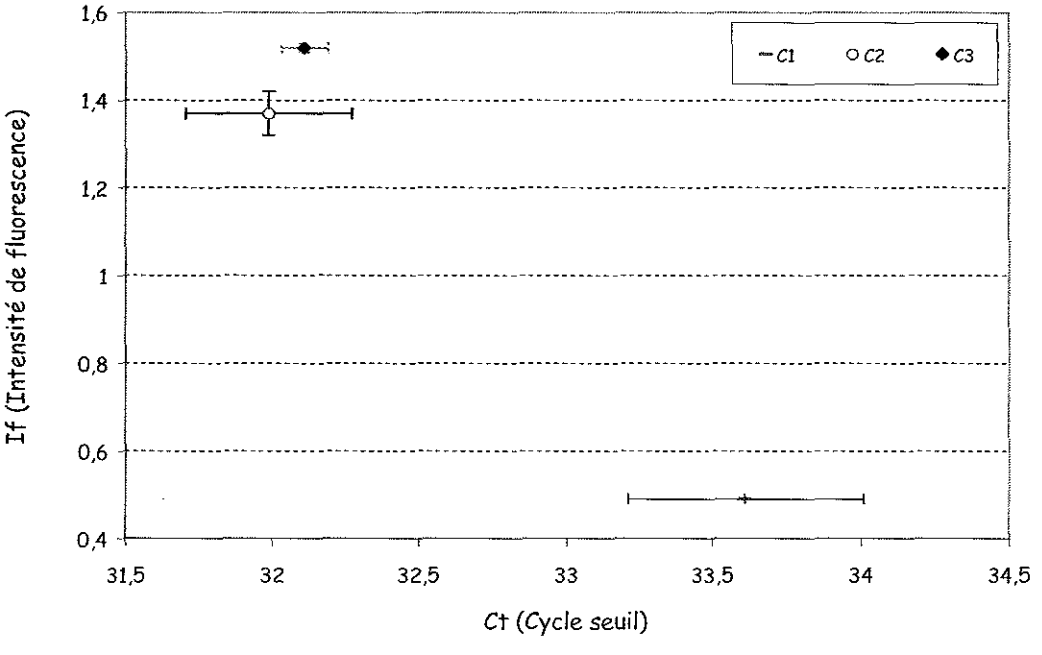


Figure 6 : Intensités de fluorescence (If) en fonction des valeurs de cycle seuil (Ct) pour trois combinaisons de concentrations en amorces (C1 : 0,1/0,1 µM ; C2 : 0,5/0,5 µM ; C3 : 1/1 µM) pour la PCRq-*muris*

Il apparaît que pour une même concentration initiale de $1,8.10^5$ kystes de *G. muris* .200 μL^{-1}, les Ct varient de 31,99 (C2) à 33,61 (C1), ce qui correspond à une différence de 1,62 Ct pour ces valeurs extrêmes. Concernant les valeurs d'intensité de fluorescence, elles sont comprises entre 0,49 pour la combinaison C1 et 1,52 pour la combinaison C3. La combinaison C2 (0,5/0,5 μM) permet d'obtenir la valeur de Ct la plus faible et une valeur d'intensité de fluorescence de 1,37 proche de la valeur maximale observée.

Lors de nos expérimentations, les amorces sens (GIAF2) et antisens (GIAR1) sont utilisées à la concentration 0,5 μM (C2) dans le milieu réactionnel pour la quantification des kystes de *G. muris*.

1.3- Concentrations optimales en amorces pour la PCRq-A.

Les valeurs de Ct et d'intensité de fluorescence observées pour chaque combinaison de concentration pour la quantification des kystes de *G. lamblia* du génotype A sont présentées sur la figure **7**.

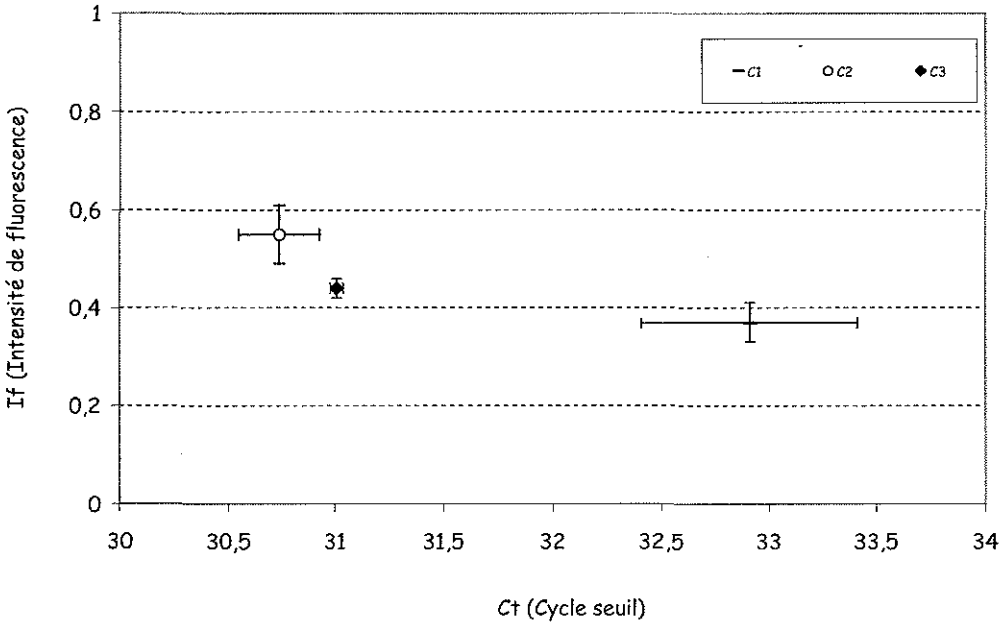


Figure 7 : Intensités de fluorescence (If) en fonction des valeurs de cycle seuil (Ct) pour trois combinaisons de concentrations en amorces (C1 : 0,1/0,1 μM ; C2 : 0,5/0,5 μM ; C3 : 1/1 μM) pour la PCRq-A

L'analyse de la figure **7** montre que pour une même concentration initiale de $1,8.10^5$ kystes.200 μL^{-1}, les valeurs de Ct sont comprises entre 30,74 (C2) et 32,91 (C1), ce qui correspond à une différence de 2,17 Ct. Concernant les intensités de fluorescence, la valeur maximale est obtenue pour la combinaison C2, mais reste inférieure à 1. La combinaison C2 permet d'obtenir la valeur de Ct la plus faible et l'intensité de fluorescence la plus élevée.

Notre étude est réalisée avec des concentrations en amorces sens (A-for) et antisens (A-rev) de 0,5 μM (C2) dans le milieu réactionnel, pour la quantification des kystes de *G. lamblia* appartenant au génotype A.

1.4- Concentrations optimales en amorces pour la PCRq-B.

La figure **8** correspond aux valeurs de Ct et d'intensité de fluorescence observées pour chaque combinaison de concentration pour la quantification des kystes de *G. lamblia* appartenant au génotype B.

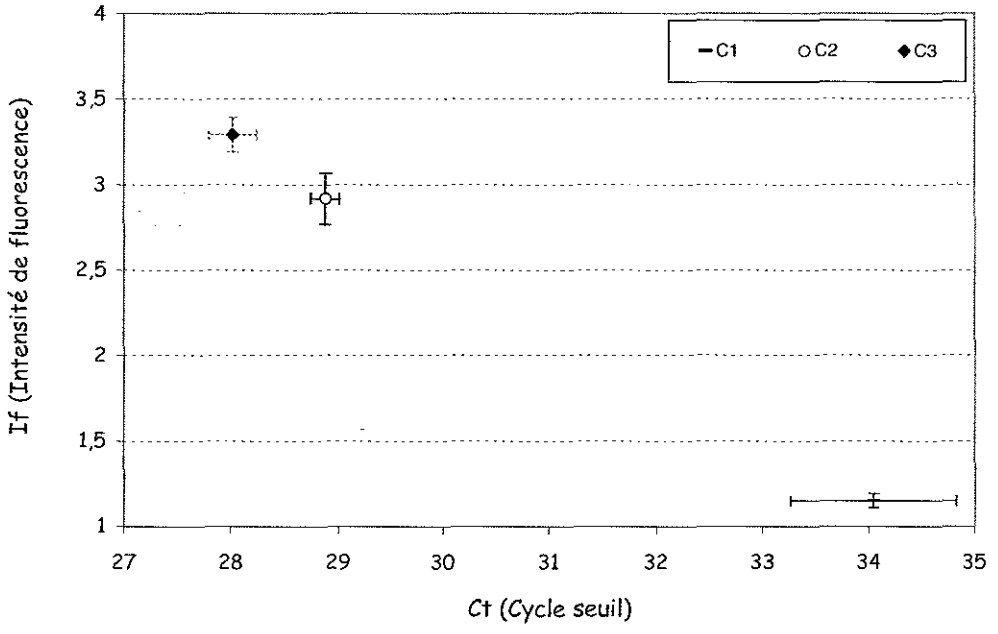


Figure 8 : Intensités de fluorescence (If) en fonction des valeurs de cycle seuil (Ct) pour trois combinaisons de concentrations en amorces (C1 : 0,1/0,1 µM ; C2 : 0,5/0,5 µM ; C3 : 1/1 µM) pour la PCRq-B

Pour une même concentration initiale de $1,8.10^5$ kystes.200 μL^{-1}, les valeurs de Ct varient entre 28,02 (C3) et 34,04 (C1), ce qui correspond à une différence de 6,02 Ct pour ces valeurs extrêmes. Les valeurs d'intensité de fluorescence sont comprises entre 1,15 (C1) et 3,29 (C3). La combinaison C3 (1/1 µM) permet d'obtenir la valeur de Ct la plus faible pour une intensité de fluorescence maximale.

La quantification des kystes de *G. lamblia* appartenant au génotype B est réalisée avec des concentrations en amorces sens (B-for) et antisens (B-rev) de 1 µM (C3) dans le milieu réactionnel.

2- Détermination de la concentration optimale en sonde.

Après avoir fixé les concentrations optimales en amorces sens et antisens, nous déterminons la concentration optimale en sonde pour chacune de ces quatre PCR quantitatives. En effet, des variations de concentration de la sonde peuvent, comme dans le cas des amorces, provoquer des variations de Ct. Ainsi, une concentration trop faible en sonde (condition limitante) provoque une augmentation de la valeur du Ct. Par contre, l'utilisation d'une concentration trop élevée en sonde est susceptible de générer une fluorescence résiduelle pouvant perturber l'interprétation des résultats.

Afin de déterminer la concentration optimale de chaque sonde TaqMan ou TaqMan MGB, nous testons six concentrations comprises entre 0,15 et 0,40 µM avec des incréments de 0,05 µM. La concentration optimale en sonde est celle fournissant le plus faible Ct. Nous avons également pris la précaution de vérifier que l'intensité de

fluorescence est bien supérieure à 1 et qu'il n'y a pas d'émission de fluorescence résiduelle dans les tubes témoins négatifs ne contenant pas d'ADN cible.

Les concentrations initiales en kystes de *Giardia* indiquées pour les différentes PCR correspondent aux valeurs avant extraction de l'ADN pour 200 µL de suspension.

2.1- Concentration optimale en sonde pour la PCRq-lamblia.

La concentration initiale correspond à $1,8.10^5$ kystes de *G. lamblia* .200 μL^{-1} avant extraction de l'ADN. Chaque concentration de sonde LAP-1 est testée en triplicat. Les valeurs moyennes des Ct et des If sont représentées en fonction de la concentration en sonde sur la figure 9.

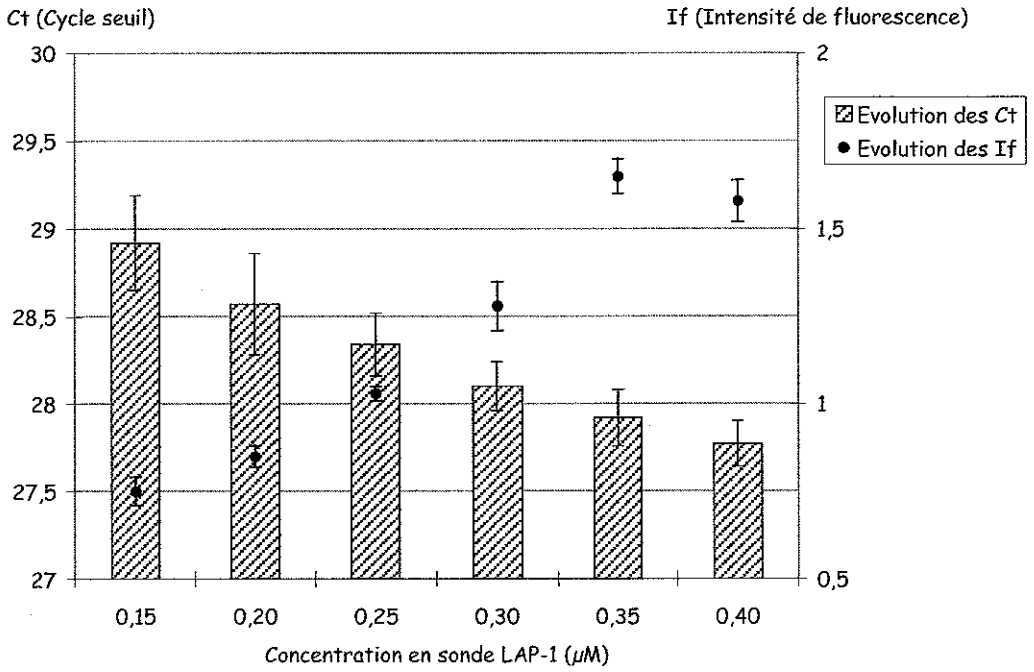


Figure 9 : Valeurs des Ct et des If observées pour des concentrations en sonde LAP-1 comprises entre 0,15 et 0,40 µM

Concernant les valeurs de Ct, elles s'échelonnent entre 27,73 et 28,92, ce qui correspond à un écart de 1,19 unités pour cette gamme de concentration. On constate que les valeurs de Ct diminuent avec l'augmentation de la concentration en sonde et que l'If devient supérieure à 1 pour une concentration en sonde supérieure ou égale à 0,25 µM. D'après le test de Snedecor, les valeurs moyennes de Ct obtenues pour ces six concentrations en sonde LAP-1 peuvent être comparées ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) montre une différence significative entre les valeurs de Ct obtenues pour les concentrations 0,15 et 0,40 µM ($p < 0,05$). Par contre, aucune différence significative n'est montrée pour les concentrations comprises entre 0,20 et 0,40 µM ($p > 0,05$).

Etant donné que les valeurs de Ct diminuent lorsque la concentration en sonde augmente pour la gamme de concentration testée, deux concentrations (0,25 et 0,35 µM) sont comparées sur une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* de raison 10. Les valeurs moyennes des Ct observées en fonction de la concentration en sonde, pour chaque point de la gamme de dilution, sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Valeurs de Ct observées pour une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* de raison 10 amplifiée avec des concentrations en sonde LAP-1 de 0,25 µM ou 0,35 µM

Concentration en sonde LAP-1	Concentration initiale (kystes de *G. lamblia*.200µL^{-1})					
	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,8.10^1$	1,8
0,25 µM	28,46 ± 0,09	31,88 ± 0,25	35,41 ± 0,81	39,03 *1/3	X	X
0,35 µM	29,28 ± 0,06	32,79 ± 0,09	36,39 ± 0,51	39,33 *2/3	X	X

*1/3 : 1 réaction positive / triplicat ; *2/3 : 2 réactions positives / triplicat. X : pas d'émission de fluorescence

On constate que les valeurs de Ct sont très proches pour ces deux concentrations en sonde LAP-1. Ainsi, pour une concentration initiale de $1,8.10^5$ kystes de *G. lamblia*.200 µL^{-1}, les valeurs moyennes des Ct sont de 28,46 pour une concentration de 0,25 µM et 29,28 pour une concentration de 0,35 µM. Pour la plus faible concentration détectée par les deux PCR ($1,8.10^2$ kystes.200 µL^{-1}), la valeur de Ct est de 39,03 pour une concentration de 0,25 µM et 39,33 pour une concentration de 0,35 µM.

Etant donné que l'utilisation de la plus faible des deux concentrations (0,25 µM) n'entraîne pas d'augmentation des valeurs des Ct, la sonde LAP-1 est utilisée à une concentration de 0,25 µM pour la quantification des kystes de *G. lamblia* lors de nos expérimentations.

2.2- Concentration optimale en sonde pour la PCRq-muris.

Chaque concentration en sonde MUP-1 est testée en triplicat avec une concentration initiale correspondant à $1,8.10^5$ kystes de *G. muris*.200 µL^{-1}. Les résultats présentés sur la figure **10** correspondent aux valeurs moyennes des Ct et des If en fonction de la concentration en sonde.

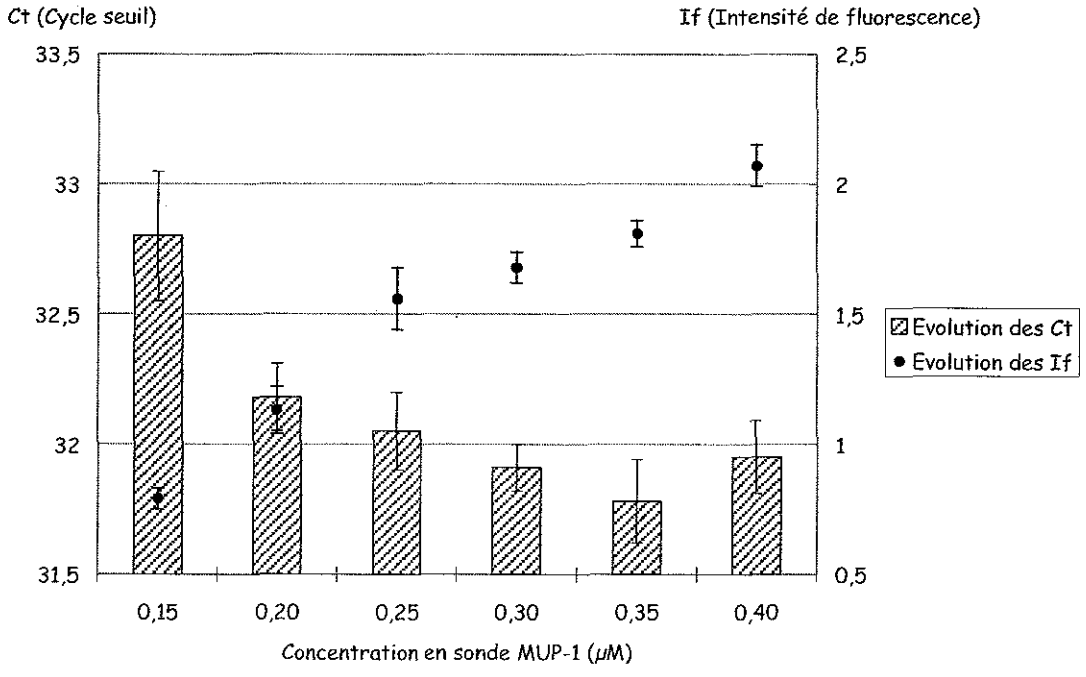


Figure 10 : Valeurs des Ct et des If observées pour des concentrations en sonde MUP-1 comprises entre 0,15 et 0,40 µM

Concernant les valeurs de Ct, elles sont comprises entre 31,78 et 32,80 et présentent donc de très faibles variations. La valeur de Ct la plus faible est observée pour une concentration en sonde de 0,35 µM et l'If devient supérieure à 1 pour une concentration en sonde supérieure ou égale à 0,20 µM. D'après le test de Snedecor, les valeurs moyennes observées pour ces six concentrations en sonde MUP-1 peuvent être comparées ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) ne montre pas de différence significative entre les valeurs de Ct pour des concentrations en sonde comprises entre 0,20 et 0,40 µM ($p > 0,05$).

Au vu de ces résultats, la sonde TaqMan MGB MUP-1 est utilisée pour la quantification des kystes de *G. muris* à la concentration 0,30 µM car elle permet d'obtenir un Ct de 31,91 présentant le coefficient de variation le plus faible (0,09 %), mais aussi d'atteindre une If de 1,68.

2.3- Concentration optimale en sonde pour la PCRq-Assemblage A.

Chaque concentration en sonde *Giardia-A* est testée en triplicat pour une concentration initiale de $2,5.10^4$ kystes.200 μL^{-1} avant extraction de l'ADN. Les valeurs de Ct et d'If obtenues en fonction de la concentration en sonde sont présentées sur la figure **11**.

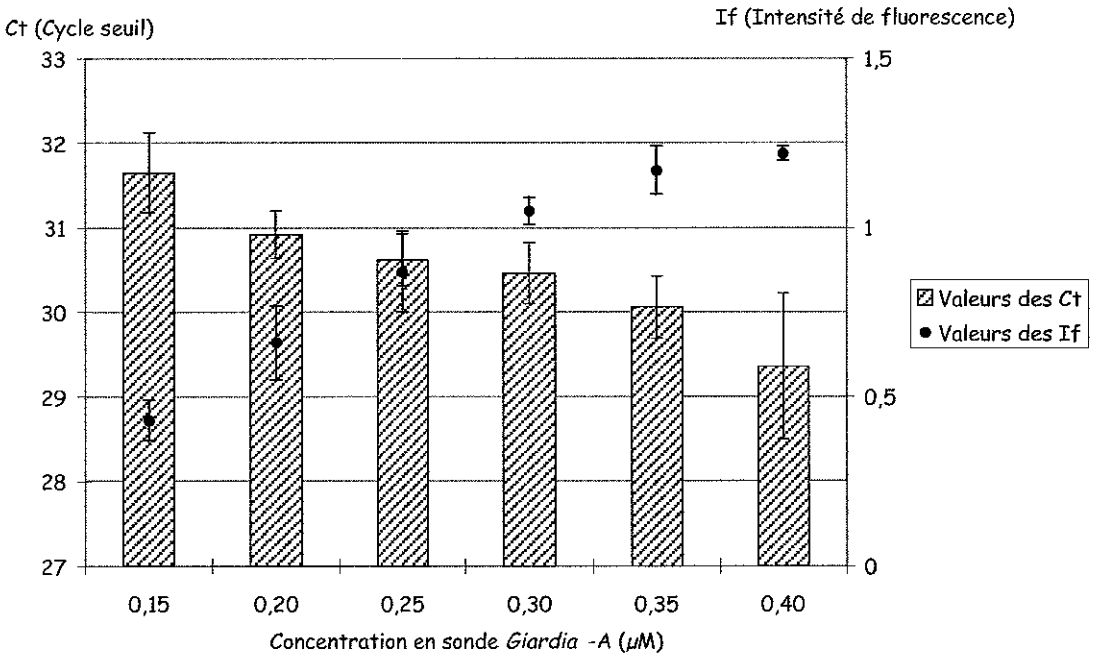


Figure 11 : Valeurs des Ct et des If observées pour des concentrations en sonde *Giardia-A* comprises entre 0,15 et 0,40 µM

Les valeurs moyennes des Ct sont comprises entre 29,36 et 31,65, ce qui correspond à un intervalle de 2,29 Ct pour cette gamme de concentration en sonde. L'intensité de fluorescence varie entre 0,43 et 1,2. L'intensité de fluorescence est supérieure à 1 quand la concentration en sonde *Giardia-A* est supérieure ou égale à 0,30 µM.

D'après le test de Snedecor, les valeurs moyennes de Ct obtenues pour ces six concentrations en sonde *Giardia-A* peuvent être comparées ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) ne montre pas de différence significative pour les valeurs de Ct observées pour des concentrations en sonde comprises entre 0,25 et 0,40 µM

($p > 0,05$). Une concentration en sonde de 0,35 µM permet d'atteindre un Ct moyen de 30,06 avec une intensité de fluorescence comprise entre 1,13 et 1,26.

La quantification des kystes de *G. lamblia* du génotype A est réalisée avec une concentration en sonde *Giardia*-A de 0,35 µM durant nos expérimentations.

2.4- Concentration optimale en sonde pour la PCRq-Assemblage B.

Les expérimentations sont réalisées en triplicat pour chaque concentration en sonde *Giardia*-B avec une concentration initiale de $1,8.10^5$ kystes.200 μL^{-1} avant extraction de l'ADN. Les valeurs de Ct et d'intensité de fluorescence observées sont présentées sur la figure **12**.

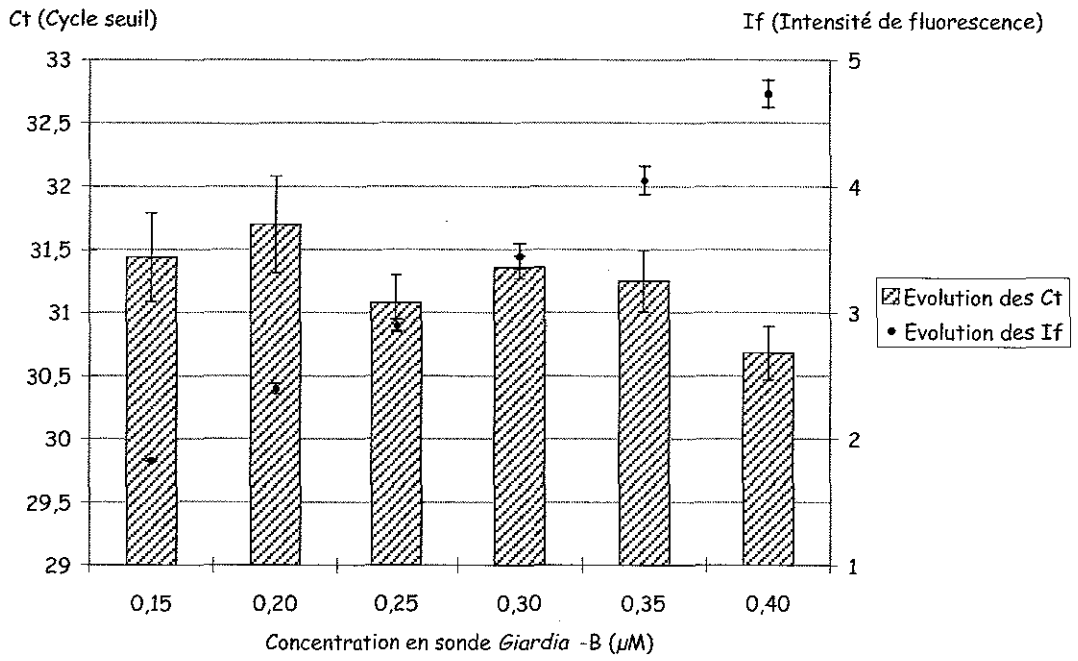


Figure 12 : Valeurs des Ct et des If observées pour des concentrations en sonde *Giardia*-B comprises entre 0,15 et 0,40 µM

Les valeurs moyennes des Ct sont comprises entre 30,67 et 31,70, ce qui correspond à un écart de seulement 1,03 Ct pour cette gamme de concentration en sonde. L'intensité de fluorescence varie entre 1,36 et 4,73, mais on observe une production de fluorescence parasite dans les tubes ne contenant pas d'ADN cible pour des concentrations en sonde supérieures ou égales à 0,35 µM. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que le "quenching" n'est pas optimal. A partir de cette valeur de 0,35 µM, la concentration en sonde est saturante.

D'après le test de Snedecor, les valeurs moyennes de Ct obtenues pour ces six concentrations en sonde *Giardia*-B peuvent être comparées ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) ne montre pas de différence significative pour les valeurs de Ct correspondant à des concentrations en sonde s'échelonnant entre 0,10 et 0,30 µM ($p > 0,05$). La plus faible valeur d'écart-type est obtenue pour un concentration en sonde de 0,30 µM et l'intensité de fluorescence est alors nettement supérieure à 1.

Nos expérimentations concernant la quantification des kystes de *G. lamblia* appartenant au génotype B sont réalisées avec une concentration en sonde de 0,30 µM.

En résumé,

Lors de nos expérimentations, le couple d'amorces GIAF2 / GIAR1 est utilisé à la concentration 0,5 / 0,5 µM pour la quantification des kystes de *G. lamblia* et de *G. muris*.

Les couples d'amorces A - for/A – rev et B- for/B - rev destinés à la quantification des génotypes A et B de l'espèce *G. lamblia* sont utilisés aux concentrations 0,5/0,5 µM et 1/1 µM respectivement.

La sonde LAP-1 est utilisée à la concentration 0,25 µM pour la quantification des kystes de *G. lamblia*. La quantification des kystes de *G. muris* est réalisée avec une concentration en sonde MUP-1 de 0,35 µM.

Les sondes *Giardia*-A et *Giardia*-B sont utilisées respectivement aux concentrations 0,35 µM et 0,30 µM pour la détection des génotypes A et B de *G. lamblia*.

3ème PARTIE : Validation des techniques de détection.

Lors de cette étape de validation, plusieurs caractéristiques sont vérifiées :

- ✦ Spécificité des amorces et sondes
- ✦ Sensibilité
- ✦ Variations intra et inter-essai de l'étape d'amplification
- ✦ Domaine de linéarité et rendement
- ✦ Variation inter-essai de l'étape d'extraction de l'ADN
- ✦ Compétition des kystes de *G. muris* vis-à-vis de la détection des kystes de *G. lamblia*

1- Evaluation de la spécificité des PCR quantitatives et qualitatives.

1.1- Evaluation de la spécificité par comparaison avec la base de données Genbank.

Dans une première étape, la spécificité des amorces et sondes est évaluée par le test BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) qui est disponible sur le site NCBI. Ce test permet de comparer les séquences des amorces et des sondes avec toutes les séquences répertoriées sur la base de données Genbank et de savoir si des amplifications non spécifiques peuvent être observées avec nos systèmes. Ce test est d'autant plus important que ces amorces et sondes seront utilisées pour l'analyse de selles et d'échantillons environnementaux.

1.1.1.- Spécificité des systèmes PCRq-lamblia et PCRq-muris.

1.1.1.1- Spécificité des amorces GIAF2 et GIAR1.

D'après le test BLAST, le couple d'amorces utilisé pour ces deux PCR quantitatives (GIAF2 et GIAR1) amplifie le gène de l'EF1A pour *G. lamblia*, *G. muris* et *G. ardeae*. Aucun autre gène ne devrait être amplifié par ces amorces selon les données actuelles.

1.1.1.2- Spécificité des sondes LAP1 et MUP1.

La version BLAST adaptée aux séquences courtes a été utilisée pour les sondes LAP-1 et MUP-1 car elles sont composées de 14 et 16 nucléotides respectivement.

Pour la sonde LAP-1, la recherche fournit 15 autres gènes présentant une homologie complète, mais ces gènes ne sont pas reconnus par les deux amorces. La sonde LAP-1 présente une homologie complète avec le gène EF1A de l'espèce *G. ardeae* et pourrait s'hybrider avec celui-ci.

Pour la sonde MUP-1, la recherche BLAST a montré une homologie complète avec l'espèce *G. muris* et avec une autre séquence qui n'est pas amplifiée par les deux amorces. De plus, la sonde MUP-1 ne s'hybriderait pas avec les gènes EF1A des espèces *G. lamblia* et *G. ardeae.*

Des gènes, autres que les gènes cibles, présentant au minimum une variation de séquence avec les sondes LAP-1 ou MUP-1 ne sont pas retrouvés lors du test des amorces.

1.1.2- Spécificité du système PCRq-A.

D'après le test BLAST, le couple d'amorces utilisé pour la PCRq-A (A-for et A-rev) serait spécifique de du génotype A. Le test de l'amorce sens montre quatre variations de séquence avec les génotypes E et F, mais l'amorce antisens ne présente aucune homologie de séquence significative avec ces deux génotypes.

La version BLAST adaptée aux séquences courtes a été utilisée pour la sonde *Giardia*-A car elle ne contient que 16 nucléotides. Cette sonde présente une homologie complète avec deux autres séquences qui ne sont pas amplifiées par les amorces.

1.1.3- Spécificité du système PCRq-B.

Le couple d'amorces B-for et B-rev serait spécifique du génotype B. De plus, la sonde *Giardia*-B présente une forte spécificité pour ce génotype puisque le test BLAST ne fournit qu'un seul autre gène qui présente six différences de séquence par rapport à celle de la sonde qui contient 22 nucléotides.

1.1.4- Spécificité des amorces destinées à la détection des génotypes C et E.

D'après le test BLAST, les couples d'amorces permettant la détection des génotypes C (C-for et C-rev) et E (E-for et E-rev) seraient spécifiques de leur génotype.

1.2- Evaluation de la spécificité des sondes par PCR.

Dans cette deuxième étape, la spécificité des systèmes est évaluée par PCR qualitatives ou quantitatives.

Les PCRq-*lamblia* et la PCRq-muris sont testées en présence d'ADN provenant uniquement de kystes de *G. muris* et *G. lamblia* respectivement. La concentration initiale par réaction correspond à $1,8.10^5$ kystes de *G. muris* ou de *G. lamblia* pour 200 µL de suspension purifiée. Les deux sondes sont testées en triplicat et aucune émission de fluorescence n'est observée. Ainsi, les sondes LAP1 et MUP1 ne s'hybrident pas avec l'ADN de *G. muris* et *G. lamblia* respectivement, alors que la partie de la séquence EF1A utilisée pour dessiner ces deux sondes ne comporte que deux nucléotides de différence entre les espèces *G. lamblia* et *G. muris.*

De même les PCRq-A et PCRq-B sont testées sur des kystes de *G. lamblia* appartenant aux génotypes B et A respectivement. Les concentrations initiales par réaction correspondent à $2,5.10^4$ et $1,8.10^5$ kystes pour 200 µL

de suspension pour les génotypes A et B. Aucune émission de fluorescence n'est observée pour ces deux PCR quantitatives.

Les PCR qualitatives permettant la détection des génotypes C et E sont testées sur des concentrations en kystes appartenant aux génotypes A ou B identiques aux PCR quantitatives. Lors de la révélation sur gel d'agarose aucune bande d'amplification n'est observée.

2- Evaluation de la sensibilité des PCR.

La sensibilité des PCR quantitatives est évaluée en amplifiant des gammes de dilution de raison 10 réalisées avant l'extraction d'ADN. Les concentrations initiales en kystes de *Giardia* sont précisées pour un volume de 200 µL de suspension purifiée de kystes avant extraction de l'ADN.

2.1- Evaluation de la sensibilité des systèmes PCRq-lamblia et PCRq-muris.

2.1.1- Sensibilité observée avec le protocole initial d'extraction de l'ADN.

Le tableau **2** présente les valeurs de Ct observées en triplicat pour les gammes de dilution de kystes de *G. lamblia* et *G. muris* dont l'ADN est extrait avec le protocole initial non modifié.

Tableau 2 : Valeurs de Ct observées pour les gammes de dilution logarithmique de *G. lamblia* et *G. muris* amplifiées en triplicat après extraction de l'ADN avec le protocole initial

	Concentration initiale (kystes.200 μL^{-1})					
	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,810^1$	1,8
G. lamblia Ct moyen ± écart-type	28,46 ± 0,09	31,88 ± 0,25	35,41 ± 0,81	39,03 *1/3	X	X
G. muris Ct moyen ± écart-type	29,42 ± 0,25	33,05 ± 0,54	X	X	X	X

*1/3 : 1 réaction positive / triplicat. X : pas d'émission de fluorescence

Concernant la PCRq-*lamblia*, 100 % de réactions positives sont obtenues pour une concentration initiale de $1,8.10^3$ kystes.200 μL^{-1} et 33 % de réactions positives sont observées pour une concentration initiale de $1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1}.

Par contre, pour la PCRq-*muris*, 100 % de réactions positives ne sont obtenues que pour une concentration initiale supérieure ou égale à $1,8.10^4$ kystes.200 μL^{-1}. L'amplification de nouvelles gammes de dilution de kystes de *G. muris* n'a pas permis d'améliorer ce seuil de détection. Ainsi, la PCRq-*muris* présente une sensibilité de détection 10 à 100 fois plus faible que la PCRq-*lamblia*.

2.1.2- Sensibilité observée suite à l'optimisation du protocole d'extraction avec le RNA Carrier®.

Suite à ces résultats, une optimisation du protocole d'extraction de l'ADN est évaluée en utilisant le RNA Carrier® qui est une séquence polyA. Le RNA Carrier® est inclus dans le protocole d'extraction lors de l'étape de lyse des protéines. L'ADN de nouvelles gammes de dilution de kystes de *G. lamblia* et de *G. muris* est alors extrait en présence de RNA Carrier® puis amplifié en triplicat. Les valeurs des Ct observées en présence de cette molécule sont présentées dans le tableau **3**.

Tableau 3 : Valeurs de Ct observées en triplicat suite à une extraction d'ADN réalisée avec le RNA Carrier® pour des gammes de dilution de kystes de *G. lamblia* ou de *G. muris*

	Concentration initiale (kystes.200 μL^{-1})					
	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,8.10^1$	1,8
G. lamblia Ct moyen ± écart-type	24,75 ± 0,24	28,50 ± 0,12	32,53 ± 0,46	35,67 ± 0,48	38,36 *1/3	X
G. muris Ct moyen ± écart-type	28,44 ± 0,05	33,91 ± 0,25	38,86 *2/3	X	X	X

*1/3 : 1 réaction positive / triplicat. *2/3 : 2 réactions positives / triplicat. X : pas d'émission de fluorescence

Concernant les kystes de *G. lamblia*, une réponse positive est observée pour la totalité des triplicats correspondant à des concentrations initiales comprises entre $1,8.10^5$ et $1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1} et une seule courbe d'amplification a été obtenue pour le triplicat correspondant à $1,8.10^1$ kystes.200 μL^{-1}. Ainsi, une sensibilité de détection correspondant à $1,8.10^1$ kystes.200 μL^{-1} ou 0,45 kyste par puits de PCR peut être obtenue avec cette PCRq-*lamblia*.

Pour les kystes de *G. muris*, une amélioration de la sensibilité est également observée. Toutefois, la sensibilité reste nettement inférieure à celle atteinte pour les kystes de *G. lamblia* puisqu'une réponse positive est obtenue dans la totalité des cas, uniquement pour une concentration initiale supérieure ou égale à $1,8.10^4$ kystes.200 μL^{-1}. Deux puits du triplicat correspondant à $1,8.10^3$ kystes.200 μL^{-1} sont positifs pour cette espèce. Pour ces deux PCR quantitatives, aucune émission de fluorescence n'est observée dans les tubes témoins ne contenant pas d'ADN.

Ainsi, l'utilisation de cette séquence polyA lors de l'extraction d'ADN permet d'améliorer sensiblement la sensibilité de détection de ces deux PCR quantitatives. En effet, le gain en terme de seuil de détection de ces deux systèmes correspond à une dilution logarithmique. La sensibilité de chacune de ces PCR est donc multipliée par 10. Toutefois, malgré l'utilisation du RNA Carrier®, la sensibilité de détection pour les kystes de *G. muris* reste 10 à 100 fois inférieure à celle obtenue pour les kystes de *G. lamblia*.

2.1.3- Séquençage de l'amplicon de la PCRq-muris.

Suite au plus faible niveau de sensibilité observé pour la PCRq-*muris* par rapport à la PCRq-*lamblia*, l'amplicon obtenu pour la cible *G. muris* est séquencé. L'amplicon utilisé pour le séquençage est obtenu par PCR qualitative (50 cycles, température d'hybridation de 60°C, chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe 7.3.2.2) en utilisant les amorces GIAF2 et GIAR1 et une concentration initiale de $1,8.10^5$ kystes de *G. muris*.200 μL^{-1}. Le séquençage est ensuite réalisé par la société Qbiogène research services (ESGS-génopôle, Evry, France).

Ce séquençage a permis d'obtenir la séquence complète de l'amplicon de 120 pb. Le résultat est comparé avec la séquence EF1A de *G. muris* provenant de la base de données Genbank utilisée pour la sélection des amorces et de la sonde TaqMan MGB. La comparaison des deux séquences ne montre aucune variation entre le résultat du séquençage et la séquence provenant de la base de données.

Suite à ces résultats, les expérimentations ne sont pas poursuivies avec la PCRq-*muris* qui ne permet pas une détection suffisamment sensible des kystes de *G. muris*.

2.2- Evaluation de la sensibilité du système PCRq-A.

Le tableau **4** présente les valeurs de Ct (n = 5) observées avec le système PCRq-A pour une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia*, du génotype A obtenue à partir de selles humaines. L'ADN de cette gamme est extrait avec le protocole optimisé précédemment. Pour ce système, des points intermédiaires sont inclus entre les points de la gamme de raison 10 afin d'obtenir un nombre suffisant de valeurs.

Tableau 4 : Valeurs de Ct observées (n = 5) suite à une extraction d'ADN réalisée avec le RNA Carrier® pour des gammes de dilution de kystes de *G. lamblia*, génotype A

	Concentration initiale, *G. lamblia* - génotype A (kystes.200 μL^{-1})							
	$2,5.10^4$	$1,25.10^4$	$2,5.10^3$	$1,25.10^3$	$2,5.10^2$	$1,25.10^2$	$2,5.10^1$	$1,25.10^1$
Ct moyen ± écart-type	28,72 ± 0,39	29,84 ± 0,27	32,58 ± 0,27	34,84 ± 0,64	36,37 ± 1,11	38,03*	X	X

X : pas d'émission de fluorescence / * : 2 analyses positives sur 5

100 % de réactions positives sont observées pour les concentrations supérieures ou égales à $2,5.10^2$ kystes.200 μL^{-1}. Pour une concentration initiale de $1,25.10^2$ kystes.200 μL^{-1}, deux analyses sur cinq permettent d'obtenir une amplification. Ainsi, une sensibilité de détection correspondant $1,25.10^2$ kystes.200 μL^{-1} ou 3 kystes par puits de PCR peut être atteinte avec cette PCRq-A.

2.3- Evaluation de la sensibilité du système PCRq-B.

Le tableau **5** présente les valeurs de Ct (n = 5) observées avec le système PCRq-B pour une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* du génotype B identique à celle utilisée pour la PCRq-*lamblia* et dont l'ADN est extrait avec le protocole optimisé précédemment.

Tableau 5 : Valeurs de Ct observées (n = 5) suite à une extraction d'ADN réalisée avec le RNA Carrier® pour des gammes de dilution de kystes de *G. lamblia*, Assemblage B

	Concentration initiale, *G. lamblia* - génotype B (kystes.200 μL^{-1})					
	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,8.10^1$	1,8
Ct moyen ± écart-type	27,70 ± 0,06	31,36 ± 0,10	35,14 ± 0,26	38,11 ± 0,80	X	X

X : pas d'émission de fluorescence

On observe 100 % de réactions positives pour une concentration initiale comprise entre $1,8.10^2$ et $1,8.10^5$ kystes.200 μL^{-1}. Aucune émission de fluorescence n'est observée pour les puits contenant une concentration correspondant à $1,8.10^1$ kystes.200 μL^{-1}. Ainsi, la sensibilité de détection de cette PCRq-B est comprise entre $1,8.10^1$ et $1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1}, c'est-à-dire entre 0,45 et 4,5 kystes de *Giardia* par réaction.

2.4- Evaluation de la sensibilité des PCR qualitatives.

Concernant les PCR qualitatives destinées à la mise en évidence de quatre génotypes de l'espèce *G. lamblia*, la sensibilité est évaluée uniquement pour les PCR permettant la détection des génotypes A et B. En effet, il ne nous a pas été possible d'obtenir des kystes de *G. lamblia* appartenant aux génotypes C et E.

Les résultats obtenus pour les PCR qualitatives spécifiques des génotypes A et B réalisées en triplicat sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résultats obtenus par PCR qualitative pour des kystes de *G. lamblia* appartenant aux génotypes A et B

	Concentration initiale (kystes.200 μL^{-1})					
	$2,5.10^4$	$1,25.10^4$	$2,5.10^3$	$1,25.10^3$	$2,5.10^2$	$1,25.10^2$
Génotype A	+	+	+	+	+	-
(n = 3)	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	-
	Concentration initiale (kystes.200 μL^{-1})					
	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,8.10^1$	1,8
Génotype B	+	+	+	+	-	-
(n = 3)	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	-	-

La PCR qualitative destinée à la mise en évidence du génotype A permet de détecter entre $1,25.10^2$ et $2,5.10^2$ kystes.200 μL^{-1} en suspension purifiée. Le seuil de détection de la PCR qualitative du génotype B est compris entre $1,8.10^1$ et $1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1} en suspension purifiée. Ainsi, les seuils de détection de ces deux PCR qualitatives sont compris entre 3 et 6 kystes par réaction pour le génotype A et entre 0,45 et 4,5 kystes par réaction pour le génotype B.

3- Variations intra et inter-essai de l'étape de quantification.

Afin de valider le protocole de quantification des kystes de *Giardia* en suspension purifiée, il est nécessaire d'estimer les variations intra-essai et inter-essai de ces PCR quantitatives. Lors de cette étape, nous évaluons également la variation inter-essai du protocole d'extraction d'ADN à partir de kystes en suspensions purifiées.

Quel que soit le niveau de variation étudié, son estimation est basée sur le calcul du coefficient de variation (CV) qui est obtenu à partir des valeurs moyennes des Ct et des valeurs des écart-types. Le coefficient de variation est exprimé en pourcentage.

$$CV\ (\%) = \frac{\text{Ecart - type des } Ct}{\text{Moyenne des } Ct} \times 100$$

3.1- Variation intra-essai.

La variation intra-essai des trois PCR quantitatives (PCRq-*lamblia*, PCRq-A et PCRq-B) est déterminée en amplifiant les différents points des gammes de dilution de kystes de *G. lamblia* (génotype A ou B) en cinq fois lors de la même PCR. Les valeurs des coefficients de variation (CV %) obtenus pour les systèmes PCRq-*lamblia*, PCRq-A et PCRq-B sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Valeurs des coefficients de variation (CV %) pour l'estimation de la variation intra-essai pour les systèmes PCRq-*lamblia*, PCRq-B et PCRq-A

Système : PCRq-*lamblia*						
Concentration (kystes.200 μL^{-1})	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,8.10^1$	
CV % (n = 5)	**0,9**	**0,5**	**0,6**	**1,1**	nc*	
Système : PCRq-B						
Concentration (kystes.200 μL^{-1})	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$		
CV % (n = 5)	**0,2**	**0,3**	**0,7**	**2,1**		
Système : PCRq-A						
Concentration (kystes.200 μL^{-1})	$2,5.10^4$	$1,25.10^4$	$2,5.10^3$	$1,25.10^3$	$2,5.10^2$	$1,25.10^2$
CV % (n = 5)	**1,4**	**0,9**	**0,8**	**1,8**	**3,1**	nc**

nc : non calculable / * : 1 analyse positive sur 5 / ** : 2 analyses positives sur 5

Concernant la variation intra-essai de la PCRq-*lamblia*, les valeurs des coefficients de variation sont comprises entre 0,53 % ($1,8.10^4$ kystes.200 μL^{-1}) et 1,07 % ($1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1}).

Les valeurs des coefficients de variation de la PCRq-B s'échelonnent de 0,21 % ($1,8.10^5$ kystes.200 μL^{-1}) à 2,11 % ($1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1}).

Pour la PCRq-A, les coefficients de variation varient de 0,8 % ($2,5.10^3$ kystes.200 μL^{-1}) à 3,1 % ($2,5.10^2$ kystes.200 μL^{-1}).

La PCRq-*lamblia* est caractérisée par des coefficients de variation inférieurs ou très proches de 1 %. Concernant la PCRq-A, les valeurs des coefficients de variation sont globalement plus élevées et atteignent 3,1 % pour une concentration de $2,5.10^2$ kystes.200 μL^{-1}. Les coefficients de variation intra-essai de la PCRq-B sont inférieurs à 1 % pour une concentration supérieure ou égale à $1,8.10^3$ kystes.200 μL^{-1}, par contre pour une concentration plus faible le coefficient de variation atteint 2,1 %.

Hormis pour une des valeurs obtenues avec la PCRq-A, les coefficients de variation sont inférieurs ou proches de 2 % qui est la valeur maximale observée par Heid *et al.* (1996) lors de l'évaluation de la variation intra -essai en PCR quantitative.

3.2- Variation inter-essai.

La variation inter-essai de chacune des PCR (PCRq-*lamblia*, PCRq-A et PCRq-B) est évaluée en amplifiant les différents points des gammes de dilution de kystes de *G. lamblia* (génotype A ou B) en différentes PCR. Les gammes de dilution sont réalisées avant l'extraction d'ADN. Les valeurs des coefficients de variation sont présentées dans le tableau **8**.

Les valeurs des coefficients de variation des PCRq-*lamblia* et PCRq-B correspondent à sept amplifications distinctes et elles sont calculées à partir de cinq amplifications pour la PCRq-A.

Tableau 8 : Valeurs des Ct moyens, des écart-types et des coefficients de variation pour l'estimation de la variation inter-essai

Système : PCRq-*lamblia*						
Concentration (kystes.200 μL^{-1})	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,8.10^1$	
CV % (n = 7)	**0,5**	**0,8**	**0,7**	**1,6**	**2,2***	
Système : PCRq-B						
Concentration (kystes.200 μL^{-1})	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$		
CV % (n = 7)	**0,8**	**0,9**	**0,7**	**2,4**		
Système : PCRq-A						
Concentration (kystes.200 μL^{-1})	$2,5.10^4$	$1,25.10^4$	$2,5.10^3$	$1,25.10^3$	$2,5.10^2$	$1,25.10^2$
CV % (n = 5)	**0,7**	**0,8**	**1,8**	**1,6**	**2,2**	nc**

X : pas d'émission de fluorescence / * : 3 analyses positives sur 7 / ** 2 analyses positives sur 5

Concernant la PCRq-*lamblia*, trois courbes d'amplification sont obtenues pour une concentration initiale de $1,8.10^1$ kystes.200 μL^{-1}. Les valeurs des coefficients de variation inter-essai s'échelonnent entre 0,5 % ($1,8.10^5$ kystes.200 μL^{-1}) et 2,2 % ($1,8.10^1$ kystes.200 μL^{-1}).

Pour la PCRq-B, les coefficients de variation inter-essai sont compris entre 0,7 % ($1,8.10^3$ kystes.200μL^{-1}) et 2,4 % ($1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1}).

Les coefficients de variation inter-essai de la PCRq-A varient entre 0,7 % ($2,5.10^4$ kystes.200 μL^{-1}) et 2,2 % ($2,5.10^2$ kystes.200 μL^{-1}). Deux courbes d'amplification sont obtenues pour la concentration $1,25.10^2$ kystes.200 μL^{-1}.

Globalement, ces valeurs sont inférieures à 2 %, excepté pour les coefficients de variation des concentrations initiales les plus faibles qui sont compris entre 2,2 % et 2,4 %. Ces valeurs restent proches de celles observées par Heid *et al.* (1996) qui observent des coefficients de variation inter-essai inférieurs à 2 %.

4- Evaluation du domaine de linéarité et du rendement.

Dans cette étape, nous avons évalué le rendement de la PCR quantitative à partir de la droite standard obtenue lors de l'amplification de la gamme de dilution logarithmique d'ADN. La formule permettant le calcul du rendement à partir de la pente de cette droite standard est la suivante (Ibekwe *et al.*, 2003) :

$$\text{Rendement (\%)} = (10^{-1/\text{valeur de la pente}}) - 1$$

Ainsi, une PCR quantitative présentant un rendement de 100 % aura une pente de – 3,32. Si le rendement de la PCR quantitative est compris entre 75 % (pente = -4,10) et 100 % (pente = -3,32) alors il existe une relation linéaire entre la valeur du Ct et le $\log_{10}$ du nombre de copies.

4.1- Domaine de linéarité et rendement de la PCRq-lamblia.

La figure **13** correspond à la droite étalon obtenue avec une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* de raison 10, amplifiée cinq fois simultanément.

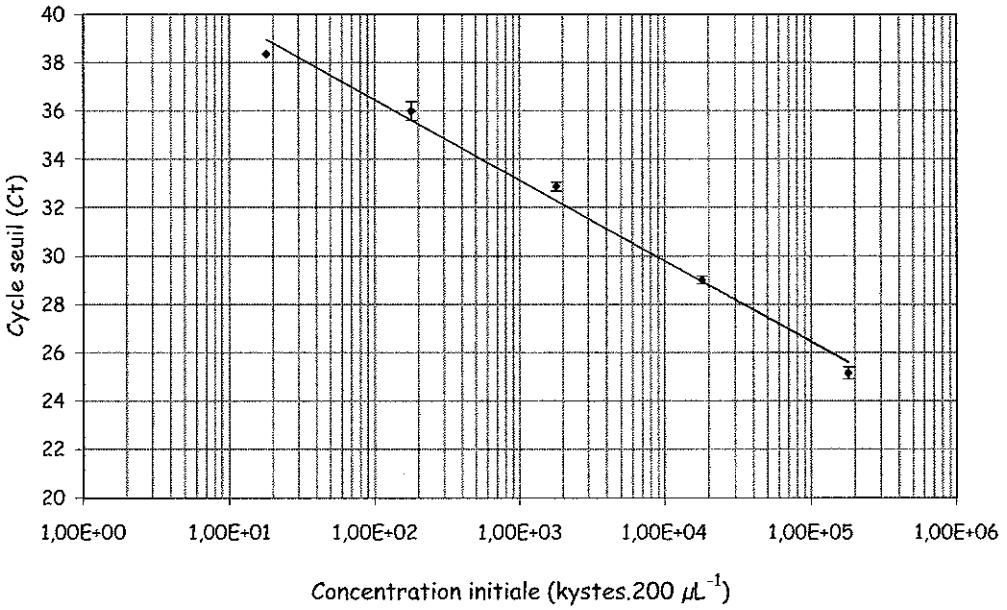


Figure 13 : Droite étalon de la PCRq-*lamblia* obtenue avec une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* de raison 10 (n = 5). Pente = -3,34 ; Ordonnée à l'origine = 43,14 ; R^2 = 0,991

La pente de cette droite est de - 3,34 et le coefficient de détermination (R^2) est de 0,991. D'après la pente de cette droite, le rendement de la PCRq-*lamblia* est estimé à 99 %. Le domaine de linéarité de l'amplification s'étend sur 4 $\log_{10}$, c'est-à-dire sur des concentrations initiales qui s'échelonnent entre $1,8.10^5$ et $1,8.10^1$ kystes.200 μL^{-1}.

4.2- Domaine de linéarité et rendement de la PCRq-A.

La figure **14** correspond à la droite étalon obtenue avec une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia*, génotype A amplifiée cinq fois simultanément. Des points intermédiaires sont inclus entre les points de la gamme de raison 10 afin d'obtenir un nombre suffisant de valeurs pour la réalisation de la représentation graphique.

La pente de cette droite est de - 4,00 et le coefficient de détermination (R^2) est 0,985. D'après la valeur de la pente, le rendement de la PCRq-A est estimé à 78 %. Le domaine de linéarité de l'amplification s'étend sur plus de 2 $\log_{10}$, c'est-à-dire sur des concentrations initiales qui s'échelonnent entre $2,5.10^4$ et $1,25.10^2$ kystes.200 μL^{-1}.

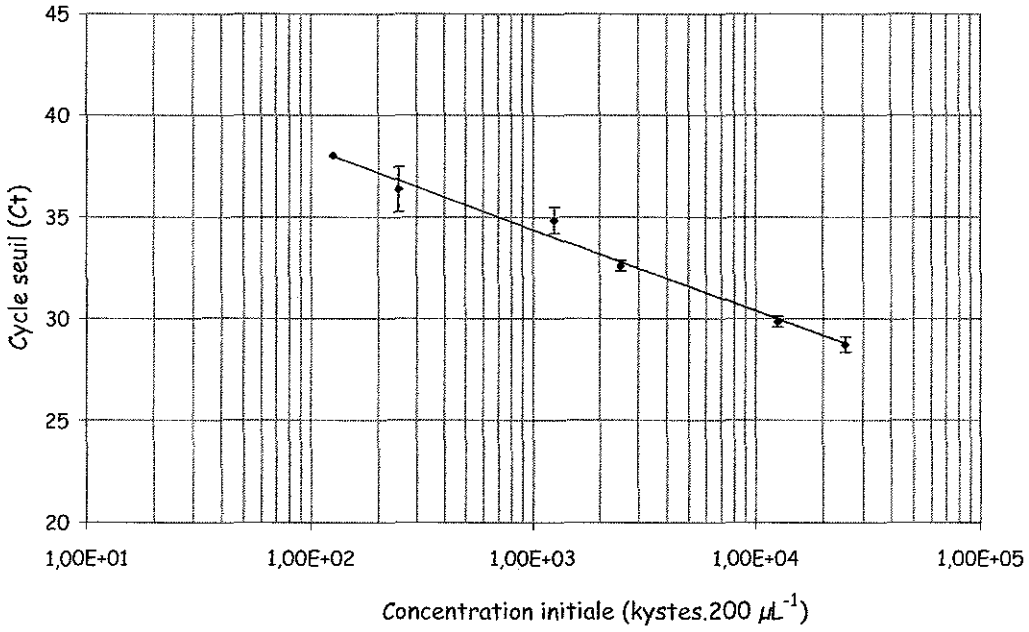


Figure 14 : Droite étalon de la PCRq-A obtenue avec une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* génotype A (n = 5). Pente = -4,00 ; Ordonnée à l'origine = 46,42 ; R^2 = 0,985

4.3- Domaine de linéarité et rendement de la PCRq-B.

La figure **15** correspond à la droite étalon obtenue avec une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia*, génotype B de raison 10 amplifiée cinq fois simultanément.

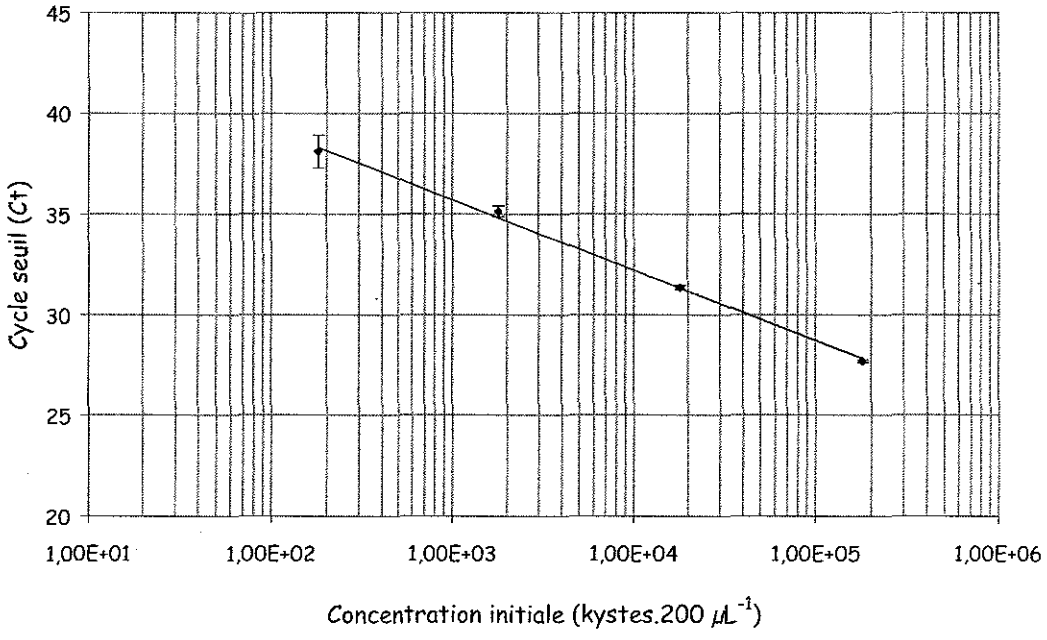


Figure 15 : Droite étalon de la PCRq-B obtenue avec une gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* génotype B (n = 5). Pente = -3,50 ; Ordonnée à l'origine = 46,22 ; R^2 = 0,997

La pente de cette droite est de - 3,50 et le coefficient de détermination (R^2) a pour valeur 0,997. Le rendement de la PCRq-B est estimé à 93 % d'après la valeur de la pente. Le domaine de linéarité de l'amplification s'étend sur 3 log_{10}, c'est-à-dire sur des concentrations initiales qui s'échelonnent entre $1,8.10^5$ et $1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1}.

5- Variation inter-essai de l'étape d'extraction de l'ADN.

La variation inter-essai du protocole d'extraction d'ADN est évaluée en réalisant quatre extractions d'ADN distinctes sur des kystes de *G. lamblia*. Chaque extraction d'ADN est précédée d'une dilution de raison 10 des kystes de *G. lamblia*. Les quatre gammes d'extrait d'ADN ont été amplifiées lors de la même PCRq-*lamblia*. Les valeurs des coefficients de variation obtenues lors de cette PCR, sont présentées dans le tableau **9**.

Tableau 9 : Valeurs des coefficients de variation observés lors de l'estimation de la variation inter-essai de l'étape d'extraction (n = 4)

Concentration initiale (kystes.200 μL^{-1})	$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,8.10^1$	1,8
Coefficient de variation (%)	**1,81**	**2,49**	**1,43**	**2,86**	X	X

X : pas d'émission de fluorescence

Les valeurs des coefficients de variation sont comprises entre 1,43 % ($1,8.10^3$ kystes.200 μL^{-1}) et 2,86 % ($1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1}). Ces valeurs sont nettement inférieures à 5 % et nous semblent tout à fait satisfaisantes, d'autant plus qu'elles tiennent compte de la variation entraînée par la réalisation de la gamme de dilution de raison 10. Ces coefficients de variation nous permettent de conclure que l'étape d'extraction de l'ADN, n'engendre pas de variations importantes de la quantification des kystes de *G. lamblia* en suspension purifiée pour la gamme de dilution testée.

6- Compétition des kystes de G. muris sur la quantification des kystes de G. lamblia.

La sonde LAP-1 s'hybride uniquement à l'ADN de *G. lamblia*, mais les amorces GIAF2 et GIAR1 permettent l'amplification de l'ADN de *G. lamblia* et de *G. muris*. Suite à cette compétition possible entre les kystes de *Giardia* provenant de ces deux espèces, nous évaluons l'impact de la présence de kystes de *G. muris* sur l'extraction d'ADN et la détection des kystes de *G. lamblia*.

Une quantité constante de kystes de *G. muris* est ajoutée à chaque point de la gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* de raison 10, avant l'étape d'extraction de l'ADN. La quantité ajoutée à chaque point de la gamme de dilution correspond à une concentration de $1,8.10^5$ kystes *G. muris* .200 μL^{-1}.

Le tableau **10** regroupe les valeurs de Ct observées pour les différents ratio *G. muris* / *G. lamblia* de cette droite standard.

Tableau 10 : Valeurs de Ct observées pour les différents ratios *G. muris* / *G. lamblia*

Concentration en kystes de *G. lamblia* (kystes.200 μL^{-1})					
$1,8.10^5$	$1,8.10^4$	$1,8.10^3$	$1,8.10^2$	$1,8.10^1$	1,8
Concentration en kystes de *G. muris* (kystes.200 μL^{-1})					
$1,8.10^5$	$1,8.10^5$	$1,8.10^5$	$1,8.10^5$	$1,8.10^5$	$1,8.10^5$
Valeurs des ratios *G lamblia* / *G. muris*					
1	1.10^{-1}	1.10^{-2}	1.10^{-3}	1.10^{-4}	1.10^{-5}
Valeurs moyennes des CT ± écart-type					
24,37 ± 0,15	27,67 ± 0,21	32,22 ± 0,54	37,24 *1/3	X	X

*1/3 : 1 réaction positive / triplicat. X : pas d'émission de fluorescence

La figure **16(A)** représente la droite standard pour les kystes de *G. lamblia* pour une extraction et une amplification réalisées en l'absence de kystes de *G. muris*. La figure **16(B)** correspond à la droite standard observée pour les kystes de *G. lamblia* en présence des kystes de *G. muris*.

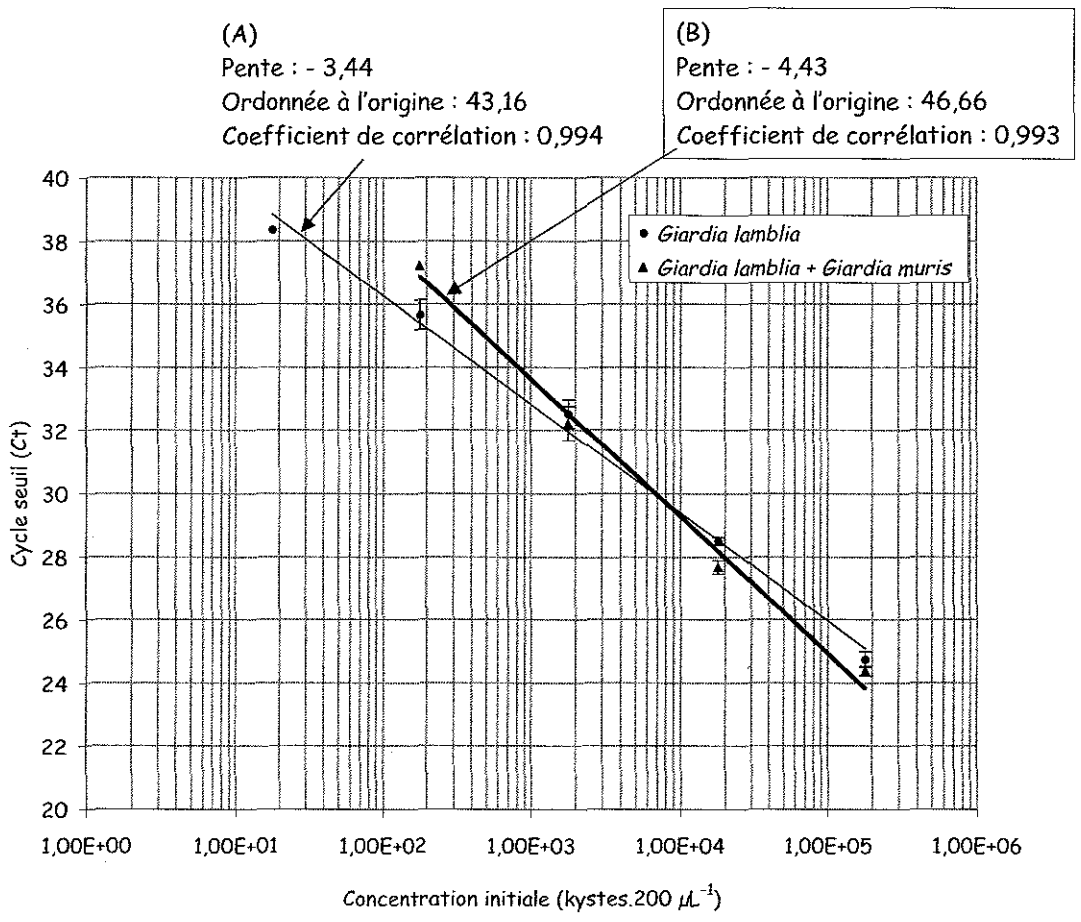


Figure 16 : Droites standard observées pour les kystes de *G. lamblia*

(A) Droite standard obtenue pour la gamme de dilution de raison 10 de kystes de *G. lamblia* seuls

(B) Droite standard obtenue pour le même type de gamme de dilution de kystes de *G. lamblia* en présence d'une concentration constante de kystes de *G. muris*

En présence de kystes de *G. muris*, des courbes d'amplification sont obtenues pour des concentrations initiales comprises entre $1,8.10^5$ et $1,8.10^2$ kystes de *G. lamblia* .200 μL^{-1}. La pente de la droite standard a alors une valeur de - 4,34 avec un coefficient de détermination (R^2) de 0,993. A partir de la pente, le rendement de la PCR quantitative est estimé à 70 %.

Pour des concentrations initiales comprises entre $1,8.10^5$ et $1,8.10^3$ kystes de *G. lamblia* .200 μL^{-1}, la pente de la droite standard est de - 3,93 avec un coefficient de détermination (R^2) de 0,996. Le rendement de la PCR quantitative est alors de 80 %.

Ainsi, une sensibilité de détection de $1,8.10^2$ kystes de *G. lamblia* peut être atteinte en présence de $1,8.10^5$ kystes de *G. muris*. Lorsque le ratio *G. muris/G. lamblia* est supérieur à 100, la valeur de Ct est nettement augmentée. En effet, le Ct moyen est de 35,67 (n = 3) en l'absence de kystes de *G. muris*, alors qu'il est de 37,24 avec un seul puits positif en présence de cette autre espèce. Un phénomène de compétition entre les kystes de ces deux espèces apparaît pour un ratio *G. muris / G. lamblia* supérieur à 100, ce qui entraîne une diminution de la sensibilité et de l'efficacité de la PCR quantitative. Toutefois, l'espèce *G. lamblia* concerne un plus grand nombre d'hôte que l'espèce *G. muris* et un ratio *G. muris/G. lamblia* supérieur à 100 ne devrait pas être observé dans des prélèvements d'eaux usées.

En résumé,

Cette première étape de nos expérimentations visait à développer et valider des PCR en temps réel et des PCR qualitatives à partir de suspensions purifiées de kystes de *G. lamblia* et *G. muris*. Nous avons tout d'abord sélectionné, à partir des cibles possibles pour notre étude, des systèmes comprenant soit deux amorces et une sonde pour les quatre PCR en temps réel, soit un couple d'amorces pour les quatre PCR qualitatives.

Les concentrations en amorces et en sonde des quatre PCR quantitatives ont été optimisées et la spécificité des différents systèmes a ensuite été évaluée. Les amorces GIAF2 et GIAR1 s'hybrident avec les séquences EF1A appartenant aux espèces *G. lamblia*, *G. muris* et *G. ardeae*. La PCRq-*muris* amplifierait uniquement l'ADN de *G. muris*. Par contre, la PCRq-*lamblia* n'est pas entièrement spécifique pour *G. lamblia* et permettrait également la quantification de *G. ardeae*. Lors de cette étude, il n'a pas été possible d'obtenir des kystes appartenant aux trois espèces *G. microti*, *G. psittaci* et *G. agilis*. Ainsi, les amorces et sondes n'ont pu être testées sur ces trois espèces pour lesquelles aucune séquence de l'EF1A n'est actuellement disponible dans la base de données Genbank. D'après nos expérimentations, les PCRq-A et PCRq-B et les deux PCR qualitatives destinées à la détection des génotypes C et E apparaissent comme spécifiques de leur génotype.

La PCRq-*lamblia* présente une sensibilité pouvant atteindre 18 kystes.200 μL^{-1}, alors que les PCRq-A et PCRq-B présentent un seuil de détection plus faible qui est respectivement de 125 et 180 kystes.200 μL^{-1} de suspension purifiée. L'évaluation des quatre systèmes de PCR en temps réel a montré une sensibilité insuffisante de la PCRq-*muris* correspondant à $1,8.10^3$ kystes.200 μL^{-1} de suspension purifiée. Le séquençage n'a pas montré de variation par rapport à la séquence référencée dans la base de donnée Genbank, le système n'a pas été retenu pour la suite de nos expérimentations.

Les deux PCR qualitatives destinées à la mise en évidence des génotypes A et B détectent respectivement $2,5.10^2$ et $1,8.10^2$ kystes.200 μL^{-1} de suspension purifiée. Le seuil de sensibilité précisé pour 200 µL de suspension purifiée de kystes avant extraction de l'ADN correspond à la même sensibilité théorique pour un échantillon environnemental de 100 mL si son volume est amené à 200 µL par concentration et purification.

Ces valeurs de sensibilité peuvent également être rapportées en nombre de kystes détectés par réaction de PCR. La PCRq-*lamblia* détecte alors 0,45 kyste par réaction. Les PCRq-A et PCRq-B détectent respectivement 3 et 4,5 kystes par réaction. Enfin, les PCR qualitatives destinées à la détection des génotypes A et B présentent une sensibilité respective de 6 et 4,5 kystes par réaction, détectés dans la totalité des cas.

L'évaluation des rendements d'amplification aboutit à des valeurs comprises entre 77,8 % pour la PCRq-A et 99 % pour la PCRq-*lamblia*. Concernant la variation intra et inter-essai de l'étape d'amplification, les valeurs des coefficients de variation sont globalement satisfaisantes. De plus, la reproductibilité de l'étape d'extraction, évaluée avec la PCRq-*lamblia*, est supérieure à 95 %.

Ainsi, nous avons décidé de transposer les trois PCR quantitatives (PCRq-*lamblia*, PCRq-A et PCRq-B) à la quantification des kystes de *G. lamblia* dans différents types d'eaux usées. Les quatre PCR qualitatives vont permettre la détection des kystes de *G. lamblia* appartenant aux génotypes A, B, C et E soit dans des eaux usées, soit dans des selles humaines. Les expérimentations concernant le développement de la PCR en temps réel destinée à la quantification de l'espèce *Giardia lamblia* ont fait l'objet d'une publication (Bertrand *et al.*, 2003).

Pour la thèse de Isabelle BERTRAND

IL N’Y A PAS DE PAGE 146

Résultats : Chapitre 2

Concentration et purification des kystes de *Giardia*

à partir de prélèvements d'eaux usées.

✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣

Suite à la première partie de nos expérimentations réalisées uniquement sur des kystes en suspensions purifiées, nous disposons d'outils rapides, spécifiques et sensibles qui vont nous permettre de quantifier et détecter des kystes de l'espèce *Giardia lamblia* et de quatre de ses génotypes dans des prélèvements d'eaux usées en parallèle à une détection conventionnelle par immunofluorescence.

Toutefois, l'application de ces techniques de détection à l'analyse d'eaux usées nécessite de faire appel à des étapes de concentration et de purification adaptées à ce type d'échantillons et aux exigences des techniques de biologie moléculaire. En effet, les eaux usées contiennent des quantités élevées de matière organique pouvant entraîner une sous-estimation des concentrations en kystes lors de la détection par immunofluorescence mais aussi par PCR. De plus, les techniques de biologie moléculaire sont sensibles à un grand nombre de composés inhibiteurs pouvant entraîner une sous-estimation des concentrations en kystes voire l'obtention de faux résultats négatifs.

Dans cette deuxième partie de nos expérimentations, les étapes de concentration et de purification des kystes, mais aussi d'extraction-purification de l'ADN sont adaptées afin d'obtenir un protocole global nous permettant de détecter ces kystes de *Giardia lamblia* dans des eaux usées prélevées au niveau de deux stations d'épuration et d'un abattoir par immunofluorescence et PCR en temps réel. Lors de ces expérimentations effectuées à partir d'eaux usées prétraitées, de nombreuses techniques sont évaluées avec pour objectif d'adapter et d'optimiser la détection par PCR à l'analyse de ces échantillons très turbides.

La comparaison de techniques de concentration et de purification est tout d'abord réalisée pour la détection des kystes par immunofluorescence. Des variantes du protocole d'extraction de l'ADN ainsi que des techniques de purification des kystes sont ensuite évaluées pour la détection par PCR en temps réel. Ainsi, des techniques basées sur la densité des éléments à purifier, permettant d'optimiser la récupération d'ADN en présence de matière en suspension ou de masquer l'effet des inhibiteurs présents dans ce type d'échantillons, mais aussi la séparation immunomagnétique (IMS) sont testées lors de ces travaux.

1- Comparaison de techniques de concentration et de purification pour la détection des kystes de Giardia par immunofluorescence.

Comme l'a montré l'étude bibliographique, la floculation et la centrifugation sont les techniques les plus couramment employées pour la concentration des kystes de *Giardia* à partir d'eaux usées. Lors d'essai de concentration sur membrane ou sur cartouche avec ce type d'échantillons très turbides, la plupart des auteurs observent un colmatage rapide de la surface filtrante, ces techniques ne sont donc pas retenues pour nos expérimentations.

Lors de cette première partie des expérimentations réalisées sur des prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy, nous comparons deux méthodes de concentration (floculation au carbonate de calcium et centrifugation) et deux techniques de concentration (flottation sur solution de Percoll™-saccharose et gradient de saccharose) pour établir un protocole destiné à l'analyse des échantillons par immunofluorescence.

1.1- Comparaison de la floculation au carbonate de calcium et de la centrifugation pour la concentration des kystes de Giardia.

La floculation au carbonate de calcium et la centrifugation (filtration sur tamis de porosité 300 µm puis 2 centrifugations à 2000 g, 15 min) sont réalisées en parallèle pour trois prélèvements distincts d'eau usée de la station d'épuration de Nancy. Les deux concentrats obtenus pour chaque échantillon sont purifiés par une séparation FEA (Formaldéhyde - Acétate d'éthyle) puis par une flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10). Chaque échantillon est analysé par immunofluorescence, la concentration totale en kystes de *Giardia* ainsi que la concentration en kystes contenant des noyaux visibles par marquage au PI sont alors déterminées.

La figure 1 présente les concentrations totales en kystes de *Giardia* et les concentrations en kystes PI positifs par litre d'eau usée pour les trois prélèvements concentrés soit par floculation, soit par centrifugation.

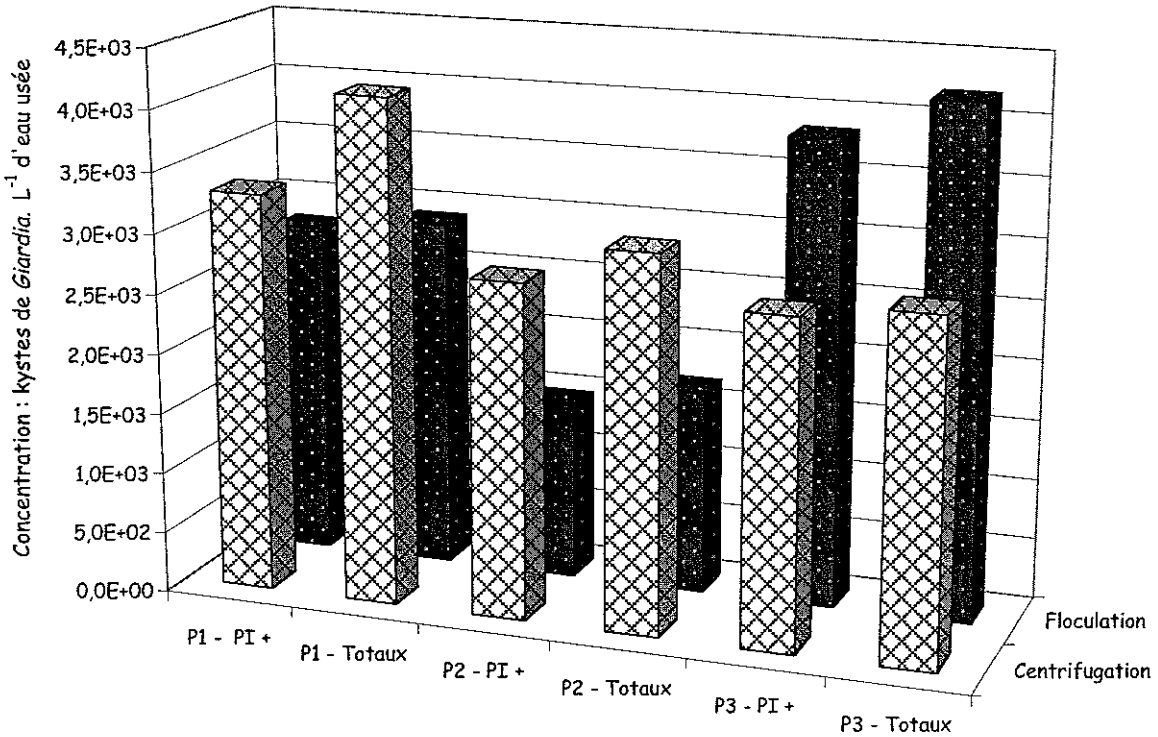


Figure 1 : Concentrations (kystes.L^{-1}) observées en IFA après concentration par floculation au carbonate de calcium ou centrifugation pour trois prélèvements (P1, P2, P3) d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy. PI + : kystes positifs au PI après congélation

Les concentrations totales en kystes sont comprises entre 2,8.10^3 et 4,2.10^3 kystes.L^{-1} après concentration par centrifugation alors qu'elles s'échelonnent entre 1,7.10^3 et 4,3.10^3 kystes.L^{-1} après floculation au carbonate de calcium. Concernant les concentrations en kystes PI positifs, elles varient entre 2,7.10^3 et 3,3.10^3 kystes.L^{-1} pour la centrifugation et entre 1,5.10^3 et 3,8.10^3 kystes.L^{-1} pour la floculation.

Ainsi, les valeurs des concentrations totales mais aussi des concentrations en kystes dont les noyaux sont visibles par marquage au PI sont plus élevées après concentration par centrifugation pour les deux premiers prélèvements.

La centrifugation, réalisée dans nos expérimentations en deux étapes de 15 minutes, est une technique plus rapide que la floculation au carbonate de calcium qui demande une durée minimale de quatre heures pour l'étape de sédimentation du floculat. De plus, la centrifugation permet de récupérer les kystes à des concentrations au moins équivalentes à la floculation sans utilisation de réactifs chimiques qui pourraient par la suite inhiber l'amplification par PCR.

Ainsi, la centrifugation est retenue comme technique de concentration des kystes de *Giardia* à partir d'eaux usées pour leur détection par immunofluorescence et PCR lors de nos expérimentations.

1.2- Comparaison de deux techniques de purification des kystes de Giardia : flottation sur solution de Percoll™-saccharose et gradient de saccharose.

Bien que de nombreuses études fassent appel à l'IMS pour la purification des kystes de *Giardia* à partir d'échantillons environnementaux, les techniques basées sur la densité des éléments à purifier sont encore couramment utilisées. Parmi ces techniques, la flottation sur solution de Percoll™-saccharose est considérée comme la méthode de référence pour la purification des kystes de *Giardia* à partir de ces échantillons environnementaux. Une technique de purification sur gradient de densité de solutions de saccharose est également choisie pour être comparée à la flottation.

L'étape de concentration est réalisée par centrifugation et une séparation au FEA précède la purification par flottation sur solution de Percoll™-saccharose ou sur gradient de densité de saccharose. La figure 2 présente les concentrations totales en kystes et les concentrations en kystes PI positifs par litre d'eau usée pour trois prélèvements de la station d'épuration de Nancy suivant la méthode de purification appliquée.

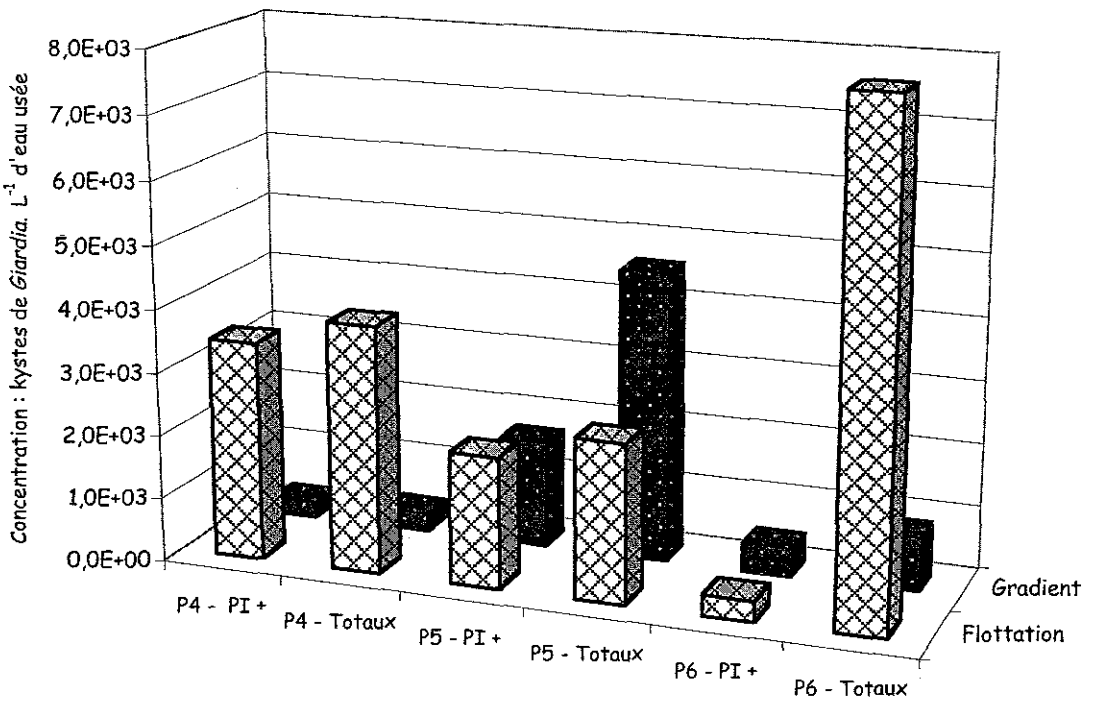


Figure 2 : Concentrations (kystes.L^{-1}) observées en IFA après centrifugation et purification des kystes de *Giardia* par flottation sur solution de Percoll™-saccharose ou gradient de densité de saccharose pour trois prélèvements (P4, P5, P6) d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy. PI + : kystes positifs au PI après congélation

Les concentrations totales en kystes de *Giardia* sont comprises entre $2,5.10^3$ et $7,9.10^3$ kystes.L^{-1} pour la technique par flottation et varient de $3,1.10^2$ à $4,6.10^3$ kystes.L^{-1} pour le gradient de densité. Les concentrations en kystes PI positifs s'échelonnent entre $3,3.10^2$ et $3,5.10^3$ kystes.L^{-1} suite à la flottation et varient de $2,7.10^2$ à $1,7.10^3$ kystes.L^{-1} après le gradient de saccharose.

Pour le premier prélèvement (P4), les concentrations les plus élevées en kystes totaux et PI positifs sont obtenues lors d'une purification par flottation. Lors de l'analyse du deuxième prélèvement (P5), les résultats sont différents puisque le gradient de densité permet d'obtenir la concentration totale en kystes la plus élevée alors que la flottation aboutit à une concentration en kystes PI positifs supérieure à celle obtenue avec le gradient. Pour le troisième prélèvement (P6), la flottation permet d'obtenir une concentration totale en kystes nettement plus élevée ($7,9.10^3$ kystes.L^{-1}) que la purification sur gradient ($4,7.10^2$ kystes.L^{-1}). Par contre, la concentration en kystes PI positifs est légèrement plus élevée suite au gradient de densité.

Globalement, la flottation permet d'obtenir des concentrations totales et des concentrations en kystes PI positifs plus élevées que le gradient. La technique par gradient de densité permet une plus forte diminution de la turbidité de l'échantillon, mais semble difficile à appliquer sur les prélèvements de l'abattoir qui sont très turbides et qui nécessiteraient alors une répartition d'un même échantillon sur plusieurs gradients. Ainsi, le gradient de saccharose n'est pas retenu comme étape de purification pour la détection des kystes par immunofluorescence mais il sera tout de même comparé avec d'autres techniques de purification pour une détection des kystes par PCR en temps réel.

En résumé,

Au vu des résultats de ces premières expérimentations, la numération de la totalité des kystes et des kystes PI positifs dans les eaux usées prétraitées sera réalisée en immunofluorescence après une étape de concentration par centrifugation (2000 g, 15 min) et une purification par séparation au FEA (Formaldéhyde - Acétate d'éthyle) suivie d'une flottation sur solution de Percoll™-saccharose de densité 1,10. La centrifugation sera également utilisée pour concentrer les kystes de *Giardia* détecter par PCR.

2- Comparaison de protocoles d'extraction de l'ADN pour l'analyse d'eaux usées.

Le protocole initial d'extraction de l'ADN optimisé sur des kystes en suspensions purifiées par l'incorporation de RNA Carrier® (extraction REF) est comparé avec six variantes de ce protocole (protocoles A à F) qui sont décrites dans le chapitre matériel et méthodes. Ces expérimentations sont réalisées sur des prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy.

Les protocoles d'extraction sont tout d'abord comparés sur des échantillons non purifiés et les plus performants sont ensuite appliqués sur des échantillons purifiés par flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10).

Afin de pouvoir comparer les différents protocoles d'extraction en s'affranchissant de la diversité des prélèvements sur lesquels ils sont testés, les résultats sont exprimés par la valeur du ratio PCR / IFA qui

correspond au nombre de kystes détectés par PCR en temps réel divisé par le nombre de kystes dont les noyaux sont mis en évidence par marquage au PI lors de l'observation par immunofluorescence.

2.1- Comparaison des protocoles d'extraction en l'absence d'étape de purification des kystes.

Lors de cette première comparaison des variantes A à F avec leur protocole de référence REF sur des échantillons d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy, nous effectuons uniquement une étape de concentration par centrifugation en amont de l'extraction de l'ADN. Aucune technique de purification des kystes n'est appliquée sur ces échantillons entre les étapes de concentration par centrifugation et d'extraction de l'ADN.

La figure 3 présente les résultats obtenus pour chacune de ces variantes en comparaison avec l'extraction REF. Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs du ratio des concentrations obtenues par PCR en temps et par immunofluorescence puisque la détection par PCR est effectuée en triplicat. Dans une première évaluation, les six variantes (A à F) sont comparées au protocole REF en utilisant différents prélèvements d'eaux usées. Les deux variantes les plus performantes sont ensuite comparées dans une seconde évaluation en utilisant un nouveau prélèvement d'eau usée.

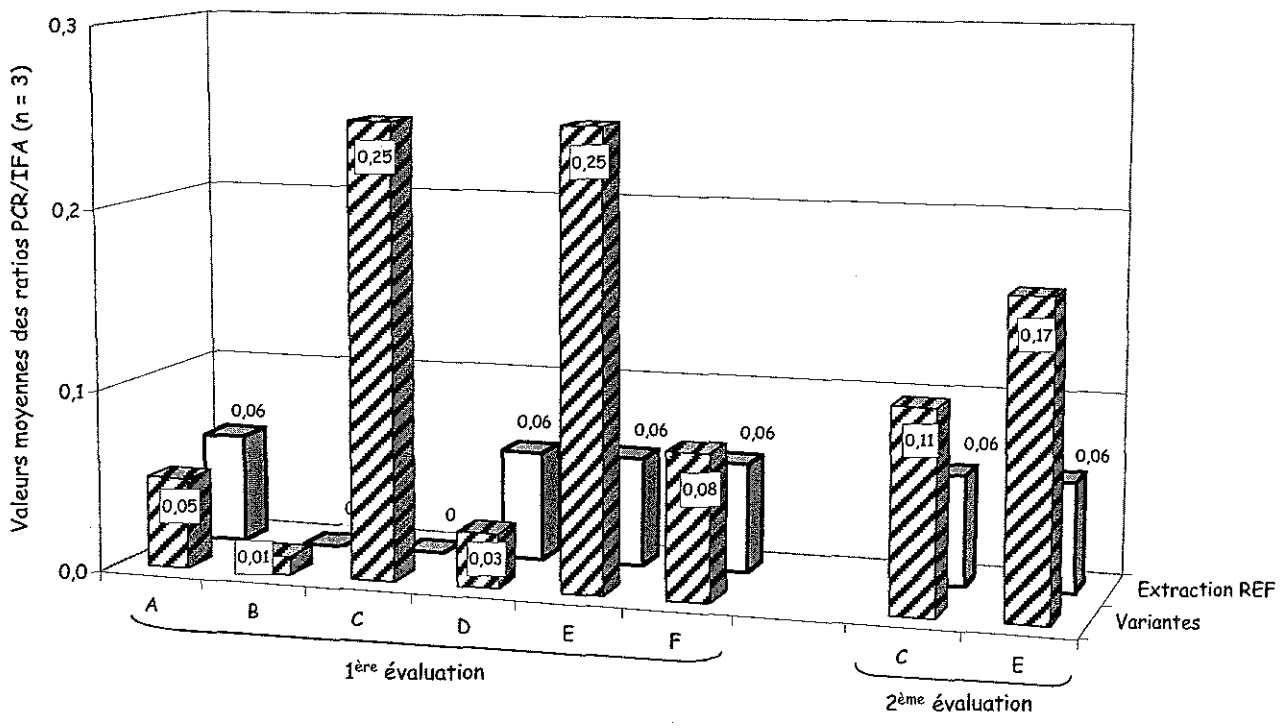


Figure 3 : Comparaison des différents protocoles d'extraction de l'ADN sur des échantillons d'eaux usées de la station de Nancy concentrés par centrifugation et non purifiés

Extraction REF : Protocole initial ; A : Augmentation du volume de tampon de lyse ; B : Augmentation des temps de lyse et d'adsorption des inhibiteurs ; C : Double étape de digestion des protéines et de purification sur colonne ; D : Précipitation des acides nucléiques à l'éthanol ; E : Combinaison de B et C ; F : Combinaison de A et C

Les valeurs de ratio obtenues avec l'extraction REF lors de cette étape sont 0 et 0,06. Les protocoles A et B qui sont caractérisés respectivement par une augmentation du volume de tampon de lyse des kystes et par

une augmentation du temps de lyse des kystes et d'adsorption des inhibiteurs, permettent d'obtenir des valeurs de ratio PCR/IFA qui sont respectivement de 0,05 et 0,01. Le protocole D qui comporte une étape de précipitation des acides nucléiques à l'éthanol aboutit à une valeur de ratio de 0,03.

Les valeurs de ratio les plus élevées sont observées pour les protocoles C, E et F qui comportent tous une double étape de digestion des protéines et de purification des acides nucléiques sur colonne. Les protocoles d'extraction C et E semblent être les plus performants, ainsi ils sont évalués sur un nouveau prélèvement d'eau usée. Lors de ces deux évaluations, le protocole C permet d'atteindre des valeurs de ratio de 0,25 et 0,11. Le protocole E aboutit à des valeurs légèrement supérieures de 0,25 et 0,17. Les deux protocoles d'extraction C et E sont conservés pour la suite des expérimentations.

2.2- Comparaison des protocoles d'extraction après une étape de purification des kystes.

Lors de la suite des expérimentations concernant les protocoles d'extraction de l'ADN, les variantes C et E sont à nouveau évaluées sur des prélèvements d'eaux usées concentrés par centrifugation et purifiés par une flottation sur solution de Percoll™-saccharose de densité 1,10. Les protocoles C et E sont testés sur deux échantillons distincts en l'absence et en présence d'une purification des kystes par flottation.

Les valeurs moyennes (n = 3) des ratios PCR/IFA obtenues pour ces deux protocoles d'extraction sont présentées sur la figure 4.

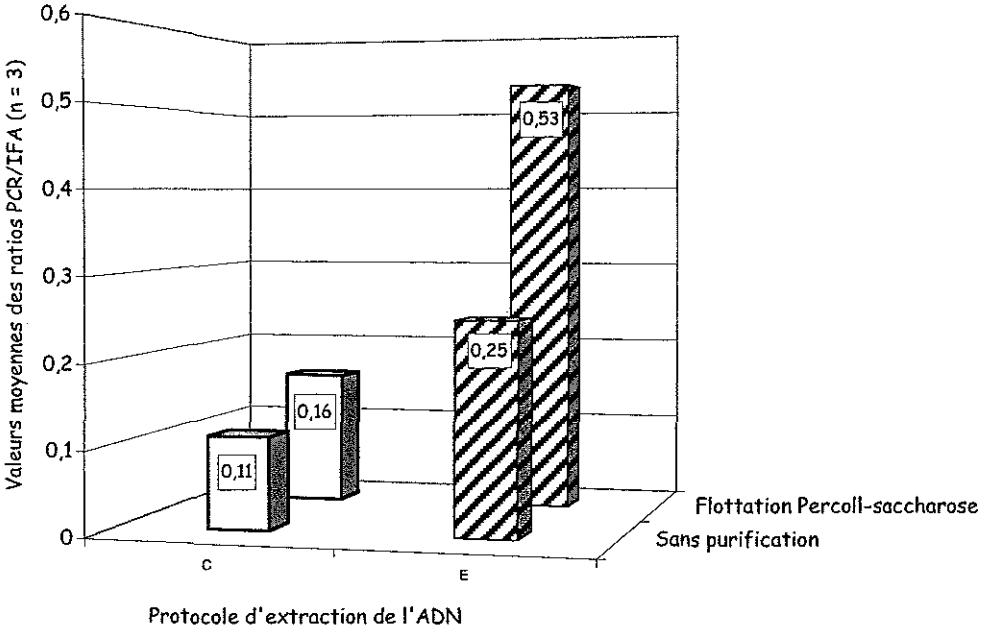


Figure 4 : Comparaison des protocoles d'extraction C et E sur deux échantillons d'eaux usées de la station de Nancy concentrés par centrifugation et purifiés par flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10)

C : Double étape de digestion des protéines et de purification sur colonne
E : Augmentation des temps de lyse et d'adsorption des inhibiteurs et double étape de digestion des protéines et de purification sur colonne

L'utilisation d'une étape de purification par flottation sur solution de Percoll™-saccharose permet d'augmenter la valeur du ratio PCR / IFA quel que soit le protocole d'extraction appliqué. Toutefois, c'est la combinaison avec le protocole d'extraction E (augmentation des temps de lyse et d'adsorption des inhibiteurs et

double étape de digestion des protéines et de purification sur colonne) qui permet d'atteindre la valeur de ratio la plus élevée (0,53).

En résumé,

Le protocole d'extraction-purification de l'ADN optimisé au niveau de l'ensemble des étapes de libération des acides nucléiques, d'adsorption des inhibiteurs et surtout de digestion des protéines et de purification sur colonne de silice permet d'obtenir les valeurs de ratio PCR/IFA les plus élevées. Parmi les modifications testées, celle portant sur la digestion des protéines et la purification sur colonne semble être la plus performante puisque ce sont les protocoles incluant cette optimisation qui permettent d'obtenir les concentrations les plus élevées.

Ainsi, ce protocole d'extraction (protocole E) est utilisé pour la suite des expérimentations concernant le développement d'un protocole de détection des kystes de *Giardia* dans les eaux usées par PCR en temps réel.

3- Comparaison de procédés pour la détection des kystes dans les eaux usées par PCR en temps réel.

Lors de cette étape, différentes techniques de purification basées sur les caractéristiques physiques des kystes, ainsi que des méthodes destinées notamment à limiter l'impact des inhibiteurs sur la détection par PCR et des méthodes diphasiques sont évaluées sur des échantillons d'eaux usées naturellement contaminées par des kystes de *Giardia*.

3.1- Les techniques de purification basées sur les caractéristiques physiques des kystes.

Lors de cette étape, des techniques de purification des kystes de *Giardia* basées soit sur la taille, soit sur la densité des éléments à purifier sont utilisées. Ces expérimentations sont réalisées sur des prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy et les résultats correspondent aux valeurs de ratio PCR / IFA (nombre de kystes détectés par PCR quantitative divisé par le nombre de kystes positifs au PI en microscopie).

La filtration sous pression négative sur deux toiles à bluter en polyester de porosité décroissante de 102 et 59 µm est testée sur un prélèvement d'eau usée. Cette technique présente l'avantage d'éliminer des débris sans utilisation de réactifs pouvant interférer avec l'étape d'amplification.

Concernant les méthodes basées sur la densité des éléments à purifier, une technique par flottation et trois types de gradient de densité sont testés. La flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10) est actuellement la méthode de référence parmi les méthodes de purification des kystes basées sur la densité. Le Percoll™ est composé de particules de silice recouvertes de polyvinylpyrrolidone.

Les trois gradients de densité testés sont constitués de solutions de saccharose, Nycodenz ou bromure de potassium. Le Nycodenz et le bromure de potassium sont évalués en raison des résultats obtenus par Chesnot et Schwartzbrod (2004) qui constatent que ces gradients permettent d'obtenir un compromis satisfaisant entre le niveau de purification et le pourcentage de récupération à partir de matrices environnementales dopées en oocystes de *Cryptosporidium*. Le gradient de saccharose utilisé précédemment lors de l'étape de sélection d'un

protocole destiné à la détection par immunofluorescence est également évalué pour la détection par PCR. Les résultats obtenus avec ces différentes techniques de purification sont présentés sur la figure **5**.

La valeur de ratio PCR / IFA observée avec la filtration (102 µm et 59 µm) est nettement inférieure à celle obtenue avec une flottation sur solution de Percoll™-saccharose. Concernant les techniques de purification basées sur la densité, la valeur de ratio la plus élevée obtenue suite au gradient de saccharose est de 0,12 (n = 3). Aucune amplification n'est obtenue par PCR avec les gradients de Nycodenz™ et de bromure de potassium, toutefois ces techniques ne sont testées que sur un prélèvement d'eau usée.

La flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10) permet d'obtenir des valeurs de ratio PCR / IFA comprises entre 0,14 et 0,76 pour quatre prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy.

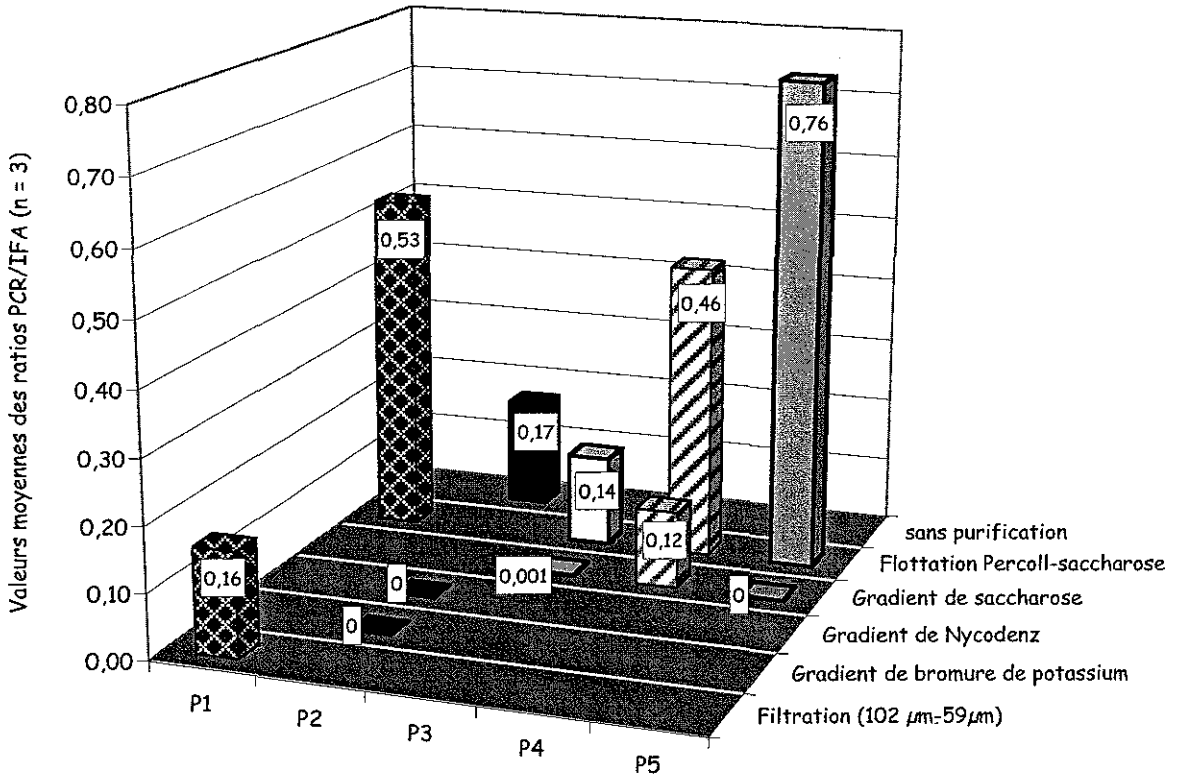


Figure 5 : Comparaison de différentes techniques de purification des kystes de *Giardia* sur des échantillons d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy concentrés par centrifugation

Ainsi, la flottation sur solution de Percoll™-saccharose est utilisée comme référence pour l'évaluation de procédés visant à masquer les inhibiteurs ou optimiser la lyse des kystes en présence de débris. Elle sera également combinée à une technique de séparation diphasique à l'acétate d'éthyle.

3.2- Procédés visant à limiter l'impact de la matière en suspension et des inhibiteurs lors de la détection par PCR.

Différents procédés visant soit à masquer l'effet des molécules inhibitrices présentes dans les prélèvements environnementaux, soit à faciliter la lyse de la paroi des kystes peuvent être envisagés lors de l'analyse des eaux usées par PCR.

L'impact de cinq réactifs destinés à masquer l'effet des inhibiteurs présents dans les prélèvements d'eau usée est évalué lors de cette étape. Ces réactifs interviennent soit en amont de l'étape d'amplification pour le Chelex-100 et la PVP-360, soit lors de la PCR concernant la BSA, le glycérol et le DMSO. Le choix de ces réactifs et de leur concentration est réalisé à partir des données bibliographiques (tableau 1).

Tableau 1 : Réactifs destinés à masquer l'effet des inhibiteurs de PCR

Réactif	Concentrations utilisées dans la littérature	Références	Concentrations testées (d'après les données de la littérature)
Réactifs intervenant en amont de l'amplification			
Chelex-100	13,5 % 20 %	Lowery *et al.* (2000) Guy *et al.* (2003)	20 et 25 %
PVP-360	7,5 % 2 % 2 %	Lawson *et al.* (1997) Monpoeho *et al.* (2000) Guy *et al.* (2003)	1 et 2 %
Réactifs intervenant lors de l'amplification			
BSA	0,2 à 0,4 $\mu g.\mu L^{-1}$ 0,01 $\mu g.\mu L^{-1}$ 2 à 6 $\mu g.\mu L^{-1}$ 0,02 $\mu g.\mu L^{-1}$	Kreader (1996) Rochelle *et al.* (1997) Abu Al-Soud et Radström (2000) Guy *et al.* (2003)	0,1 et 0,2 $\mu g.\mu L^{-1}$
Glycérol	5 % 5 à 10 %	Rochelle *et al.* (1997) Abu Al-Soud et Radström (2000)	5 %
DMSO	5 % 2,5 à 7,5 %	Rochelle *et al.* (1997) Abu Al-Soud et Radström (2000)	5 %

L'intérêt de l'utilisation de la BSA, du glycérol et du DMSO lors de l'amplification est tout d'abord évalué sur un même échantillon d'eau usée de Nancy. Ces trois molécules sont testées aux concentrations indiquées dans le tableau 1. Aucune de ces molécules ne permet de diminuer la valeur de Ct et donc d'augmenter la quantité d'ADN détecté dans cet échantillon. Il faut toutefois noter que le milieu réactionnel pour la PCR en temps réel est composé à 50 % d'un mix dont la composition est protégée par un brevet mais pouvant notamment contenir du glycérol.

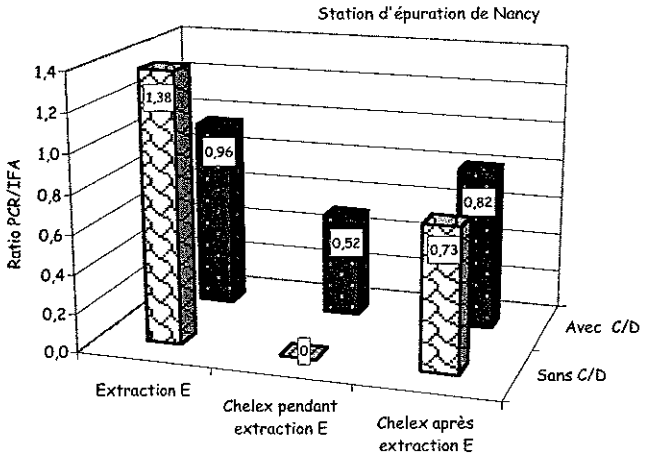
Les cycles de congélation - décongélation et les ultrasons sont également testés avec pour objectif d'optimiser la lyse des kystes et ainsi la récupération des acides nucléiques en présence d'une quantité importante de matière organique. Le tableau 2 reporte des données bibliographiques concernant la mise en œuvre de ces techniques.

Tableau 2 : Techniques évaluées pour l'optimisation de la lyse des kystes en présence de matière organique

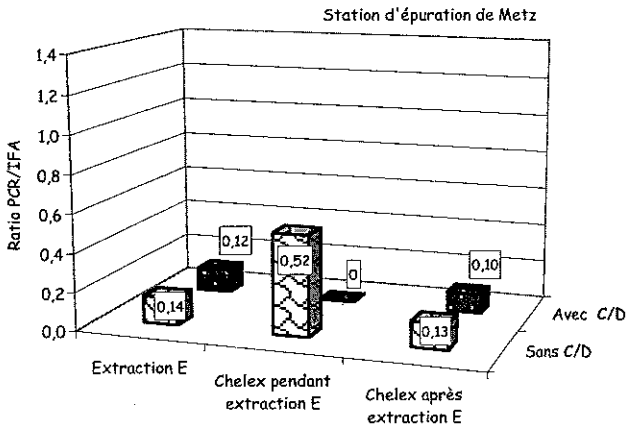
Techniques	Références	Protocole choisi
Cycles de congélation-décongélation		
5 cycles : 30 s. azote liquide (- 196°C) / 1 min 65°C 6 cycles : 2 min azote liquide / 5 min 95°C 3 cycles : 2 min azote liquide / 2 min 95°C	Kaucner et Stinear (1998) Lowery *et al.* (2000) Guy *et al.* (2003)	5 cycles : 4 min - 85°C / 4 min 90°C
Ultrasons		
30 min, 185 W	Guy *et al.* (2003)	20 min, 125 W

Une série d'analyses est réalisée en parallèle sur un prélèvement d'eau usée de chaque site. Ces échantillons sont concentrés par centrifugation et purifiés par flottation sur solution de Percoll™-saccharose. Nous évaluons alors l'impact d'un traitement au Chelex-100 appliqué soit lors de l'extraction de l'ADN et plus

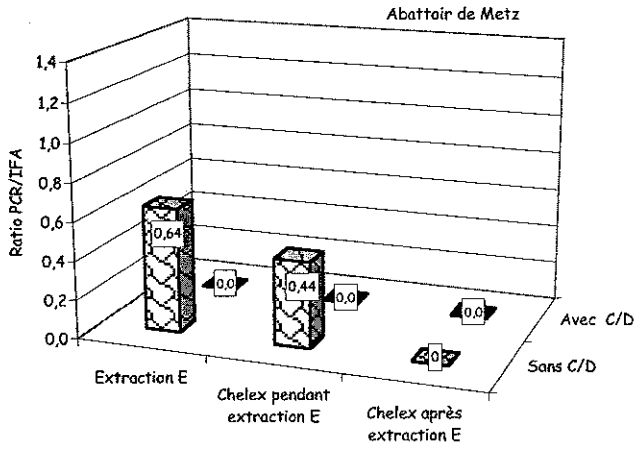
précisément après l'étape de lyse des kystes, soit sur l'ADN obtenu suite au protocole d'extraction. Ces deux traitements au Chelex-100 et le protocole d'extraction E sont combinés ou non au traitement par cinq cycles de congélation - décongélation. Ainsi, six analyses sont réalisées pour chaque prélèvement d'eau. Les résultats obtenus pour chaque site de prélèvement sont présentés sur les différents graphiques de la figure 6.



(A) Station d'épuration de Nancy



(B) Station d'épuration de Metz



(C) Abattoir de Metz

C/D : 5 cycles de congélation-décongélation, 4 min à - 85°C / 4 min à 95°C

Chelex-100 pendant extraction : traitement au Chelex-100 (concentration finale de 25 %) après l'étape de lyse des kystes.

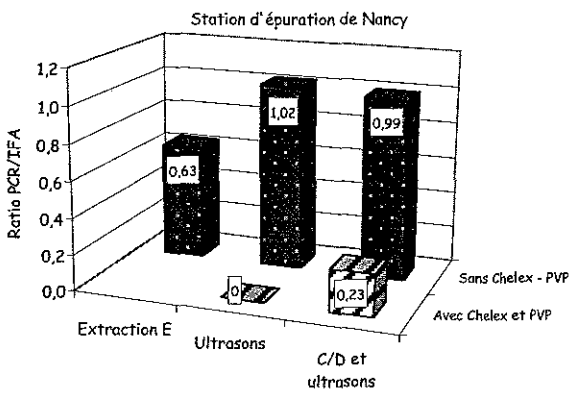
Chelex-100 après extraction : traitement au Chelex-100 (concentration finale de 25 %) sur l'ADN extrait avec le protocole E.

Figure 6 : Valeurs moyennes (n=3) observées pour le ratio PCR/IFA suite au traitement par le Chelex-100 et/ou des cycles de congélation-décongélation pour des eaux usées provenant des stations d'épuration de Nancy (A), Metz (B) et de l'abattoir de Metz (C)

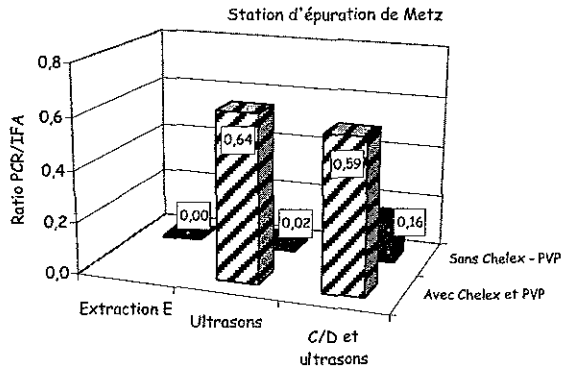
Pour le prélèvement réalisé à la station d'épuration de Nancy (A) et à l'abattoir de Metz (C), les protocoles utilisant le Chelex-100 et/ou les cycles de congélation-décongélation ne permettent pas d'obtenir des valeurs de ratio PCR/IFA supérieures au protocole de référence (extraction E). Concernant l'échantillon provenant de la station d'épuration de Metz, le traitement au Chelex-100 réalisé suite à l'utilisation de la résine InhibitEx® permet d'obtenir la valeur de ratio PCR/IFA la plus élevée.

Globalement, les résultats montrent que les cycles de congélation-décongélation ne permettent pas d'augmenter la quantité d'ADN détectée par PCR. Le manque d'homogénéité des résultats entre les différents sites ne permet pas de déterminer si l'utilisation du Chelex-100 peut avoir une incidence favorable sur la détection par PCR puisque ce traitement n'est efficace que pour un des prélèvements lors de cette première série d'expérimentations.

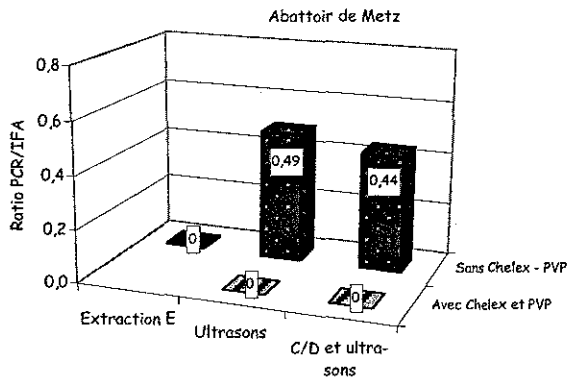
Guy *et al.* (2003) constatent que l'utilisation combinée des ultrasons, de Chelex-100 et PVP-360 permet de diminuer la valeur de Ct et donc d'augmenter la quantité d'ADN détecté en présence d'inhibiteurs lors de l'analyse d'eau usée. Le traitement par les ultrasons permettrait de casser les amas formés par la matière en suspension et d'augmenter la quantité d'ADN récupéré lors de son extraction. Lors d'une deuxième série de prélèvements, les traitements physiques par ultrasons et cycles de congélation-décongélation sont combinés au traitement par Chelex-100 et PVP-360. Ces deux molécules sont alors utilisées respectivement à des concentrations finales de 20 et 2 % pendant le protocole d'extraction suite à l'étape de lyse des kystes. Les résultats obtenus avec ces différents traitements sont présentés sur les différentes représentations graphiques de la figure 7.



(A) Station d'épuration de Nancy



(B) Station d'épuration de Metz



(C) Abattoir de Metz

C/D : 5 cycles de congélation-décongélation, 4 min à - 85°C / 4 min à 95°C

Ultrasons : 20 min, 125 W

Chelex-100 et PVP-360 : traitement avec Chelex-100 et PVP-360 (concentrations finales de 20 % et 2 %) suite à l'étape de lyse des kystes.

Figure 7 : Valeurs moyennes (n=3) observées pour le ratio PCR/IFA suite à l'utilisation des cycles de congélation-décongélation, des ultrasons et traitement par Chelex-100 et PVP-360 pour des eaux usées provenant des stations d'épuration de Nancy (A), Metz (B) et de l'abattoir de Metz (C)

Les résultats observés avec ces différents protocoles sont concordants pour les prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy (A) et de l'abattoir de Metz (C). Les valeurs de ratio PCR/IFA les plus élevées sont alors obtenues lors du traitement par ultrasons associés ou non aux cycles de congélation-décongélation mais en l'absence d'utilisation de Chelex-100 et de PVP-360. Par contre, pour le prélèvement de la station d'épuration de Metz (C), les valeurs les plus élevées sont obtenues lorsque le traitement par Chelex-100 et PVP-360 est associé aux traitements physiques par ultrasons et cycles de congélation-décongélation. Suite à ces résultats, il semble difficile de sélectionner un protocole permettant d'optimiser la détection des kystes de *Giardia* par PCR en temps réel à partir de ces prélèvements d'eaux usées. Toutefois, il faut souligner que le traitement par ultrasons semble améliorer la valeur des concentrations obtenues par PCR en temps réel.

3.3- Intérêt d'une séparation diphasique à l'acétate d'éthyle.

Lors de la purification par flottation sur solution de Percoll™-saccharose, nous observons la formation d'une couche importante de débris à l'interface entre l'échantillon à purifier et la solution de densité 1,10 pour les trois types d'eaux usées. Par contre, lorsqu'une étape de séparation FEA précède la flottation pour l'analyse par immunofluorescence, cette accumulation de débris à l'interface est très faible et le volume du culot dans la solution de Percoll™-saccharose est beaucoup plus important. Ainsi, la séparation FEA favorise ensuite l'élimination des débris lors de l'étape de flottation.

Suite à ces observations, une séparation diphasique à l'acétate d'éthyle, destinée à éliminer les composés hydrophobes présents dans les échantillons, basée sur le protocole de la technique FEA, est testée en amont de la flottation sur solution de Percoll™-saccharose. Le formaldéhyde (10 %) n'est pas utilisé lors de cette séparation destinée aux échantillons analysés par PCR car cette molécule est connue pour inhiber ces réactions d'amplification.

Deux prélèvements de chaque site sont purifiés soit par flottation seule soit par une flottation précédée par une séparation diphasique à l'acétate d'éthyle, puis analysés par PCR en temps réel. Le protocole défini auparavant est appliqué pour la numération des kystes par immunofluorescence (séparation FEA et flottation sur solution de Percoll™-saccharose). Les résultats obtenus avec l'ensemble de ces méthodes est reporté sous forme de valeurs moyennes (n=3) de ratio PCR/IFA (tableau 3).

Les valeurs de ratio PCR/IFA sont calculées avec les concentrations en kystes PI positifs, mais aussi en kystes totaux suite aux résultats obtenus pour les eaux usées de la station d'épuration de Metz et surtout de l'abattoir. Concernant le prélèvement P1 de l'abattoir, la valeur élevée du ratio PCR/IFA obtenue avec la concentration en kystes PI positifs peut être expliquée par le très faible pourcentage de kystes PI positifs qui n'est que de 5 %, alors que les pourcentages de kystes PI positifs sont généralement compris entre 60 et 90 % pour ces trois types d'eaux usées.

Il est important de souligner que les valeurs de ratio PCR/IFA sont nettement plus élevées lorsque la purification à l'acétate d'éthyle est appliquée en amont de la flottation pour la totalité des prélèvements analysés. Ainsi, cette méthode de séparation à l'acétate d'éthyle permet d'augmenter de façon notable la concentration en kystes de *Giardia* détectés par PCR en temps réel pour ces trois types d'eaux usées.

Tableau 3 : Impact de la séparation à l'acétate d'éthyle sur la détection par PCR en temps réel des kystes de *Giardia* purifiés par flottation sur solution de Percoll™-saccharose
Les valeurs moyennes (n=3) des ratios PCR/IFA sont calculées avec les concentrations en kystes PI positifs et en kystes totaux par immunofluorescence.

	Ratio PCR/IFA (kystes PI positifs)		Ratio PCR/IFA (kystes totaux)	
Séparation à l'acétate d'éthyle	Non	Oui	Non	Oui
STEP Nancy - P1	0,11	0,62	0,08	0,42
STEP Nancy - P2	0,42	0,61	0,35	0,51
STEP Metz - P1	0,36	2,54	0,24	1,5
STEP Metz - P2	0,73	1,42	0,54	1,05
Abattoir Metz - P1	0[a]	20,5	0[a]	0,51
Abattoir Metz - P2	0[a]	1,97	0[a]	1,06

a : pas de signal observé par PCR en temps réel

En résumé,

La flottation sur solution de Percoll™-saccharose de densité 1,10 est la technique de purification basée sur la densité permettant d'obtenir les concentrations en kystes les plus élevées lors de la détection par PCR en temps réel. Afin d'optimiser ce protocole, différents procédés sont évalués en combinaison avec cette étape de purification. Les ultrasons permettent d'augmenter les valeurs obtenues par PCR pour les trois types d'eaux usées, par contre l'utilisation de molécules destinées à limiter l'effet des inhibiteurs notamment le Chelex-100 et la PVP-360 apportent une amélioration uniquement pour l'eau usée de la station d'épuration de Metz. Lors de l'évaluation d'une séparation diphasique à l'acétate d'éthyle précédant l'étape de flottation, nous observons une nette augmentation des concentrations en kystes de *Giardia* détectés par PCR pour l'ensemble des eaux usées analysées.

4- Evaluation de la séparation immunomagnétique (IMS) pour la détection des kystes de Giardia par immunofluorescence et PCR en temps réel.

Au cours de notre étude, nous avons eu l'opportunité d'évaluer la technique de séparation imunomagnétique avec le kit Dynabeads® GC-Combo de Dynal qui est cité notamment par les normes américaine (Méthode 1623, US-EPA, 2001) et française (NF T90-455, AFNOR, 2001). Cette méthode est alors comparée aux protocoles développés précédemment pour la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence ou par PCR en temps réel.

Ce kit est testé sur des prélèvements d'eaux usées prétraitées des stations de Nancy et de Metz. La turbidité très élevée de l'eau usée de l'abattoir de Metz ne permet pas d'envisager son analyse en faisant appel à cette technique. En effet, la centrifugation de 100 mL d'eau de ce site entraîne la formation d'un culot dont le volume est nettement supérieur à la limite de 500 µL pour 10 mL d'échantillon et l'utilisation d'un volume inférieur à 100 mL ne peut être envisagée pour des raisons de limite de sensibilité.

4.1- Evaluation de l'IMS pour la détection des kystes de Giardia par immunofluorescence.

La procédure associant la concentration par centrifugation et la séparation immunomagnétique est tout d'abord comparée au protocole développé précédemment (centrifugation, séparation FEA, flottation sur solution de Percoll™-saccharose) pour la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence.

4.1.1- Essais d'optimisation du protocole de séparation immunomagnétique.

Deux optimisations sont testées à partir du protocole initial, elles concernent l'augmentation du nombre d'étapes de lavage des complexes billes-kystes et la modification de l'étape finale de dissociation de ces complexes.

Le protocole développé par le fournisseur ne comprend qu'une seule étape de lavage des complexes billes-kystes. Toutefois, ce protocole n'est pas destiné initialement à l'analyse d'échantillons caractérisés par une turbidité élevée. Ainsi, Fontaine et Guillot (2003) et Rimhanen-Finne *et al.* (2002) adaptent ce protocole en réalisant deux à trois étapes de lavage supplémentaires avec du tampon PBS ou du tampon PBS - Tween 20 (0,05 %) lors de l'analyse d'eau potable et d'eau de surface.

Une première expérimentation est réalisée sur un prélèvement d'eau usée de la station d'épuration de Nancy. Deux étapes supplémentaires de lavage des complexes billes-kystes par 5 mL de tampon PBS-Tween 20 (0,05 %) sont intégrées dans le protocole de séparation immunomagnétique. Le protocole initial et le protocole modifié sont comparés sur le prélèvement d'eau usée et seule la méthode incluant les deux lavages des complexes billes-kystes permet de détecter des kystes de *Giardia*. En l'absence de ces deux étapes de lavage, on constate qu'une quantité importante de débris est encore présente lors de l'étape de dissociation des complexes billes-kystes.

Lors de la réalisation du protocole de séparation immunomagnétique, l'étape de dissociation des complexes billes-kystes est réalisée par utilisation d'acide chlorhydrique à la concentration 0,1 M. Le pH est ensuite ramené à neutralité par ajout d'hydroxyde de sodium. Ware *et al.* (2003) suggèrent que des fluctuations du pH pourraient expliquer les variations de rendement observées par d'autres auteurs suite à un défaut de marquage des kystes par immunofluorescence. Lors de leur étude, ils comparent alors la dissociation par action de la chaleur (80°C, 10 minutes) à la dissociation classique par ajout d'acide chlorhydrique sur des échantillons d'eau distillée et d'eau de rivière dopées en oocystes de *Cryptosporidium*. La dissociation par action de la chaleur permet alors d'augmenter le pourcentage de kystes récupérés de 41 à 71 % pour l'eau distillée et de 10 à 51 % pour l'eau de rivière.

Les deux techniques de dissociation des complexes billes - kystes par acidification et par action de la chaleur sont comparées sur deux prélèvements d'eau usée de la station d'épuration de Nancy. Les résultats obtenus par immunofluorescence avec ces deux méthodes de dissociation sont présentés sur la figure 8.

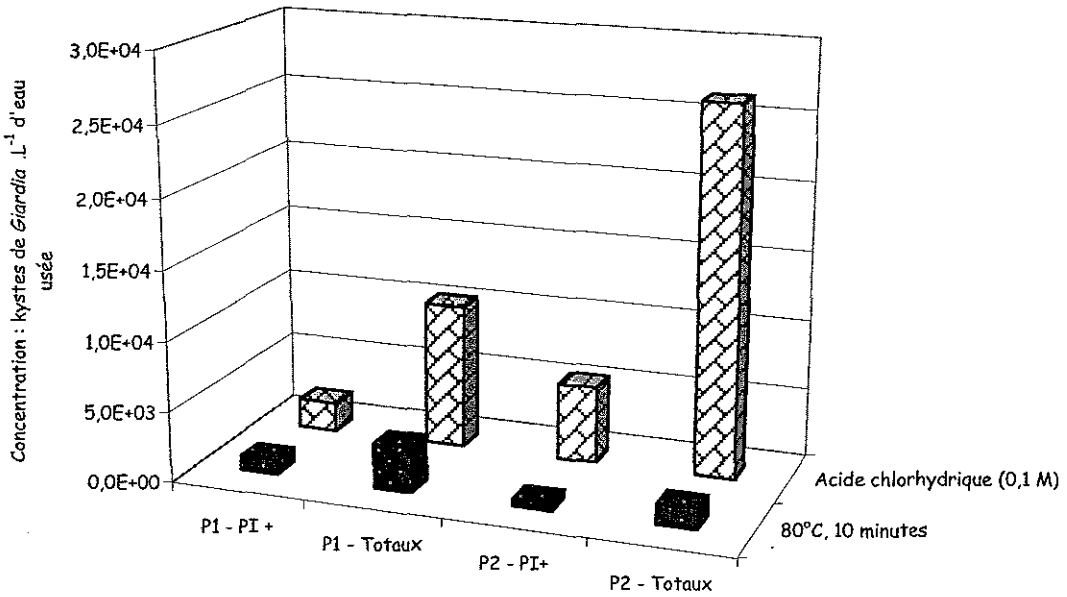


Figure 8 : Concentrations observées en immunofluorescence (kystes PI positifs et kystes totaux.L^{-1}) après purification par séparation immunomagnétique et dissociation des complexes billes-kystes par acidification ou par action de la chaleur pour deux prélèvements (P1 et P2) d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy. PI + : kystes positifs au PI après inactivation par congélation

L'utilisation d'acide chlorhydrique pour la dissociation des complexes billes-kystes de *Giardia* permet d'obtenir des concentrations en kystes PI positifs plus élevées ($2,1.10^3$ et $5,5.10^3$ kystes.L^{-1}) que l'action de la chaleur ($5,8.10^2$ et $1,1.10^3$ kystes.L^{-1}). Cette observation est également valable pour les concentrations totales en kystes de *Giardia* puisque l'acidification aboutit à des concentrations comprises entre $1,1.10^4$ et $2,6.10^4$ kystes.L^{-1} alors que suite au traitement thermique les concentrations s'échelonnent de $3,3.10^3$ à $1,5.10^3$ kystes.L^{-1}.

Au final, la technique de dissociation des complexes proposée par Ware *et al.* (2003) aboutit à des valeurs de concentrations nettement inférieures à celles observées avec le protocole classique de dissociation par acidification qui est conservé pour la suite de ces expérimentations.

4.1.2- Comparaison par immunofluorescence de l'IMS et du protocole développé au laboratoire.

Suite à cette étape d'optimisation de la procédure IMS, la combinaison centrifugation, séparation au FEA et flottation sur solution de Percoll™-saccharose est comparée à la technique associant la centrifugation et l'IMS lors de la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence sur des prélèvements d'eau usée des stations d'épuration de Nancy (n = 5) et de Metz (n = 4). Les concentrations totales en kystes de *Giardia* observées avec ces deux protocoles, sont représentées sur la figure **9**.

Pour les concentrations totales en kystes de *Giardia*, les valeurs sont comprises entre $2,0.10^3$ et $2,6.10^4$ kystes.L^{-1} d'eau usée avec la technique IMS et s'échelonnent entre $8,3.10^2$ et $1,4.10^4$ kystes.L^{-1} d'eau usée pour la procédure combinant séparation FEA et flottation sur solution de Percoll™-saccharose. Pour les neuf prélèvements d'eau usée, les concentrations les plus élevées sont obtenues avec l'IMS. D'après le test de Snedecor (test d'égalité des variances) il est possible de comparer les concentrations totales en kystes de *Giardia* observées suite à la purification par IMS à celles obtenues avec le protocole associant la séparation FEA

à la flottation ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) montre alors que les concentrations totales en kystes obtenues avec l'IMS sont significativement supérieures ($p < 0,05$) à celles observées avec le protocole associant la séparation FEA et la flottation pour une gamme de turbidité comprise entre 56 et 554 NTU.

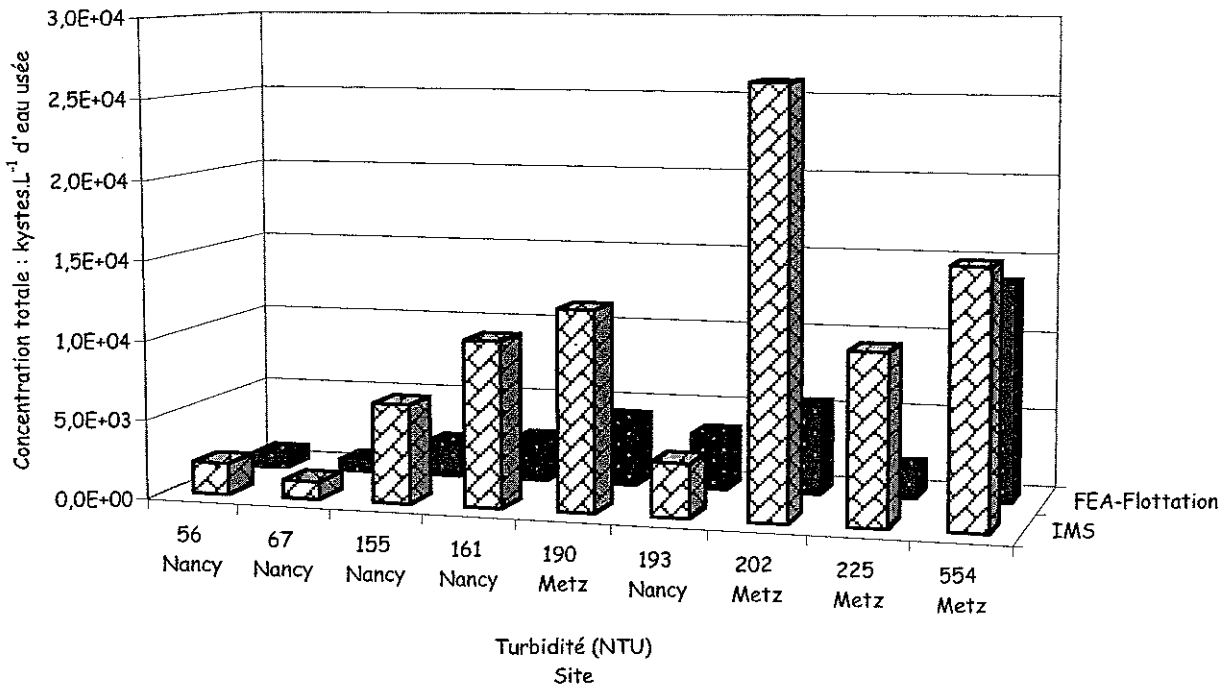


Figure 9 : Concentrations observées en immunofluorescence (kystes totaux.L^{-1}) après purification des concentrats par IMS ou par séparation FEA et flottation sur solution de Percoll™-saccharose en fonction de la turbidité des échantillons d'eau des stations d'épuration de Nancy et de Metz

Les concentrations en kystes de *Giardia* PI positifs obtenues avec les deux procédures (IMS ou séparation FEA et flottation sur solution de Percoll™-saccharose) sont présentées sur la figure **10**.

Pour les mêmes prélèvements que ceux analysés précédemment, les valeurs de concentration en kystes positifs par marquage au PI sont comprises entre $3,2.10^2$ et $5,5.10^3$ kystes.L^{-1} d'eau usée avec la technique IMS et s'échelonnent entre $7,3.10^2$ et $4,7.10^3$ kystes.L^{-1} d'eau usée pour la procédure combinant séparation FEA et flottation sur solution de Percoll™-saccharose. Les concentrations les plus élevées sont obtenues avec la combinaison FEA-flottation pour six prélèvements d'eau usée. D'après le test de Snedecor (test d'égalité des variances), les concentrations en kystes PI positifs obtenues avec ces deux procédures peuvent être comparées ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) montre que les concentrations obtenues avec le protocole combinant la séparation FEA et la flottation ne sont pas significativement différentes de celles observées avec l'IMS pour une gamme de turbidité comprise entre 56 et 554 NTU ($p > 0,05$).

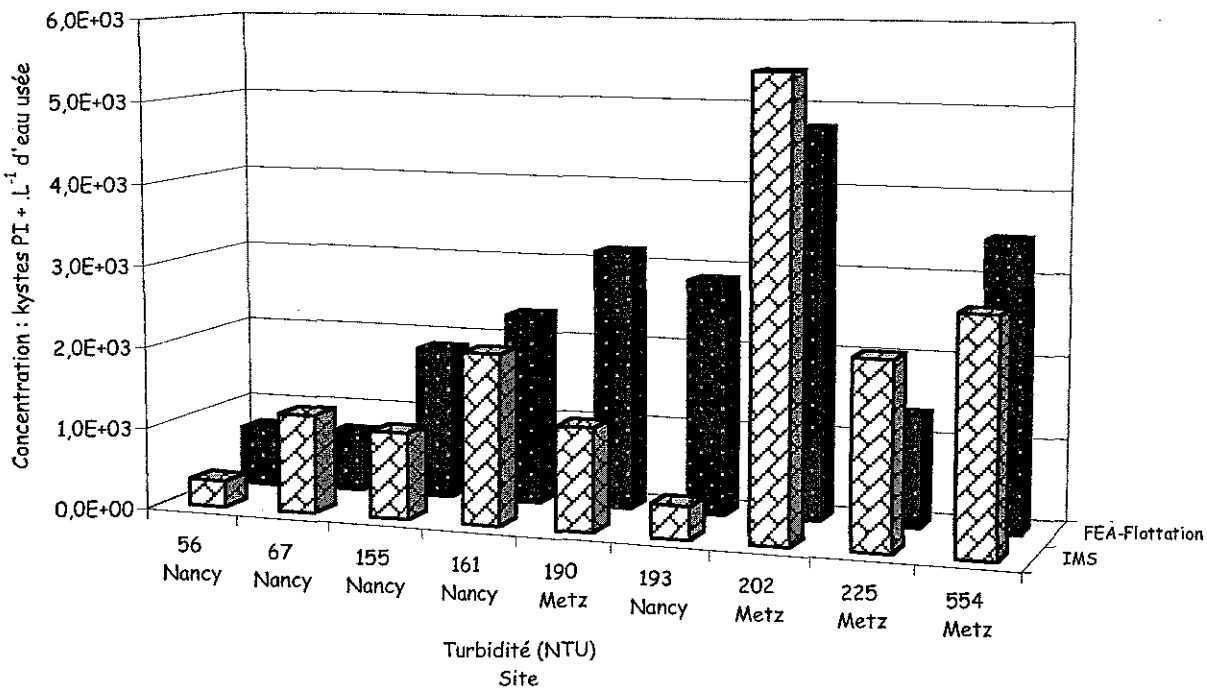


Figure 10 : Concentrations observées en immunofluorescence (kystes PI positifs.L^{-1}) après centrifugation et purification par IMS ou séparation FEA - flottation sur solution de Percoll™-saccharose en fonction de la turbidité des échantillons d'eau des stations d'épuration de Nancy et de Metz

Lors de la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence dans des prélèvements d'eaux usées, la séparation immunomagnétique permet d'obtenir des concentrations totales en kystes qui sont supérieures à celles observées suite à un protocole de purification conventionnel associant une séparation diphasique et une purification par flottation. Pour les concentrations en kystes dont les noyaux sont détectés par marquage au PI, les concentrations obtenues avec l'IMS sont plus faibles que celles observées avec la séparation diphasique associée à la flottation, toutefois cette différence ne peut être considérée comme significative.

Ainsi, l'IMS apparaît comme une technique intéressante pour l'analyse d'échantillons environnementaux présentant une turbidité élevée. Toutefois, nous avons uniquement analysé des échantillons pour lesquels le volume de matière en suspension est inférieur ou égal à la limite de 5 % pour un échantillon de 10 mL après centrifugation, ce qui correspond à la limite recommandée pour l'application de cette technique.

4.2- Evaluation de l'IMS pour la détection des kystes de Giardia par PCR en temps réel.

La séparation immunomagnétique est ensuite comparée à la flottation sur solution de Percoll™-saccharose pour l'analyse par PCR en temps réel de prélèvements d'eaux usées provenant des stations d'épuration de Nancy (n = 4) et de Metz (n = 4). Les résultats obtenus avec ces deux méthodes de purification sont présentés sur la figure **11**.

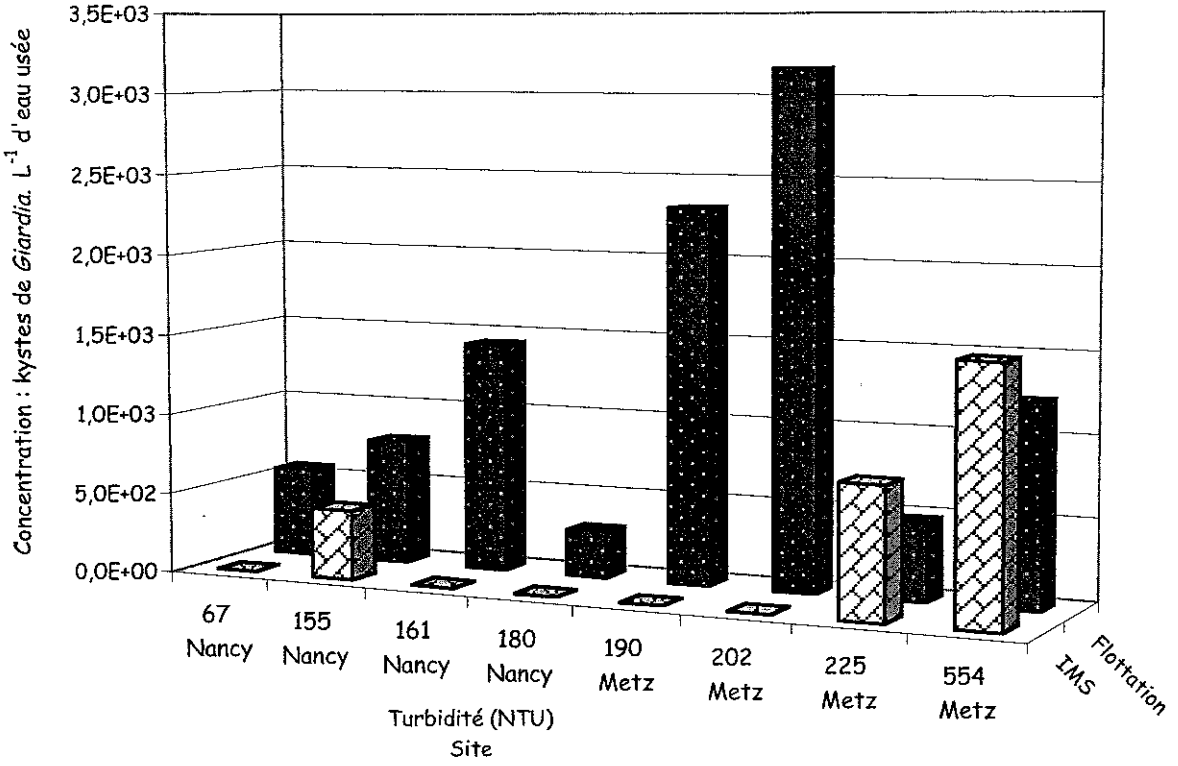


Figure 11 : Concentrations (kystes de *Giardia lamblia*.L^{-1}) obtenues par PCR quantitative après purification par flottation sur solution de Percoll™-saccharose ou IMS en fonction de la turbidité des échantillons d'eau des stations d'épuration de Nancy et de Metz. La valeur 0 correspond à l'absence de courbe d'amplification par PCR.

Les concentrations obtenues par PCR en temps réel sont comprises entre 2,9.10^2 et 3,2.10^3 kystes.L^{-1} après purification par flottation sur solution de Percoll™-saccharose. En revanche, pour les trois échantillons positifs suite à l'IMS, ces concentrations s'échelonnent entre 4,3.10^2 et 1,5.10^3 kystes.L^{-1}. Comme dans le cas d'une détection par immunofluorescence, la turbidité de l'échantillon ne semble pas influencer la récupération des kystes par séparation immunomagnétique.

D'après le test de Snedecor (test d'égalité des variances) réalisé sur ces huit prélèvements, les concentrations observées par PCR en temps réel après flottation sur solution de Percoll™-saccharose peuvent être comparées à celles obtenues après purification par ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) conclut que les concentrations obtenues suite à la purification par IMS sont significativement inférieures à celles obtenues avec le protocole faisant appel à la purification par flottation pour une gamme de turbidité comprise entre 67 et 554 NTU ($p < 0,05$).

En résumé,

Lors de la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence dans des eaux usées, l'IMS se révèle être une technique de purification satisfaisante puisque les concentrations en kystes totaux sont significativement supérieures à celles obtenues suite à une séparation FEA suivie par une flottation sur solution de Percoll™-saccharose. Par contre, lors de la détection des kystes par PCR en temps réel, l'IMS est une technique moins intéressante pour l'analyse de prélèvements d'eaux usées puisque les

concentrations sont significativement inférieures à celles obtenues suite à la flottation. Ces observations concordent avec les concentrations plus faibles en kystes PI positifs observées suite à l'IMS, mais pour ces résultats les différences de concentrations ne peuvent être considérées comme significatives.

Lors de ces expérimentations effectuées sur des prélèvements d'eaux usées prétraitées (dégrillage, dessablage, déshuilage) provenant de deux stations d'épuration et d'un abattoir, nous avons sélectionné deux protocoles de purification permettant la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence et surtout par PCR en temps réel. Ces deux procédures de purification appliquées en amont de la détection par immunofluorescence ou par PCR en temps réel se distinguent au niveau de l'étape de séparation diphasique et sont présentées sur la figure **12**. Nous avons également développé un protocole d'extraction de l'ADN adapté à ces échantillons complexes.

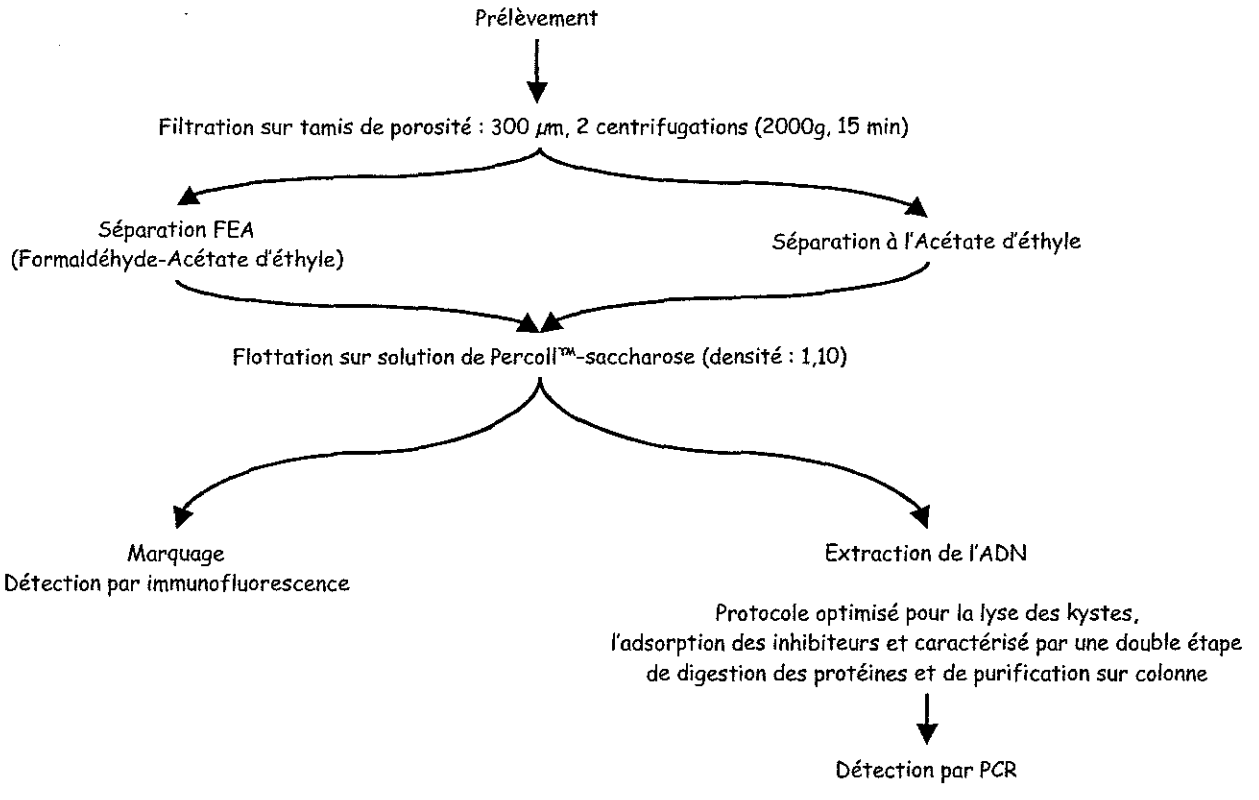


Figure 12 : Schémas des protocoles appliqués pour la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence et PCR dans les eaux usées

Pour la thèse de Isabelle BERTRAND

IL N’Y A PAS DE PAGE 166

Résultats : Chapitre 3

↳ Les kystes de *Giardia lamblia* dans les eaux usées : la PCR comme outil de détection spécifique au niveau de l'espèce et des génotypes

↳ Génotypage de kystes de *Giardia lamblia* isolés de selles humaines

✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣

Lors de la réalisation de cette troisième étape de nos expérimentations, nous utilisons les techniques développées au cours des deux étapes précédentes afin d'analyser des prélèvements d'eaux usées et des échantillons de selles humaines. Ainsi, les systèmes de détection par PCR des kystes de *Giardia lamblia* et de quatre génotypes de cette espèce, développés et validés sur des suspensions purifiées de kystes sont tout d'abord utilisés pour l'analyse d'eaux usées prélevées sur trois sites en faisant appel aux protocoles de concentration et de purification des kystes mis au point dans la deuxième étape de nos travaux. Lors de cette troisième étape, les systèmes de détection développés précédemment vont également nous permettre de réaliser le génotypage de kystes isolés à partir de selles humaines.

1ÈRE PARTIE : Les kystes de *Giardia* dans les eaux usées : détection spécifique de l'espèce *Giardia lamblia* et de ses génotypes par PCR

Les analyses d'eaux usées par immunofluorescence et par PCR sont réalisées sur 12 séries de prélèvements effectués entre mars et juillet 2004 sur trois sites : station d'épuration de Nancy, station d'épuration de Metz et abattoir de Metz caractérisés par l'origine de leur contamination fécale. Ainsi, pour la station d'épuration de Nancy, les prélèvements sont réalisés à l'entrée de la filière urbaine qui ne reçoit pas d'eau usée provenant d'un abattoir. En revanche, l'eau usée prélevée à l'entrée de la station d'épuration de Metz correspond à une contamination urbaine et industrielle. L'abattoir de Metz constitue le troisième site de prélèvement de notre étude, l'eau est alors prélevée avant son acheminement à la station d'épuration. Sur ces trois sites, les eaux sont prétraitées (dégrillage, dessablage, déshuilage) en amont de leur point de prélèvement.

Ces trois sites de prélèvement ont été choisis en fonction de l'origine de leur contamination fécale afin d'évaluer l'excrétion des kystes de *Giardia lamblia* par différents hôtes de ce protozoaire. Une première analyse par PCR en temps réel est effectuée afin d'évaluer le niveau global de la contamination de ces eaux par l'espèce *G. lamblia* et de comparer cette technique de détection à l'immunofluorescence pour des échantillons caractérisés entre autre par des différences importantes au niveau de leur turbidité. L'analyse au niveau de quatre des sept génotypes qui composent cette espèce devrait fournir des données plus précises concernant notamment la présence des génotypes A et B en fonction de l'origine de la contamination fécale. La présence du génotype C devrait signer une contamination due aux animaux domestiques. La détection du génotype E dans ces différents échantillons devrait apporter des renseignements très intéressants vis-à-vis de la spécificité de cet assemblage pour les animaux d'élevage et permettre de comparer la présence des génotypes A, B et E chez ces animaux.

1- Caractéristiques des prélèvements d'eaux usées des trois sites.

Les mesures de pH, de turbidité et l'évaluation de la concentration en coliformes thermotolérants constituent les premières analyses effectuées pour ces 12 séries de prélèvements. Les valeurs obtenues pour ces trois éléments ainsi que les dates de prélèvement des échantillons sont regroupées pour chaque site dans les

tableaux **1** à **3**. Pour les eaux usées provenant de l'abattoir de Metz, les différents types d'animaux correspondant à chaque prélèvement sont également précisés dans le tableau **3**.

Tableau 1 : Valeurs de pH, de turbidité et de concentration en coliformes thermotolérants pour les prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy

Date de prélèvement	Dénomination	pH	Turbidité (NTU)	Coliformes thermotolérants (log UFC.100 mL^{-1})
22-03-2004	N-1	8,20	180	6,66
1-04-2004	N-2	7,40	155	6,74
18-05-2004	N-3	7,96	273	6,68
1-06-2004	N-4	8,20	195	6,64
9-06-2004	N-5	7,93	175	6,65
15-06-2004	N-6	7,53	140	6,61
30-06-2004	N-7	7,33	192	6,81
6-07-2004	N-8	8,19	168	6,77
13-07-2004	N-9	7,90	154	6,75
15-07-2004	N-10	7,89	189	6,73
20-07-2004	N-11	7,78	152	6,30
22-07-2004	N-12	7,82	97	6,30
Valeurs moyennes		7,84 ± 0,30	172,5 ± 41,7	6,64 ± 0,17

Tableau 2 : Valeurs de pH, de turbidité et de concentration en coliformes thermotolérants pour les prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Metz

Date de prélèvement	Dénomination	pH	Turbidité (NTU)	Coliformes thermotolérants (log UFC.100 mL^{-1})
20-04-2004	M-1	8,40	225	6,92
27-04-2004	M-2	8,40	190	6,55
18-05-2004	M-3	8,42	233	6,77
1-06-2004	M-4	7,71	246	6,53
9-06-2004	M-5	7,98	195	6,72
15-06-2004	M-6	8,01	181	6,77
30-06-2004	M-7	7,39	275	6,95
6-07-2004	M-8	7,61	195	6,79
13-07-2004	M-9	8,52	198	6,64
15-07-2004	M-10	7,88	198	6,78
20-07-2004	M-11	7,80	189	6,58
22-07-2004	M-12	7,99	150	6,43
Valeurs moyennes		8,01 ± 0,36	206,3 ± 33,2	6,70 ± 0,16

Tableau 3 : Valeurs de pH, de turbidité et concentration en coliformes thermotolérants pour les prélèvements d'eaux usées de l'abattoir de Metz

Date de prélèvement	Dénomination	pH	Turbidité (NTU)	Coliformes thermotolérants (log UFC.100 mL^{-1})	Animaux
20-04-2004	A-1	6,62	4400	7,01	Bovins
27-04-2004	A-2	6,76	1225	7,08	Bovins, Ovins
18-05-2004	A-3	6,80	4870	6,89	Bovins, Ovins
1-06-2004	A-4	6,99	5890	6,61	Bovins, Ovins, Porcins
9-06-2004	A-5	6,93	2860	7,18	Bovins
15-06-2004	A-6	6,89	1320	7,22	Bovins, Ovins
30-06-2004	A-7	6,76	970	7,34	Bovins, Porcins
6-07-2004	A-8	6,97	3312	7,45	Bovins
13-07-2004	A-9	6,97	3040	6,84	Bovins
15-07-2004	A-10	6,42	7600	6,93	Bovins
20-07-2004	A-11	6,86	2200	7,47	Bovins
22-07-2004	A-12	7,02	1768	7,78	Bovins
Valeurs moyennes		6,83 ± 0,18	3288 ± 2053	7,15 ± 0,32	

D'après le tableau **3**, les bovins apparaissent comme la principale source de contamination fécale de ces eaux usées puisqu'ils sont présents pour la totalité des prélèvements effectués à l'abattoir. Par contre, les porcins et les ovins, moins fréquemment mis en cause, sont reportés respectivement pour deux et quatre prélèvements de cette série d'analyse. Ainsi, l'analyse de ces prélèvements d'eaux usées de l'abattoir nous apportera essentiellement des données concernant la présence de *Giardia lamblia* et de ses génotypes chez les bovins.

1.1- Comparaison des valeurs de turbidité.

Les valeurs de turbidité obtenues pour les trois types d'eaux usées sont reportées sur la figure **1(A)**. Pour l'abattoir, la turbidité des eaux usées est très élevée puisqu'elle varie de 970 à 7600 NTU. Par contre, les eaux usées prélevées dans les deux stations d'épuration présentent une turbidité nettement plus faible. Au vu de l'écart très important entre les eaux usées des stations d'épuration et de l'abattoir, les valeurs mesurées pour les deux stations d'épuration sont également présentées séparément de celles de l'abattoir sur la figure **1(B)**. Ainsi, pour la station d'épuration de Nancy, la turbidité est comprise entre 97 et 273 NTU. Les valeurs de turbidité varient de 150 à 275 NTU pour les eaux usées de la station d'épuration de Metz.

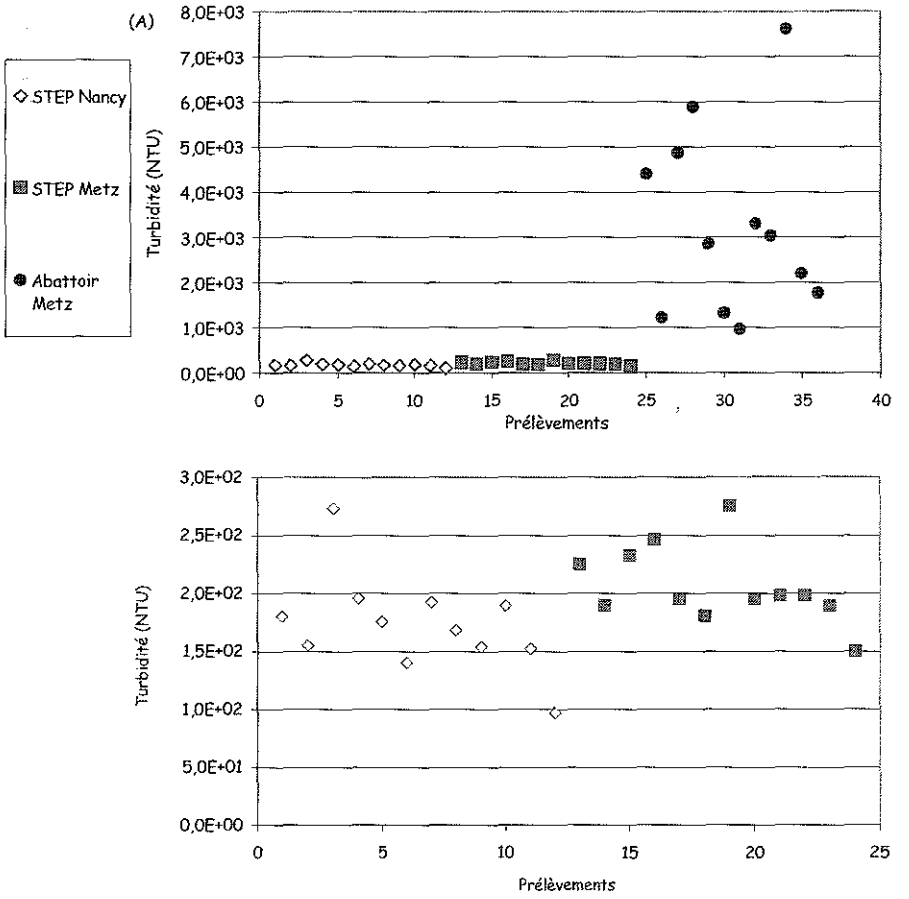


Figure 1 : Représentations graphiques des valeurs de turbidité (NTU) pour les 12 séries d'échantillons d'eaux usées
(A) : stations d'épuration de Nancy et de Metz (STEP Nancy et STEP Metz) et abattoir de Metz
(B) : stations d'épuration de Nancy et de Metz

Le test d'égalité des variances (test de Snedecor) montre que la comparaison des moyennes observées pour les trois sites est réalisable uniquement pour les stations d'épuration. D'après le test de Student (test-t), la turbidité des eaux usées de Nancy est significativement plus faible que celle des prélèvements de Metz ($p < 0,05$).

1.2- Comparaison des valeurs de pH.

Les valeurs de pH observées pour les eaux usées des deux stations d'épuration et de l'abattoir sont présentées sur la figure **2**. Pour les stations d'épuration, le pH des eaux usées est compris entre 7,33 et 8,20 pour le site de Nancy et varie entre 7,39 et 8,52 pour le site de Metz. Pour l'abattoir de Metz, les valeurs de pH apparaissent globalement plus faibles et s'échelonnent entre 6,42 et 7,02.

Le test d'égalité des variances montre que le test de Student (test-t) ne peut pas être utilisé pour la comparaison des moyennes observées pour la station d'épuration et l'abattoir de Metz, mais il peut être utilisé pour les autres comparaisons. Concernant les deux stations d'épuration de Nancy et de Metz, le test de Student ne montre pas que de différence significative des valeurs de pH pour ces deux sites ($p > 0,05$). Par contre, les valeurs de pH des eaux usées de l'abattoir sont significativement plus faibles que celles observées pour la station d'épuration de Nancy ($p < 0,05$).

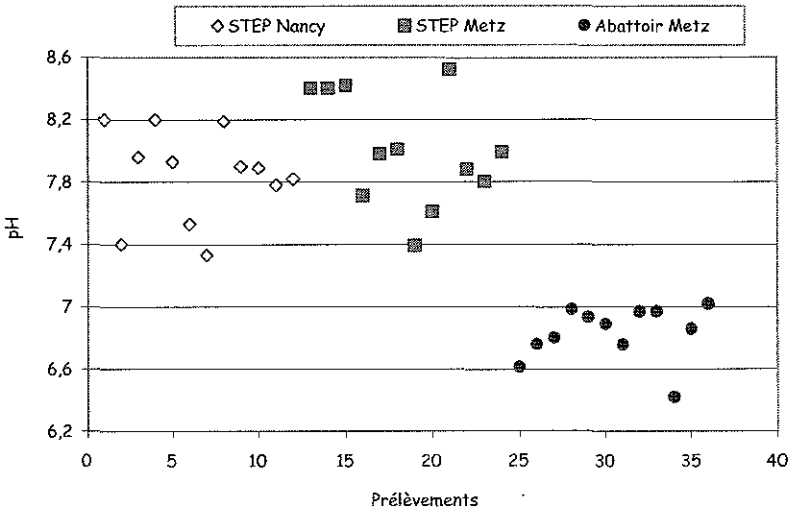


Figure 2 : Représentation graphique des valeurs de pH pour les 12 séries d'échantillons d'eaux usées des deux stations d'épuration (STEP Nancy et STEP Metz) et de l'abattoir de Metz

1.3- Comparaison des concentrations en coliformes thermotolérants.

Les concentrations en coliformes thermotolérants des échantillons d'eaux usées prélevées sur les trois sites sont présentées sur la figure **3**. Concernant les stations d'épuration, les concentrations en coliformes thermotolérants sont comprises entre 6,30 et 6,81 log UFC.100 mL^{-1} pour le site de Nancy et varient entre 6,43 et 6,95 log UFC.100 mL^{-1} pour le site de Metz. Les valeurs observées pour l'abattoir présentent une plus grande variabilité que celles des stations d'épuration et sont comprises entre 6,61 et 7,78 log UFC.100 mL^{-1}.

Le test de Snedecor montre que la comparaison des moyennes observées pour les trois sites ne peut être réalisée que pour les stations d'épuration. D'après le test de Student (test-t), les concentrations en coliformes thermotolérants observées dans les eaux usées de ces deux stations d'épuration ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

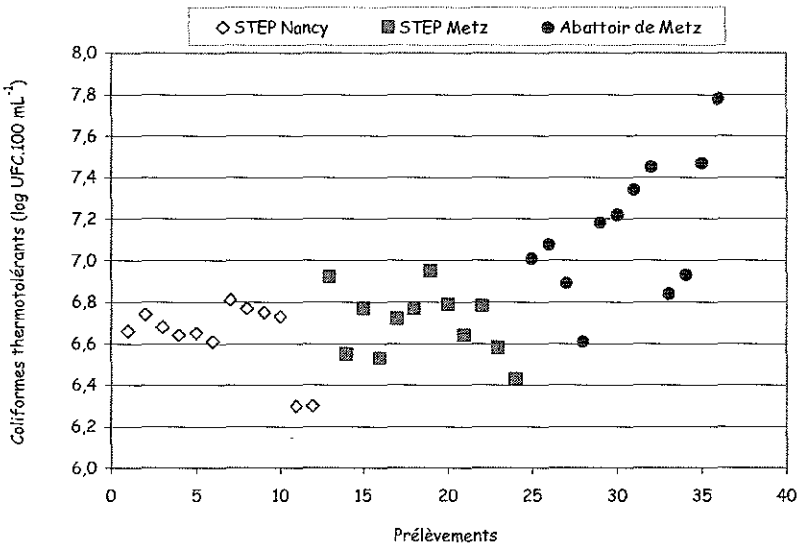


Figure 3 : Représentation graphique des concentrations en coliformes thermotolérants (log UFC.100 mL^{-1}) pour les 12 séries d'échantillons d'eaux usées des deux stations d'épuration (STEP Nancy et STEP Metz) et de l'abattoir de Metz

1.4- Evaluation de la corrélation entre les paramètres physico-chimiques et la concentration en coliformes thermotolérants.

La corrélation entre la concentration en coliformes thermotolérants et les valeurs de turbidité et de pH est évaluée pour chacun des sites de prélèvement. Le tableau **4** présente les valeurs des coefficients de corrélation et des probabilités critiques observées entre ces valeurs avec le test de Spearman.

Tableau 4 : Tests de corrélation (rang de Spearman, r_s) entre la concentration en coliformes thermotolérants et les valeurs de turbidité et de pH

	Turbidité		pH		Site
	r_s	p	r_s	p	
	0,49	0,101	-0,05	0,890	STEP Nancy
Colifomes thermotolérants	0,57	0,054	-0,15	0,640	STEP Metz
	-0,62*	0,029	0,27	0,400	Abattoir Metz

p : probabilité critique / * : significatif au seuil de 5 %

Il apparaît alors que la concentration en coliformes thermotolérants est corrélée négativement à la turbidité ($p < 0,05$) pour les eaux usées de l'abattoir de Metz. En revanche, aucune corrélation n'est montrée entre la concentration en coliformes et les deux paramètres physico-chimiques pour les deux autres sites.

En résumé,

En se basant sur les valeurs de turbidité, de pH et les concentrations en coliformes thermotolérants déterminées pour chaque échantillon d'eau usée, il est possible de distinguer deux

groupes l'un étant constitué par les échantillons des stations d'épuration et l'autre correspondant aux prélèvements effectués à l'abattoir.

En effet, les eaux usées de la station d'épuration de Nancy présentent une turbidité plus faible que celles de Metz, mais leurs valeurs de pH et leurs concentrations en coliformes thermotolérants ne sont pas significativement différentes. En revanche, les échantillons prélevés à la sortie de l'abattoir se distinguent des eaux usées prélevées dans les stations d'épuration notamment sur le site de Nancy pour les trois paramètres mesurés lors de cette étape préliminaire.

2- Concentrations en kystes de Giardia observées par immunofluorescence pour les trois sites.

Suite à cette étape de détermination des valeurs de pH, de turbidité et de concentration en coliformes thermotolérants des 12 séries de prélèvements, les kystes de *Giardia* présents dans les échantillons d'eaux usées sont concentrés par centrifugation puis les deux protocoles de purification destinés à l'analyse des échantillons soit par immunofluorescence, soit par PCR sont réalisés en parallèle.

Les concentrations totales en kystes de *Giardia* et les concentrations en kystes contenant des noyaux visibles par marquage au PI sont déterminées pour chaque échantillon d'eau usée. La durée d'observation microscopique d'un échantillon varie suivant sa turbidité et nécessite généralement entre trois et sept heures pour des prélèvements provenant respectivement de la station d'épuration de Nancy ou de l'abattoir de Metz. Les concentrations en kystes totaux et en kystes PI positifs sont alors comparées entre chaque site. La recherche de corrélations entre ces valeurs obtenues par immunofluorescence et les valeurs de pH, de turbidité et de concentrations en coliformes thermotolérants est également réalisée.

2.1- Concentrations totales en kystes de Giardia.

Les concentrations totales en kystes de *Giardia* relevées pour les 12 séries de prélèvements effectués sur les trois sites sont présentées dans le tableau **5**.

Tableau 5 : Concentrations totales en kystes de *Giardia* (kystes.L^{-1}) observées par immunofluorescence dans les eaux usées provenant des stations d'épuration de Nancy et de Metz, et de l'abattoir de Metz

Site					
STEP de Nancy		STEP de Metz		Abattoir de Metz	
Prélèvement	Concentration	Prélèvement	Concentration	Prélèvement	Concentration
N-1	$3,6.10^3$	M-1	$2,0.10^3$	A-1	$2,4.10^3$
N-2	$2,3.10^3$	M-2	$4,3.10^3$	A-2	$1,2.10^3$
N-3	$2,0.10^3$	M-3	$4,3.10^3$	A-3	$6,9.10^3$
N-4	$1,5.10^3$	M-4	$3,8.10^3$	A-4	$4,7.10^3$
N-5	$4,5.10^3$	M-5	$1,1.10^4$	A-5	$3,2.10^3$
N-6	$3,2.10^3$	M-6	$6,8.10^3$	A-6	$1,2.10^3$
N-7	$2,9.10^3$	M-7	$9,0.10^3$	A-7	$4,1.10^3$
N-8	$2,8.10^3$	M-8	$2,8.10^3$	A-8	$3,5.10^3$
N-9	$1,4.10^3$	M-9	$4,6.10^3$	A-9	$3,5.10^3$
N-10	$2,8.10^3$	M-10	$2,6.10^3$	A-10	$2,5.10^3$
N-11	$1,4.10^3$	M-11	$1,1.10^3$	A-11	$2,5.10^3$
N-12	$5,3.10^2$	M-12	$1,9.10^3$	A-12	$2,7.10^3$
Moyenne ± écart-type					
$2,4.10^3 \pm 1,1.10^3$		$4,5.10^3 \pm 2,9.10^3$		$3,2.10^3 \pm 1,5.10^3$	

Les concentrations observées pour les eaux usées de la station d'épuration de Nancy sont comprises entre $5,3.10^2$ (N-12) et $4,5.10^3$ (N-5) kystes.L^{-1}. Pour la station d'épuration de Metz, les valeurs s'échelonnent entre $1,1.10^3$ (M-11) et $1,1.10^4$ (M-5) kystes.L^{-1} d'eau usée. Les concentrations totales en kystes de *Giardia* varient de $1,2.10^3$ (A-2) à $6,9.10^3$ (A-3) kystes.L^{-1} d'eau usée pour les prélèvements de l'abattoir de Metz.

D'après le test de Snedecor (test d'égalité des variances) réalisé pour ces trois séries de valeurs, la comparaison des moyennes observées est réalisable uniquement pour la station d'épuration de Nancy et l'abattoir de Metz au risque de 5 %. Par contre, d'après ce test, les valeurs moyennes obtenues pour les deux sites de Metz peuvent être comparées au risque de 1 %. Le test de Student (test-t) réalisé pour la station d'épuration de Nancy et l'abattoir de Metz ou pour les deux sites de Metz ne montrent pas de différence significative des concentrations totales en kystes de *Giardia* ($p > 0,05$).

2.2- Concentrations en kystes de Giardia positifs après marquage au PI.

2.2.1- Comparaison des concentrations en kystes PI positifs entre les différents sites.

Les concentrations en kystes de *Giardia* dont les noyaux sont mis en évidence par marquage au PI pour les 12 séries de prélèvements effectués sur les trois sites sont présentées dans le tableau **6**.

Tableau 6 : Concentrations en kystes de *Giardia* PI positifs (kystes.L^{-1}) observées par immunofluorescence dans les eaux usées provenant des stations d'épuration de Nancy et de Metz, et de l'abattoir de Metz

Site					
STEP de Nancy		STEP de Metz		Abattoir de Metz	
Prélèvement	Concentration	Prélèvement	Concentration	Prélèvement	Concentration
N-1	$2,6.10^3$	M-1	$1,4.10^3$	A-1	$6,0.10^1$
N-2	$1,9.10^3$	M-2	$3,2.10^3$	A-2	$6,5.10^2$
N-3	$1,1.10^3$	M-3	$9,8.10^2$	A-3	$1,8.10^3$
N-4	$9,7.10^2$	M-4	$2,1.10^3$	A-4	$3,0.10^2$
N-5	$3,2.10^3$	M-5	$7,6.10^3$	A-5	$2,0.10^3$
N-6	$2,2.10^3$	M-6	$5,5.10^3$	A-6	$7,0.10^2$
N-7	$2,2.10^3$	M-7	$7,1.10^3$	A-7	$3,4.10^3$
N-8	$2,0.10^3$	M-8	$2,1.10^3$	A-8	$1,8.10^3$
N-9	$1,1.10^3$	M-9	$3,3.10^3$	A-9	$2,3.10^3$
N-10	$2,3.10^3$	M-10	$2,1.10^3$	A-10	$1,4.10^3$
N-11	$9,3.10^2$	M-11	$9,6.10^2$	A-11	$1,9.10^3$
N-12	$3,7.10^2$	M-12	$1,6.10^3$	A-12	$2,2.10^3$
Moyenne ± écart-type					
$1,7.10^3 \pm 8,3.10^2$		$3,1.10^3 \pm 2,3.10^3$		$1,5.10^3 \pm 9,6.10^2$	

Les concentrations observées pour les eaux usées de la station d'épuration de Nancy sont comprises entre $3,7.10^2$ (N-12) et $3,2.10^3$ (N-5) kystes.L^{-1}. Pour la station d'épuration de Metz, les valeurs apparaissent globalement plus élevées et s'échelonnent entre $9,6.10^2$ (M-11) et $7,6.10^3$ (M-5) kystes.L^{-1} d'eau usée. Les concentrations en kystes positifs après marquage au PI pour les prélèvements de l'abattoir de Metz sont proches de celles de la station d'épuration de Nancy et varient de $6,0.10^1$ (A-1) à $3,4.10^3$ (A-7) kystes.L^{-1} d'eau usée.

D'après le test de Snedecor (test d'égalité des variances) réalisé pour ces trois séries de valeurs, la comparaison des moyennes observées est réalisable uniquement entre la station d'épuration de Nancy et l'abattoir de Metz ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) ne montre pas de différence significative pour la concentration en kystes présentant des noyaux visibles au PI pour ces deux sites ($p > 0,05$).

2.2.2- Comparaison entre les concentrations totales et les concentrations en kystes PI positifs.

D'après le test de Snedecor, les concentrations totales et les concentrations en kystes positifs suite à un marquage au PI peuvent être comparées pour chacun des sites ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) conclut alors qu'il n'existe pas de différence significative entre ces concentrations au niveau des deux stations d'épuration ($p > 0,05$). En revanche, les concentrations en kystes dont les noyaux sont visibles par marquage au PI sont significativement plus faibles que les concentrations totales en kystes de *Giardia* pour les prélèvements d'eaux usées de l'abattoir ($p < 0,05$).

2.3- Evaluation des corrélations entre les concentrations en kystes et les caractéristiques des prélèvements d'eaux usées.

La mise en évidence de corrélations entre la concentration totale en kystes ou la concentration en kystes positifs par marquage au PI et les valeurs de pH, de turbidité et de concentration en coliformes thermotolérants est effectuée pour chacun des sites de prélèvement. Le tableau 7 présente les valeurs des coefficients de corrélation et des probabilités critiques obtenues pour ces différentes caractéristiques avec le test de Spearman. Au vu des résultats de ce test, aucune corrélation n'est montrée entre les concentrations en kystes de *Giardia* observées par immunofluorescence et les valeurs de ces différents paramètres pour ces trois sites.

Tableau 7 : Tests de corrélation (rang de Spearman, r_s) entre les concentrations en kystes observées par immunofluorescence et les valeurs de turbidité, de pH et de concentration en coliformes thermotolérants (p : probabilité critique)

	Turbidité		pH		Coliformes thermotolérants		Site
	r_s	p	r_s	p	r_s	p	
Concentrations totales en kystes	0,25	0,3427	-0,006	0,984	0,52	0,082	**STEP Nancy**
	0,32	0,313	-0,18	0,562	0,35	0,268	**STEP Metz**
	0,38	0,222	0,17	0,594	-0,34	0,285	**Abattoir Metz**
Concentrations en kystes PI positifs	0,14	0,650	-0,06	0,845	0,54	0,071	**STEP Nancy**
	0,20	0,534	-0,29	0,358	0,33	0,281	**STEP Metz**
	-0,36	0,253	0,21	0,521	0,46	0,130	**Abattoir Metz**

En résumé,

Globalement, nous n'observons pas de différence significative au niveau des concentrations totales en kystes de *Giardia* entre les prélèvements des stations d'épuration et ceux de l'abattoir. Concernant les concentrations en kystes dont les noyaux ont pu être mis en évidence, les valeurs de la station d'épuration de Nancy et de l'abattoir de Metz ne montrent pas de différence significative. Par contre, les concentrations obtenues pour la station d'épuration de Metz semblent plus élevées, mais il n'a pas été possible de valider cette observation de façon statistique.

Au niveau de l'analyse par site, les concentrations en kystes dont les noyaux sont visibles par marquage au PI ne sont pas significativement différentes des concentrations totales pour les stations d'épuration de Nancy et de Metz. Par contre, les concentrations en kystes dont les noyaux sont visibles par marquage au PI sont significativement plus faibles que les concentrations totales en kystes pour les eaux usées de l'abattoir. Enfin, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre ces différentes concentrations en kystes et les valeurs de pH, de turbidité et de concentration en coliformes thermotolérants pour ces trois sites.

3- Concentrations en kystes de Giardia lamblia observées par PCR en temps réel pour les trois sites.

La concentration en kystes de *Giardia lamblia* dans ces prélèvements d'eaux usées est déterminée par PCR en temps réel en parallèle de l'analyse par immunofluorescence. Contrairement à l'immunofluorescence, la PCR en temps réel permet d'obtenir une détection spécifique d'espèce et d'analyser de façon rapide et simultanée jusqu'à 30 échantillons en triplicat.

3.1- Comparaison des concentrations en kystes de Giardia lamblia pour les trois sites.

Les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* observées par PCR en temps réel pour les 12 séries de prélèvements effectués sur les trois sites sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Concentrations en kystes de *Giardia lamblia* (kystes.L^{-1}) observées par PCR en temps réel (n = 3) dans les eaux usées provenant des stations d'épuration de Nancy et de Metz, et de l'abattoir de Metz

Site					
STEP de Nancy		STEP de Metz		Abattoir de Metz	
Prélèvement	Concentration	Prélèvement	Concentration	Prélèvement	Concentration
N-1	$1,5.10^3$	M-1	$3,0.10^3$	A-1	$1,2.10^3$
N-2	$1,2.10^3$	M-2	$4,5.10^3$	A-2	$1,3.10^3$
N-3	$1,9.10^3$	M-3	$2,4.10^3$	A-3	$1,1.10^3$
N-4	$7,3.10^2$	M-4	$1,6.10^3$	A-4	$1,6.10^3$
N-5	$7,4.10^2$	M-5	$3,8.10^3$	A-5	$1,6.10^3$
N-6	$1,3.10^3$	M-6	$2,4.10^3$	A-6	$2,6.10^2$
N-7	$2,3.10^3$	M-7	$4,2.10^3$	A-7	$1,1.10^3$
N-8	$3,4.10^2$	M-8	$3,9.10^3$	A-8	$1,8.10^3$
N-9	$6,3.10^2$	M-9	$3,2.10^3$	A-9	$1,1.10^3$
N-10	$1,3.10^3$	M-10	$4,6.10^3$	A-10	$1,2.10^3$
N-11	$3,2.10^2$	M-11	$1,5.10^3$	A-11	$3,4.10^3$
N-12	X	M-12	$3,2.10^3$	A-12	$1,7.10^3$
Moyenne ± écart-type					
$1,0.10^3 \pm 6,9.10^2$ (a) $1,0.10^3 \pm 6,7.10^2$ (b)		$3,2.10^3 \pm 1,1.10^3$		$1,5.10^3 \pm 7,3.10^2$	

X : pas d'émission de fluorescence / (a) : moyenne obtenue en considérant l'échantillon N-12 comme négatif / (b) : moyenne obtenue en considérant l'échantillon N-12 au seuil de détection ($1,8.10^2$ kystes.L^{-1})

Pour la station d'épuration de Nancy, les concentrations observées pour les 11 échantillons positifs par PCR sont comprises entre $3,2.10^2$ (N-11) et $2,3.10^3$ (N-7) kystes.L^{-1}. Les concentrations sont plus élevées et s'échelonnent entre $1,5.10^3$ (M-11) et $4,6.10^3$ (M-10) kystes.L^{-1} d'eau usée pour la station d'épuration de Metz. Pour les prélèvements de l'abattoir de Metz, les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* varient de $2,6.10^2$ (A-6) à $3,4.10^3$ (A-11) kystes.L^{-1}.

D'après le test de Snedecor (test d'égalité des variances), la comparaison des moyennes est réalisable pour l'ensemble des données. Concernant la comparaison des variances des deux stations d'épuration ou de l'abattoir de Metz et de la station d'épuration de Nancy, ces variances ne sont pas significativement différentes au risque de 5 %. Par contre, le test de Snedecor ne montre pas de différence significative entre la station d'épuration et l'abattoir de Metz pour un risque de 1 %.

D'après le test de Student (test-t), les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* de la station d'épuration de Nancy et de l'abattoir ne diffèrent pas de façon significative ($p > 0,05$). Par contre, les

concentrations en kystes des eaux usées de la station d'épuration de Metz apparaissent comme significativement plus élevées que celles de la station de Nancy ou de l'abattoir de Metz.

3.2- Comparaison des concentrations en kystes en fonction de la méthode de détection.

Suite à cette première série d'analyse, nous comparons les valeurs de concentrations obtenues par PCR en temps réel (PCRq-*lamblia*) et par immunofluorescence (kystes totaux et kystes positifs par marquage au PI) pour chacun des sites.

3.2.1- Comparaison des concentrations en kystes pour la station d'épuration de Nancy.

Les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* obtenues avec la PCRq-*lamblia*, ainsi que les concentrations totales en kystes de *Giardia* et en kystes PI positifs observées par immunofluorescence sont représentées sur la figure **4** pour les 12 prélèvements de la station d'épuration de Nancy.

Le test d'égalité des variances (test de Snedecor) montre que la valeur moyenne obtenue avec la PCRq-*lamblia* peut être comparée avec les moyennes obtenues par immunofluorescence ($p > 0,05$). D'après le test de Student (test-t), les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* détectées par PCR sont significativement plus faibles que les concentrations observées par immunofluorescence (concentrations totales et concentrations en kystes PI positifs) pour les eaux usées de Nancy ($p < 0,05$). Le test de Spearman ne montre pas de corrélation entre les concentrations observées par PCR en temps réel et celles obtenues par immunofluorescence ($p > 0,05$).

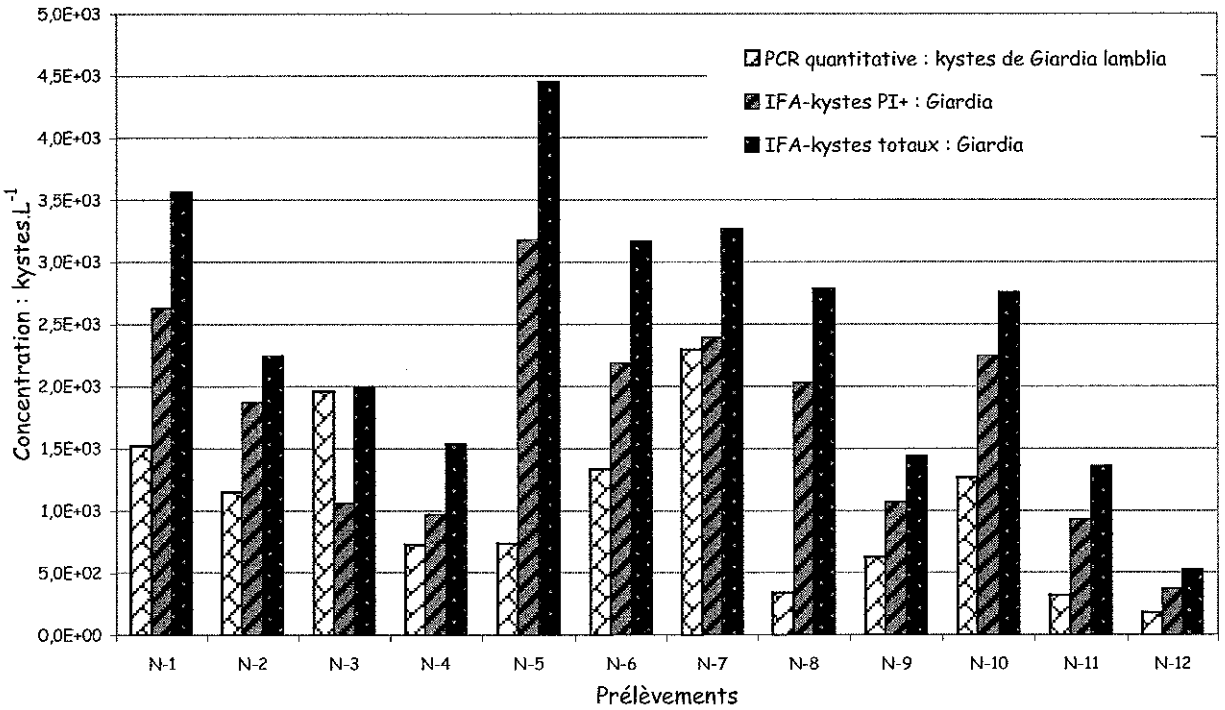


Figure 4 : Concentrations en kystes de *Giardia* (kystes.L^{-1}) observées par immunofluorescence (kystes totaux, kystes PI positifs) et en kystes de *Giardia lamblia* obtenues par PCR en temps réel pour les 12 prélèvements de la station d'épuration de Nancy

3.2.2- Comparaison des concentrations en kystes pour la station d'épuration de Metz.

Les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* obtenues avec la PCRq-*lamblia*, ainsi que les concentrations totales en kystes de *Giardia* et en kystes PI positifs observées par détection microscopique sont représentées sur la figure **5** pour les 12 prélèvements de la station d'épuration de Metz.

Suite aux valeurs élevées des coefficients de variation des concentrations en kystes observées par immunofluorescence, le test d'égalité des variances (test de Snedecor) conclut qu'il n'est pas possible de comparer les valeurs moyennes obtenues par PCR en temps réel avec celles observées par immunofluorescence ($p < 0,05$). De plus, le test de Spearman ne montre pas de corrélation entre les concentrations observées par PCR en temps réel et celles obtenues par immunofluorescence ($p > 0,05$).

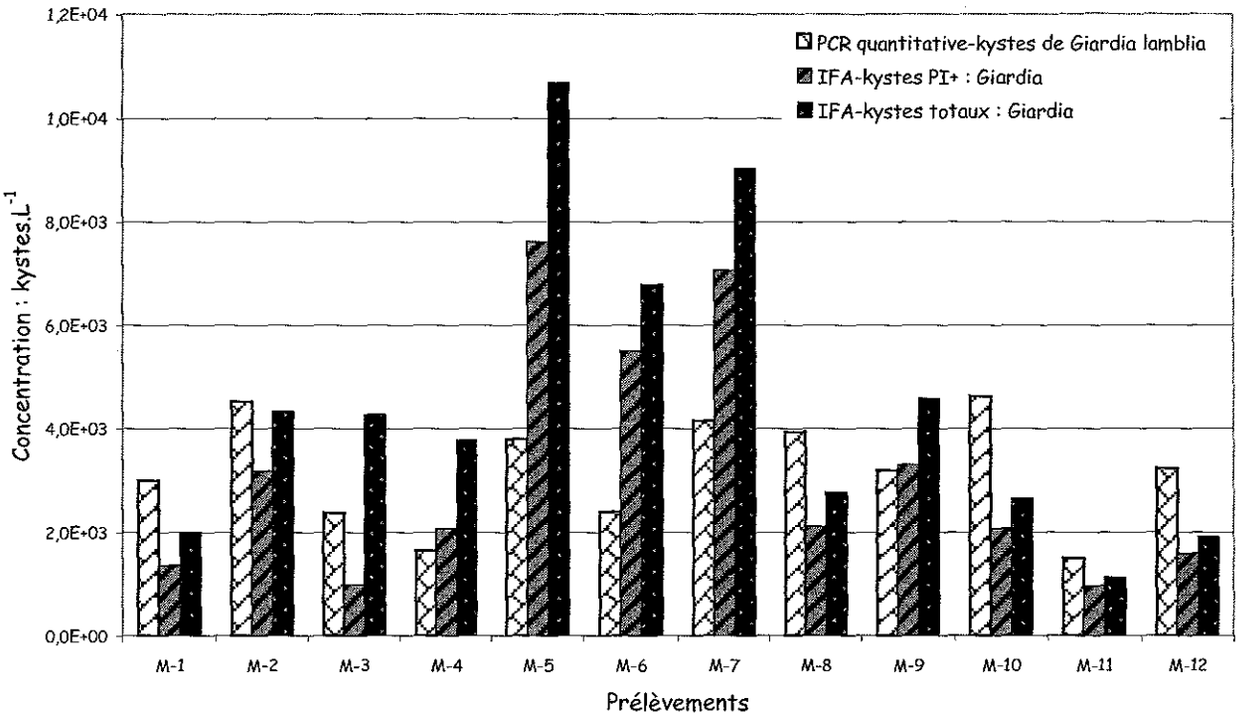


Figure 5 : Concentrations en kystes de *Giardia* (kystes.L^{-1}) observées par immunofluorescence (kystes totaux, kystes PI positifs) et en kystes de *Giardia lamblia* obtenues par PCR en temps réel pour les 12 prélèvements de la station d'épuration de Metz

3.2.3- Comparaison des concentrations en kystes pour l'abattoir de Metz.

Les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* obtenues avec la PCRq-*lamblia*, ainsi que les concentrations totales en kystes de *Giardia* et en kystes positifs par marquage au PI, pour les 12 prélèvements de l'abattoir de Metz, sont représentées sur la figure **6**.

D'après le test d'égalité des variances (test de Snedecor), la comparaison des moyennes observées est réalisable uniquement pour les concentrations obtenues avec la PCRq-*lamblia* et les concentrations en kystes PI positifs ($p > 0,05$). Le test de Student (test-t) ne montre pas de différence significative entre les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* détectées par PCR en temps réel et les concentrations en kystes de *Giardia* positifs par marquage au PI ($p > 0,05$). Le test de Spearman ne montre pas de corrélation entre les concentrations observées par PCR en temps réel et celles obtenues par immunofluorescence ($p > 0,05$).

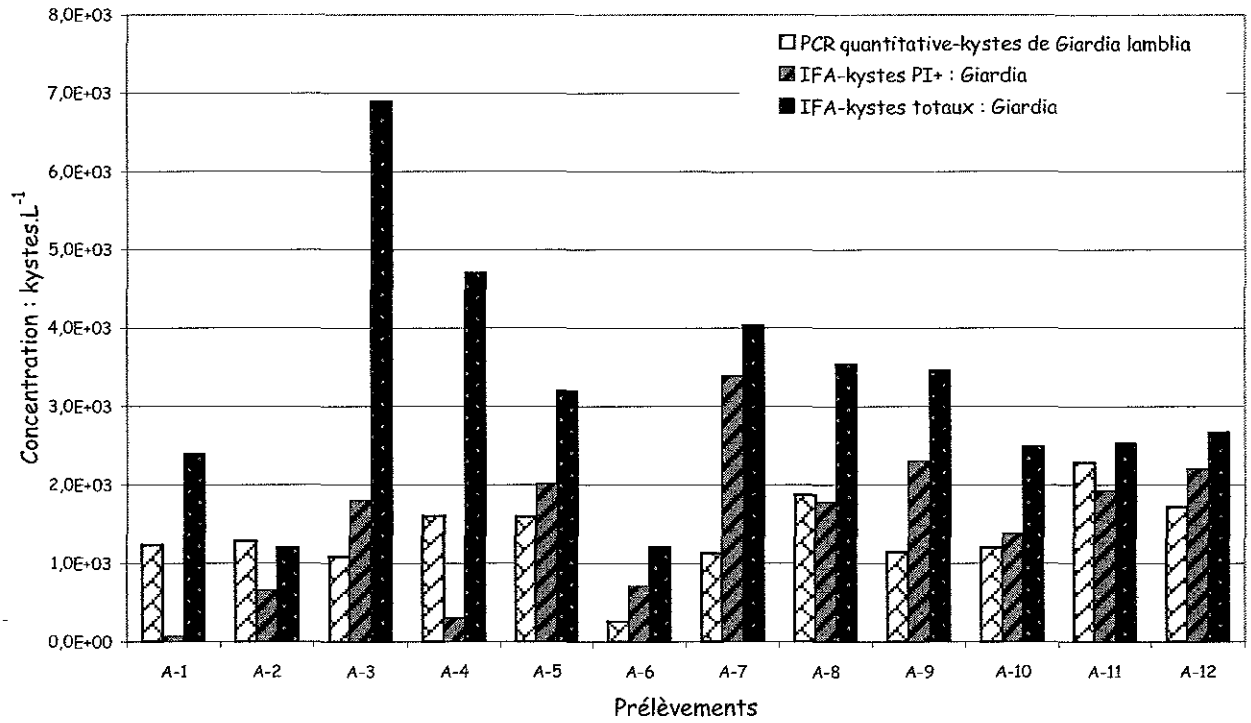


Figure 6 : Concentrations en kystes de *Giardia* (kystes.L^{-1}) observées par immunofluorescence (kystes totaux, kystes PI positifs) et en kystes de *Giardia lamblia* obtenues par PCR en temps réel pour les 12 prélèvements de l'abattoir de Metz

En résumé,

Les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* détectées avec la PCRq-*lamblia* sont équivalentes pour la station d'épuration de Nancy et l'abattoir de Metz. En revanche, les concentrations en kystes de cette espèce dans les eaux usées de la station d'épuration de Metz s'avèrent significativement plus élevées que celles des deux autres sites.

Les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* observées avec la PCRq-*lamblia* sont inférieures à l'ensemble des concentrations (kystes totaux et kystes PI positifs) relevées par immunofluorescence pour les prélèvements de la station d'épuration de Nancy.

Pour les prélèvements de la station d'épuration de Metz, les moyennes des concentrations obtenues avec la PCRq-*lamblia* et par immunofluorescence semblent très proches mais le test de comparaison des moyennes n'a pas pu être réalisé pour ces échantillons.

Concernant les échantillons de l'abattoir, les concentrations totales en kystes observées par immunofluorescence n'ont pu être comparées aux valeurs obtenues par PCR mais sont significativement supérieures aux concentrations en kystes PI positifs. Les concentrations relevées avec la PCRq-*lamblia* ne sont pas significativement différentes des concentrations en kystes PI positifs.

4- Détection de quatre génotypes de Giardia lamblia par PCR en temps réel et PCR qualitative.

Suite à la détection des kystes de *Giardia* avec la PCRq-*lamblia* dans les 12 séries d'échantillons d'eaux usées, une analyse plus précise est réalisée en détectant quatre assemblages de l'espèce *Giardia lamblia*. Ainsi, les génotypes C et E sont mis en évidence par PCR qualitative et nous faisons appel à la PCR en temps réel pour détecter les génotypes A et B.

4.1- Détection du génotype C.

Jusqu'à présent, le génotype C de *Giardia lamblia* a été isolé majoritairement chez les chiens, mais aussi dans un isolat félin lors d'une étude réalisée par Read *et al.* (2004). Il ne nous a pas été possible d'obtenir des suspensions purifiées de kystes appartenant à ce génotype, nécessaires à la réalisation d'une gamme étalon lors de la quantification par PCR en temps réel. Ainsi, le génotype C est détecté par PCR qualitative pour les séries de 12 prélèvements provenant des trois sites.

Chaque prélèvement est analysé par PCR qualitative en triplicat et aucune amplification n'est observée quelque soit l'origine de l'échantillon. De plus, la réalisation d'une double PCR (n = 1) en utilisant les mêmes amorces sens et antisens pour les deux étapes d'amplification, ne permet pas d'obtenir un signal pour les trois séries de prélèvements. Toutefois, aucun témoin positif d'amplification n'a pu être utilisé lors de cette détection. Ainsi, lors de nos expérimentations, les kystes de *G. lamblia* appartenant au génotype C ne sont pas détectés dans les échantillons de l'abattoir de Metz et des deux stations d'épuration de Nancy et de Metz.

4.2- Détection du génotype E.

Le génotype E de *Giardia lamblia* est actuellement considéré comme étant spécifique au bétail (bovins, ovins, porcins...). Comme dans le cas du génotype C, nous ne disposons pas de kystes en suspensions purifiées appartenant à ce génotype. Lors de notre étude, la mise en évidence du génotype E est réalisée par PCR qualitative pour les 12 séries de prélèvements issus des trois sites.

4.2.1- Résultats de la détection du génotype E par PCR qualitative.

Pour les eaux usées des stations d'épuration de Nancy et de Metz, la détection du fragment est réalisée en triplicat. Pour les 12 prélèvements réalisés à l'abattoir de Metz, la détection est réalisée quatre fois séparément pour chaque échantillon. Les résultats obtenus pour chaque amplification sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats obtenus lors de la détection des kystes de *Giardia lamblia*, génotype E dans les prélèvements d'eaux usées des stations d'épuration (STEP) de Nancy (n = 3) et de Metz (n = 3), et de l'abattoir de Metz (n = 4)

STEP de Nancy	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9	N-10	N-11	N-12
Résultats (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STEP de Metz	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6	M-7	M-8	M-9	M-10	M-11	M-12
Résultats (n = 3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abattoir de Metz	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10	A-11	A-12
Résultats (n = 4) n°1	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
n°2	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
n°3	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
n°4	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Pour les eaux usées prélevées dans les stations d'épuration de Nancy et de Metz, aucun signal n'est observé pour l'ensemble des prélèvements par PCR simple. Comme dans le cas de la détection du génotype C, une double PCR est testée sur ces 24 échantillons, mais celle-ci s'avère également négative dans la totalité des cas. Contrairement à la station d'épuration de Nancy qui reçoit uniquement des eaux usées domestiques, la station d'épuration de Metz reçoit des eaux usées domestiques ainsi que la totalité des eaux usées de l'abattoir. Le génotype E n'est détecté dans aucun des 12 prélèvements effectués dans cette station d'épuration. Toutefois ces eaux usées constituent moins de 1 % du volume total des eaux usées traitées par la station d'épuration de Metz.

Par contre, lors de l'application de cette PCR sur les 12 échantillons d'eaux usées de l'abattoir, les résultats sont très différents de ceux obtenus pour les deux stations d'épuration. En effet, un signal est obtenu pour 11 échantillons (91,6 %) avec au minimum deux amplifications positives et quatre prélèvements (A-2, A-9, A-11 et A-12) s'avèrent positifs pour la totalité des amplifications. Seul l'échantillon A-6 ne permet pas d'obtenir un signal correspondant au génotype E de l'espèce *G. lamblia* par PCR simple. La réalisation d'une double amplification sur cet échantillon (n = 2) aboutit également à un résultat négatif.

D'après le système PCR développé lors de notre étude, 91,6 % des 12 prélèvements d'eaux usées de l'abattoir de Metz contiennent des kystes de *Giardia lamblia* appartenant au génotype E considéré comme spécifique au bétail. La figure **7** correspond à la photographie du gel d'électrophorèse obtenu suite à la première amplification pour laquelle neuf échantillons (75 %) sont positifs pour ce génotype E.

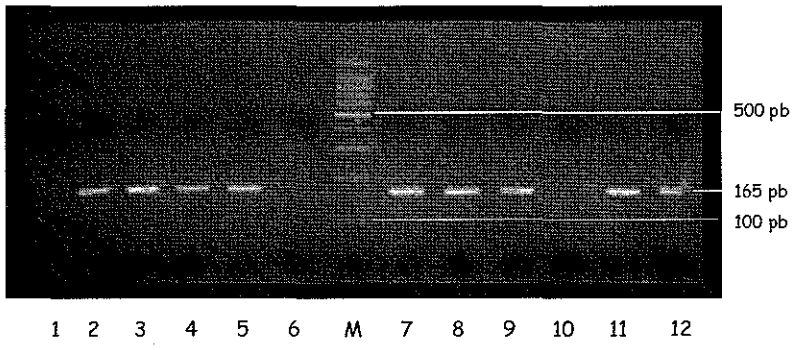


Figure 7 : Photographie de gel d'électrophorèse après la PCR n°1 (tableau 9) lors de la détection de kystes de *G. lamblia*, génotype E dans les 12 prélèvements d'eau usée de l'abattoir de Metz

4.2.2- Confirmation du génotype par séquençage.

Suite à l'obtention de 11 prélèvements positifs avec le système PCR spécifique au génotype E parmi les 12 prélèvements d'eaux usées de l'abattoir, nous avons séquencé le fragment de 165 pb obtenu pour la totalité des échantillons positifs afin de confirmer que l'amplicon obtenu par électrophorèse sur gel d'agarose correspond effectivement au génotype E. Ce séquençage est réalisé par la société Genome Express.

Nous constatons que les 11 séquences sont parfaitement identiques entre elles. Les résultats du séquençage sont alors regroupés en une seule séquence présentée dans le tableau **10**. Afin de pouvoir comparer ces résultats avec les données actuellement disponibles pour *Giardia* nous effectuons un alignement de ces différentes séquences en utilisant le logiciel ClustalX. Ainsi, une séquence du gène de la TPI provenant de la base

de données Genbank est reportée dans le tableau **10** pour chacun des six génotypes (A, B, C, E, F et G) de l'espèce *G. lamblia*, mais aussi pour les espèces *G. muris*, *G. ardeae* et *G. microti* en parallèle du résultat obtenu pour les eaux usées de l'abattoir.

Tableau 10 : Résultat du séquençage des 11 prélèvements d'eau usée de l'abattoir de Metz positifs pour le génotype E par PCR et comparaison par alignement avec des séquences référencées dans la base de données Genbank

La séquence, identique pour ces 11 échantillons, est alignée avec les séquences des six génotypes de l'espèce *G. lamblia* (A, B, C, E, F et G) et des espèces *G. muris*, *G. ardeae* et *G. microti* disponibles sur la base de données Genbank.

Les bases avec fond grisé correspondent aux variations de séquence par rapport au génotype E. Les séquences des amorces sens et antisens correspondent aux nucléotides écrits en caractères gras pour la séquence des 11 prélèvements.

G. muris		Réf. Genbank : AF069565	CCC	CCG	CCA	TGC	CTC	ACC	TCC	TCC	TCG	CCC	AGG	AGG	TCA	ACA	CGA	ACA	AGG	CAC	TGA	AGA	TCT	CGT	CTC	AGA	ACG	TGT	ACC
G. ardeae		Réf. Genbank : AF069564	CCC	CCG	CGA	TGC	CGC	ACC	TCG	TCC	TCG	CCC	AGG	CCG	CGA	ACA	CGA	GCA	AGG	CGC	TGA	AGA	TCG	CGT	CCC	AGA	ACG	TCT	ATC
G. microti		Réf. Genbank : AY228648	CTC	CCT	CGA	TGG	TGC	ACC	TCC	CCG	TTG	CGG	TAG	AGA	CCA	ACA	AGT	CCG	ATA	AGC	TGA	AGA	TCG	CAG	CCC	AGA	ACG	TCT	ATC
G. lamblia, A	Souche WB	Réf. Genbank : L02120	CCC	CTT	CCG	CCG	TAC	ACC	TGT	CAA	CAG	CCA	TTG	CGG	CAA	ACA	CGT	CAA	AAC	AGT	TGA	GGA	TAG	CAG	CGC	AGA	ATG	TGT	ACC
G. lamblia, B	Souche GS/M	Réf. Genbank : L02116	CTC	CCT	CCT	TTG	TGC	ACC	TTT	CTA	CAG	CTA	TTG	CGG	CGA	ATA	CTT	CGA	AGT	GTC	TGA	AAA	TAG	CAG	CAC	AGA	ACG	TGT	ATC
G. lamblia, C	Souche Ad-136	Réf. Genbank : AF069558	CCC	CCT	CGT	CCG	TGC	ATC	TGT	CTA	CGG	CCA	TCG	CAG	CGA	ACA	CAT	CGA	AGC	AGC	TGA	AGA	TAG	CAG	CGC	AGA	ATG	TGT	ACC
G. lamblia, F	Souche Ad-23	Réf. Genbank : AF069558	CCC	CTT	CTG	CCG	TGC	ACC	TGT	CAA	CAG	CCA	TTG	CGG	CAA	ACA	CGT	CAA	AGC	AGT	TGA	AGA	TAG	CGG	CGC	AGA	ATG	TGT	ACC
G. lamblia, G	Souche Ad-157	Réf. Genbank : AF069562	CCC	CCT	CCG	CTG	TGC	ACC	TGT	CTA	CGG	CCA	TCG	CGG	CAA	ACA	CGT	CGA	AGC	AGC	TGA	AGA	TAG	CGG	CGC	AGA	ATG	TGT	ACC
G. lamblia, E	Souche P-15	Réf. Genbank : AF069559	CCC	CTT	CTG	CCG	TAC	ATT	TAT	CAA	CAG	CTA	TTG	CAG	CAA	ACA	CGT	CAA	AAC	AGT	TGA	AGA	TAG	CGG	CGC	AGA	ATG	TGT	ACC
Résultat du séquençage :			**CCC**	**CTT**	**CTG**	**CCG**	**TAC**	**ATT**	**TAT**	**CAA**	CAG	CTA	TTG	CAG	CAA	ACA	CGT	CAA	AAC	AGT	TGA	AGA	TAG	CGG	CGC	AGA	ATG	TGT	ACC
11 séquences A-1 à A-5 et A-7 à A-12																													

G. muris	TCC	AGC	CGC	CTG	GCG	CCT	GGA	CCG	GTG	AGG	TCA	GCG	TCG	AGA	TGC	TGA	AGG	ACC
G. ardeae	TCG	AGC	CCC	CCG	GTG	CTT	GGA	CCG	GCG	AAG	TGA	GCG	TGG	AGA	TGC	TCA	AGG	ACC
G. microti	TCC	TGG	GAG	ACG	GCG	CCT	GGA	CTG	GCG	AGA	CGA	GCG	TTG	AGA	TGC	TCA	AGG	ACC
G. lamblia, A	TAG	AGG	GGA	ACG	GGG	CGT	GGA	CTG	GCG	AGA	CAA	GTG	TTG	AGA	TGC	TTC	AGG	ACA
G. lamblia, B	TGG	AAG	GGA	ACG	GTG	CAT	GGA	CCG	GCG	AGA	CAA	GCG	TCG	AGA	TGC	TGC	TGG	ACA
G. lamblia, C	TCG	AGG	GAA	ACG	GCG	CAT	GGA	CGG	GCG	AGA	CAA	GTG	TTG	AGA	TGC	TTC	AGG	ACA
G. lamblia, F	TAG	AGG	GGA	ACG	GGG	CGT	GGA	CCG	GTG	AGA	CGA	GCG	TTG	AGA	TGC	TCC	AGG	ACA
G. lamblia, G	TGG	AGG	GCA	ACG	GCG	CGT	GGA	CGG	GCG	AAA	CAA	GCG	TCG	AGA	TGC	TCC	TGG	ACA
G. lamblia, E	TAG	AGG	GGA	ATG	GAG	CGT	GGA	CTG	GTG	AGA	CGA	GTG	TTG	AGA	TGC	TTC	AGG	ACA
Résultat du séquençage :	TAG	AGG	GGA	ATG	GAG	CGT	GGA	CTG	GTG	AGA	CGA	GTG	TTG	AGA	TGC	TTC	AGG	ACA
11 séquences A-1 à A-5 et A-7 à A-12																		

G. muris	TCG	GGA	TTG	AGA	TGA	CCC	TTG	TAG	GAC	ATT
G. ardeae	TCG	GGG	TCG	AGG	TGA	CCG	TCG	TCG	GGC	ACT
G. microti	TCG	GAA	TCG	GGC	ACG	TGA	TCA	TCG	GGC	ATT
G. lamblia, A	TGG	GTT	TGA	AGC	ATG	TGA	TAG	TAG	GAC	ACT
G. lamblia, B	TGG	GGC	TGA	GCC	ATG	TAA	TAA	TAG	GAC	ACT
G. lamblia, C	TGG	GCC	TGA	GTC	ACG	TGA	TAG	TAG	GGC	ACT
G. lamblia, F	TGG	GCC	TAG	AGC	ATG	TGA	TAA	TAG	GGC	ACT
G. lamblia, G	TGG	GCC	TGA	GCC	ACG	TGA	TAG	TTG	GGC	ACT
G. lamblia, E	TGG	GCT	TGG	AGT	ACG	TGA	TAA	TAG	GGC	ATT
Résultat du séquençage :	**TGG**	**GCT**	**TGG**	**AGT**	**ACG**	**TGA**	**TAA**	**TAG**	**GGC**	**ATT**
11 séquences A-1 à A-5 et A-7 à A-12										

Les séquences obtenues pour les 11 prélèvements de l'abattoir montrent une homologie parfaite avec les séquences référencées pour le génotype E de *Giardia lamblia*. En revanche, 20 à 56 variations nucléotidiques sont observées entre les séquences disponibles pour les cinq autres génotypes (A, B, C, F et G) de *G. lamblia* et les prélèvements environnementaux ou la séquence référencée pour le génotype E. Parmi ces cinq génotypes, le génotype B présente le nombre le plus élevé de variations de séquence par rapport au génotype E. De plus, les séquences provenant des prélèvements d'abattoir présentent entre 50 et 70 variations nucléotidiques par rapport aux séquences des espèces *G. muris*, *G. ardeae*, *G. microti* pour ce fragment de 165 pb.

Ainsi, nous constatons d'une part une homologie complète entre les séquences des amplicons obtenus avec les prélèvements de l'abattoir et les séquences référencées pour le génotype E et d'autre part un nombre relativement élevé de variations nucléotidiques avec les autres espèces du genre *Giardia* ou les autres génotypes de *G. lamblia* pour ce fragment de 165 pb. Ce constat permet de confirmer la présence de kystes de *G. lamblia* appartenant au génotype E spécifique du bétail dans 91,6 % des 12 prélèvements provenant de l'abattoir de Metz.

4.3- Détection des génotypes A et B de Giardia lamblia par PCR en temps réel.

La détection des kystes de *G. lamblia* appartenant aux génotypes A et B est réalisée par deux amplifications distinctes. Comme dans le cas de la détection de l'ensemble des kystes de *Giardia*, les résultats sont comparés par site pour ces deux systèmes, mais aussi par rapport à la détection par immunofluorescence.

4.3.1- Détection du génotype A par PCR en temps réel.

Les valeurs de concentrations en kystes de *G. lamblia* appartenant au génotype A pour les 12 séries de prélèvement effectués sur les trois sites sont présentées dans le tableau **11**.

Tableau 11 : Concentrations en kystes de *Giardia lamblia*, génotype A (kystes.L^{-1}) détectées avec la PCRq-A (n = 3) dans les eaux usées provenant des stations d'épuration de Nancy et de Metz, et de l'abattoir de Metz

Site					
STEP de Nancy		STEP de Metz		Abattoir de Metz	
Prélèvement	**Concentration**	**Prélèvement**	**Concentration**	**Prélèvement**	**Concentration**
N-1	$2,3.10^3$	M-1	$2,7.10^3$	A-1	X
N-2	$1,2.10^3$	M-2	$3,0.10^3$	A-2	X
N-3	X	M-3	$3,9.10^3$	A-3	$3,1.10^3$
N-4	$9,9.10^2$	M-4	$1,5.10^3$	A-4	$1,4.10^3$
N-5	$1,6.10^3$	M-5	$6,2.10^3$	A-5	$2,5.10^3$
N-6	$1,4.10^3$	M-6	$4,9.10^3$	A-6	X
N-7	$2,9.10^3$	M-7	$8,8.10^3$	A-7	X
N-8	$1,4.10^3$	M-8	$2,2.10^3$	A-8	X
N-9	$1,4.10^3$	M-9	$4,5.10^3$	A-9	$2,1.10^3$
N-10	$1,0.10^3$	M-10	$1,8.10^3$	A-10	$1,8.10^3$
N-11	$1,8.10^3$	M-11	$4,2.10^3$	A-11	$4,1.10^3$
N-12	$6,7.10^2$	M-12	$2,3.10^3$	A-12	$1,5.10^3$
Moyenne ± écart-type					
$1,5.10^3 \pm 6,4.10^2$ (a)		$3,8.10^3 \pm 2,1.10^3$		$2,3.10^3 \pm 9,5.10^2$ (a)	
$1,5.10^3 \pm 6,1.10^2$ (b)				$1,9.10^3 \pm 9,2.10^2$ (b)	

X : pas d'émission de fluorescence par PCR / a : moyenne obtenue en considérant les échantillons négatifs en l'absence d'émission de fluorescence / b : moyenne obtenue en considérant ces échantillons au seuil de détection ($1,25.10^3$ kystes.L^{-1})

11 prélèvements de la station d'épuration de Nancy permettent d'obtenir un signal avec la PCRq-A. D'après ce système PCR, les concentrations sont comprises entre $6,7.10^2$ (N-12) et $2,9.10^3$ (N-7) kystes.L^{-1} d'eau

usée pour ce site. La totalité des prélèvements de la station d'épuration de Metz s'avèrent positifs avec des concentrations plus élevées que celles de Nancy et qui s'échelonnent entre $1,5.10^3$ (M-4) et $6,2.10^3$ (M-5) kystes.L^{-1}. Parmi les 12 prélèvements de l'abattoir de Metz, seulement sept permettent d'obtenir une amplification. Les concentrations de ces échantillons varient de $1,4.10^3$ (A-4) à $4,1.10^3$ (A-11) kystes.L^{-1}. Au vu des concentrations observées pour les prélèvements positifs de la station d'épuration de Nancy et de l'abattoir de Metz, les échantillons négatifs peuvent probablement être considérés comme proches de la valeur seuil de détection.

D'après le test d'égalité des variances (test de Snedecor), il n'est pas possible de comparer les valeurs moyennes observées pour les stations d'épuration de Nancy et de Metz ($p < 0,05$). Par contre, toujours d'après ce test, les valeurs obtenues pour la station d'épuration de Nancy et l'abattoir de Metz peuvent être comparées ($p > 0,05$). Le test de Student conclut que les concentrations en kystes de *G. lamblia* du génotype A de l'abattoir sont significativement plus élevées que celles de la station d'épuration ($p < 0,05$), toutefois seulement 58 % des échantillons ($n = 12$) sont positifs pour les eaux usées de l'abattoir.

4.3.2- Détection du génotype B par PCR en temps réel.

Les valeurs de concentrations en kystes de *G. lamblia* appartenant au génotype A pour les 12 séries de prélèvement effectués sur les trois sites sont présentées dans le tableau **12**.

Tableau 12 : Concentrations en kystes de *Giardia lamblia*, génotype B (kystes.L^{-1}) détectées avec la PCRq-B dans les eaux usées provenant des stations d'épuration de Nancy et de Metz, et de l'abattoir de Metz

Site					
STEP de Nancy		STEP de Metz		Abattoir de Metz	
Prélèvement	Concentration	Prélèvement	Concentration	Prélèvement	Concentration
N-1	$1,3.10^3$	M-1	$1,9.10^3$	A-1	X
N-2	$1,2.10^3$	M-2	$1,7.10^3$	A-2	X
N-3	$6,2.10^2$	M-3	$1,5.10^3$	A-3	X
N-4	X	M-4	$1,9.10^3$	A-4	X
N-5	X	M-5	$1,7.10^3$	A-5	X
N-6	$1,9.10^3$	M-6	$1,8.10^3$	A-6	X
N-7	X	M-7	$9,0.10^2$	A-7	X
N-8	X	M-8	$1,1.10^3$	A-8	X
N-9	X	M-9	X	A-9	X
N-10	$1,1.10^3$	M-10	$1,1.10^3$	A-10	X
N-11	X	M-11	$1,1.10^3$	A-11	X
N-12	X	M-12	$6,7.10^2$	A-12	X
		Moyenne ± écart-type			
$1,2.10^3 \pm 4,8.10^2$ *		$1,4.10^3 \pm 4,4.10^2$ (a) $1,5.10^3 \pm 6,1.10^2$ (b)			

X : pas d'émission de fluorescence par PCR / * : moyenne des échantillons positifs

Seulement cinq prélèvements de la station d'épuration de Nancy permettent d'obtenir un signal avec la PCRq-B et les concentrations sont comprises entre $6,2.10^2$ (N-3) et $1,9.10^3$ (N-6) kystes .L^{-1} d'eau usée. Au vu des concentrations observées pour les prélèvements positifs, les sept échantillons négatifs peuvent probablement contenir des kystes de *G. lamblia*, génotype B à des concentrations proches de la valeur seuil. Pour les prélèvements de la station d'épuration de Metz, 11 s'avèrent positifs avec des concentrations qui s'échelonnent

entre $6,7.10^2$ (M-12) et $1,9.10^3$ (M-1 et M-4) kystes.L^{-1}. Par contre, aucun signal d'amplification n'est observé pour les 12 prélèvements de l'abattoir de Metz.

Suite au test d'égalité des variances, les valeurs moyennes observées pour les deux stations d'épuration peuvent être comparées ($p > 0,05$). Les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* du génotype B ne sont pas significativement différentes d'après le test de Student ($p > 0,05$), toutefois seulement 42 % ($n = 12$) des échantillons de Nancy sont positifs avec ce système PCR.

4.3.3- Comparaison des concentrations en génotypes A et B.

Pour les 12 séries de prélèvements, le génotype A est détecté plus fréquemment que le génotype B. Ainsi, 11 et seulement cinq échantillons sont positifs respectivement pour le génotype A et le génotype B pour les prélèvements de la station d'épuration de Nancy. La différence entre ces deux génotypes est beaucoup plus marquée pour les eaux usées de l'abattoir puisque sept échantillons sont positifs pour le génotype A alors que le génotype B n'est détecté dans aucun de ces prélèvements. Par contre, pour la station d'épuration de Metz, le nombre d'échantillons positifs pour ces deux génotypes est équivalent. En effet 12 et 11 prélèvements sont positifs pour les génotypes A et B respectivement, toutefois les concentrations du génotype A apparaissent plus élevées que celles du génotype B.

D'après le test de Snedecor (égalité des variances), les valeurs de concentration des génotypes A et B ne peuvent être comparées que pour les prélèvements de la station d'épuration de Nancy au risque de 5 %. Le test de Student (test-t) conclut que les concentrations de ces deux génotypes ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

4.3.4- Comparaison des concentrations en kystes observées par PCR et par immunofluorescence.

Les valeurs représentant la somme des concentrations obtenues avec les deux PCR quantitatives spécifiques des génotypes A et B sont comparées avec les valeurs observées avec la PCRq-*lamblia* ou par immunofluorescence. Au vu du faible nombre d'échantillons positifs lors de la détection spécifique de ces deux génotypes dans les prélèvements effectués à l'abattoir, cette étape de comparaison est effectuée uniquement pour les prélèvements provenant des stations d'épuration.

4.3.4.1- Comparaison des concentrations en kystes pour la station d'épuration de Nancy.

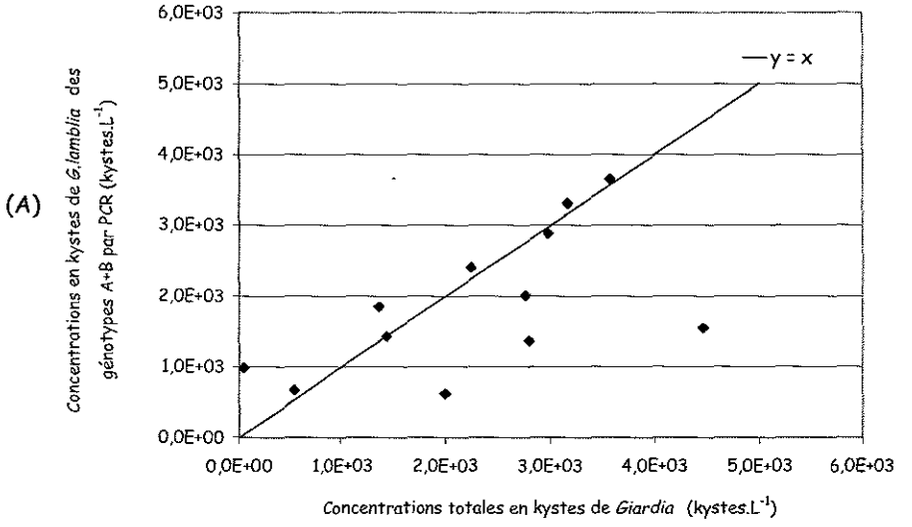
Les valeurs sommes des concentrations en kystes de *Giardia lamblia* des génotypes A et B obtenues avec les systèmes PCRq-A et PCRq-B pour les échantillons de la station d'épuration de Nancy sont regroupées dans le tableau **13**. La concentration moyenne en kystes de *G. lamblia* obtenue avec la PCRq-*lamblia* pour la station d'épuration de Nancy est de $1.10^3 \pm 6,9.10^2$ kystes.L^{-1}.

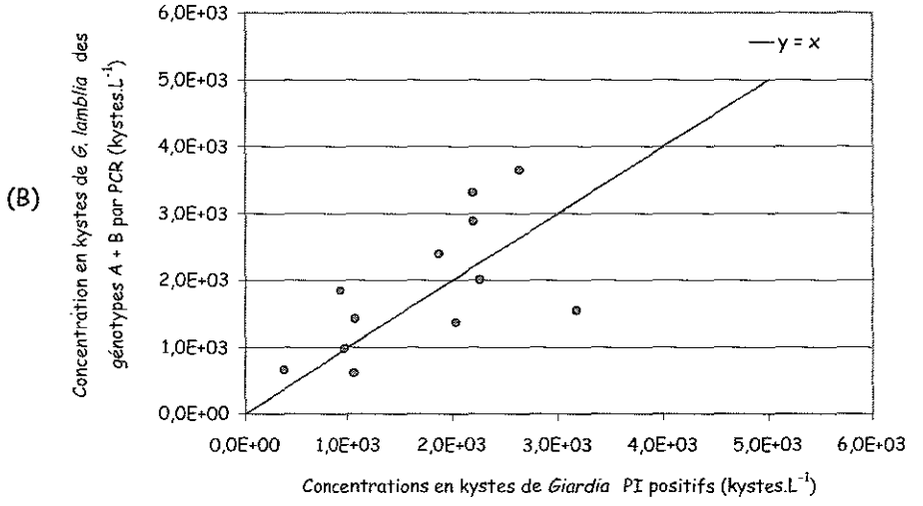
D'après le test de Snedecor, ces concentrations correspondant aux génotypes A et B peuvent être comparées avec les valeurs obtenues avec la PCRq-*lamblia* pour l'ensemble des kystes de *G. lamblia* ($p > 0,05$). Le test de Student montre que ces concentrations en kystes appartenant aux génotypes A et B sont significativement supérieures aux concentrations en kystes de l'espèce *Giardia lamblia* ($p < 0,05$).

Tableau 13 : Somme des concentrations en kystes de *Giardia lamblia*, génotypes A et B (kystes.L^{-1}) détectées avec les PCRq-A et PCRq-B dans les eaux usées de la station d'épuration de Nancy

Prélèvements	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9	N-10	N-11	N-12
Concentrations (kystes.L^{-1})	$3,6.10^3$	$2,4.10^3$	$6,2.10^2$	$9,9.10^2$	$1,6.10^3$	$3,3.10^3$	$2,9.10^3$	$1,4.10^3$	$1,4.10^3$	$2,1.10^3$	$1,8.10^3$	$6,7.10^2$
Moyenne ± écart-type : $1,9.10^3 \pm 9,8.10^2$												

Les concentrations concernant les kystes de *G. lamblia* des génotypes A et B obtenues par PCR en temps réel, sont représentées en fonction des concentrations en kystes totaux et PI positifs détectées par immunofluorescence sur les figures **8(A) et 8(B)** respectivement, pour les échantillons de la station d'épuration de Nancy.





Figures 8(A) et 8(B) : Comparaison entre les concentrations (kystes.L^{-1}) obtenues par immunofluorescence et par PCR (*G. lamblia*, génotypes A + B) pour les eaux usées de la station d'épuration de Nancy
(A) : concentrations totales en kystes de *Giardia* par immunofluorescence
(B) : concentrations en kystes de *Giardia* PI positifs par immunofluorescence

D'après le test de Snedecor, les concentrations en kystes de *G. lamblia* des génotypes A et B sont comparables avec les concentrations totales en kystes de *Giardia* mais aussi avec les concentrations en kystes

positifs par marquage au PI ($p > 0,05$). Le test de Student ne montre pas de différence significative entre les valeurs obtenues par PCR en temps réel et celles détectées par immunofluorescence ($p > 0,05$).

Le test de Spearman ne montre pas de corrélation entre les concentrations totales en kystes de *Giardia* et les concentrations correspondant aux génotypes A et B ($p > 0,05$). Par contre, d'après ce test les concentrations en kystes appartenant aux génotypes A et B sont corrélées aux concentrations en kystes positifs par marquage au PI ($p = 0,030$; $r_s = 0,625$).

4.3.4.2- Comparaison des concentrations en kystes pour la station d'épuration de Metz.

Les valeurs sommes des concentrations en kystes de *Giardia lamblia* des génotypes A et B obtenues avec les systèmes PCRq-A et PCRq-B pour les échantillons de la station d'épuration de Metz sont regroupées dans le tableau **14**. La concentration moyenne en kystes de *G. lamblia* obtenue avec la PCRq-*lamblia* pour la station d'épuration de Metz est de $3,2.10^3 \pm 1,1.10^3$ kystes.L^{-1}.

Les valeurs sommes des concentrations en kystes appartenant aux génotypes A et B semblent supérieures aux concentrations en kystes de *G. lamblia* obtenues avec la PCRq-*lamblia*. Toutefois, le test de Snedecor conclut que les concentrations regroupant les génotypes A et B de *G. lamblia* ne peuvent pas être comparées avec les valeurs obtenues avec la PCRq-*lamblia* pour l'ensemble des kystes de *G. lamblia* ($p < 0,05$).

Tableau 14 : Somme des concentrations en kystes de *Giardia lamblia*, génotypes A et B (kystes.L^{-1}) détectées avec les PCRq-A et PCRq-B dans les eaux usées de la station d'épuration de Metz

Prélèvements	N-1	N-2	N-3	N-4	N-5	N-6	N-7	N-8	N-9	N-10	N-11	N-12
Concentrations (kystes.L^{-1})	$4,6.10^3$	$4,7.10^3$	$5,4.10^3$	$3,4.10^3$	$7,9.10^3$	$6,7.10^3$	$9,7.10^3$	$3,3.10^3$	$4,5.10^3$	$2,9.10^3$	$5,3.10^3$	$3,0.10^3$
Moyenne ± écart-type : $5,1.10^3 \pm 2,1.10^3$												

Les concentrations en kystes de *G. lamblia* des génotypes A et B obtenues par PCR en temps réel, sont représentées en fonction des concentrations en kystes totaux et PI positifs détectées par immunofluorescence sur les figures **9(A) et 9(B)** respectivement, pour les échantillons de la station d'épuration de Metz.

(A)

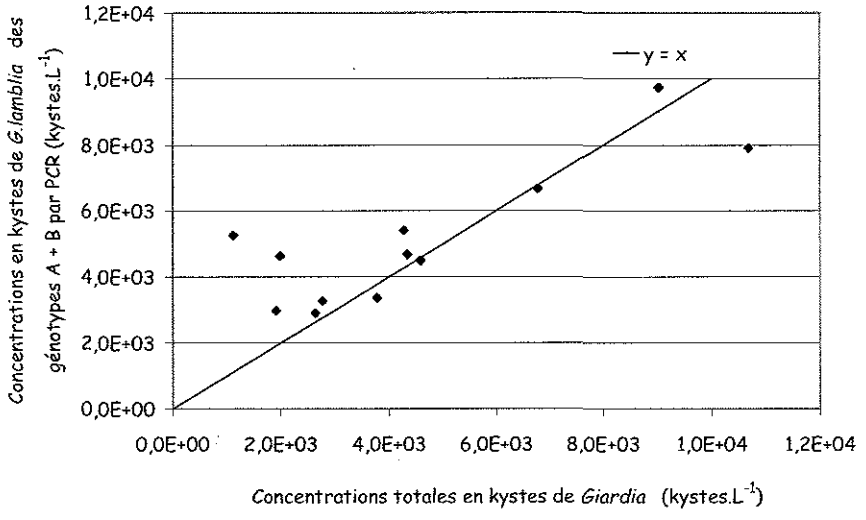


Figure 9(A) : Comparaison entre les concentrations (kystes.L^{-1}) obtenues par immunofluorescence (concentrations totales en kystes de *Giardia*) et par PCR (*G. lamblia*, génotypes A + B) pour les eaux usées de la station d'épuration de Metz

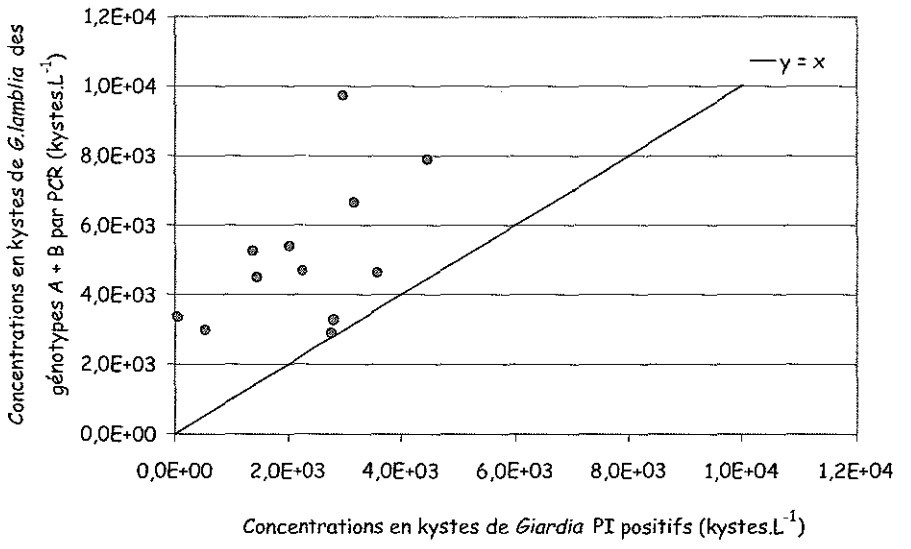


Figure 9(B) : Comparaison entre les concentrations (kystes.L^{-1}) obtenues par immunofluorescence (concentrations en kystes de *Giardia* PI positifs) et par PCR (*G. lamblia*, génotypes A + B) pour les eaux usées de la station d'épuration de Metz

Le test de Snedecor montre que la comparaison des concentrations en kystes de *G. lamblia* des génotypes A et B est réalisable avec les concentrations totales en kystes de *Giardia* mais aussi avec les concentrations en kystes positifs par marquage au PI ($p > 0,05$). Le test de Student ne montre pas de différence significative entre les valeurs obtenues par PCR en temps réel et les concentrations totales en kystes de *Giardia* ($p > 0,05$). Par contre, les concentrations en kystes correspondant aux génotypes A et B sont supérieures aux concentrations en kystes dont les noyaux sont visibles par marquage au PI ($p < 0,05$).

D'après le test de Spearman, les concentrations en kystes appartenant aux génotypes A et B sont corrélées aux concentrations totales en kystes ($p = 0,01$; $r_s = 0,832$) et aux concentrations en kystes positifs par marquage au PI ($p = 0,01$; $r_s = 0,812$).

En résumé,

Lors de cette étude nous avons développé des outils permettant une détection spécifique des génotypes A, B, C et E. Si le génotype C isolé chez des animaux domestiques n'est détecté dans aucun prélèvement, en revanche les génotypes A, B et E sont détectés lors de notre étude.

Ainsi, dans les eaux usées de la station d'épuration de Nancy caractérisée par une contamination domestique, nous détectons uniquement les génotypes A et B. Concernant les prélèvements provenant de la station d'épuration de Metz, seuls les génotypes A et B sont également mis en évidence. Au niveau de la station d'épuration de Metz, la faible proportion correspondant aux eaux usées provenant de l'abattoir peut expliquer l'absence de détection du génotype E. Ainsi, pour les eaux usées dont la contamination est majoritairement d'origine domestique, seuls les génotypes pathogènes pour l'Homme sont mis en évidence. Par contre, dans les 12 prélèvements effectués à l'abattoir de Metz, nous détectons le génotype A pathogène pour l'Homme dans sept échantillons et le génotype E considéré spécifique des animaux d'élevage dans 11 d'entre eux. Le génotype B n'est mis en évidence dans aucun de ces prélèvements provenant de l'abattoir. La détection des génotypes A et B de *G. lamblia* par PCR en temps réel permet d'obtenir des concentrations en kystes équivalentes aux concentrations totales en kystes de *Giardia* observées par immunofluorescence. Globalement, le génotype A semble plus fréquent

que le génotype B dans ces eaux caractérisées par une contamination domestique (station d'épuration de Nancy), une contamination due aux animaux d'élevage (abattoir de Metz) ou une contamination provenant de ces deux origines (station d'épuration de Metz).

D'après nos résultats, les animaux d'élevage peuvent constituer une source non négligeable de kystes de *G. lamblia* potentiellement pathogènes pour l'Homme. Ainsi, le génotype A est détecté au niveau des trois sites. Le génotype B semble plus fréquent au niveau des eaux usées caractérisées par une contamination domestique. En revanche, la mise en évidence du génotype E semble signer la présence d'une contamination due aux animaux d'élevage et apparaît comme un marqueur potentiel de contamination non-humaine.

2ÈME PARTIE : Génotypage de kystes de *Giardia lamblia* isolés de selles humaines

Lors de notre étude, des selles humaines positives à *Giardia* provenant de plusieurs hôpitaux sont également analysées afin de réaliser le génotypage des kystes. Les échantillons utilisés dans le cadre de cette étude correspondent à une période de quatre ans comprise entre octobre 2000 et septembre 2004. Actuellement, aucune étude n'est publiée concernant le génotypage de kystes provenant de cas de giardiose, sporadiques ou regroupés, diagnostiqués en France.

1- Résultats du génotypage des kystes de Giardia lamblia isolés de selles humaines.

1.1- Les différents profils électrophorétiques observés.

41 prélèvements de selles humaines ont été analysés par PCR et PCR-RFLP suivant trois méthodes développées soit au laboratoire, soit par Amar *et al.* (2002) ou Read *et al.* (2004). Au vu des résultats obtenus avec la séparation à l'acétate d'éthyle lors de nos expérimentations effectuées sur les prélèvements d'eaux usées, cette technique est également utilisée pour purifier les 27 échantillons de selles reçus au laboratoire depuis mai 2004. Les résultats obtenus lors de notre étude, par migration électrophorétique sur gel d'agarose après PCR et PCR-RFLP sont présentés sur les figures **10** et **11** respectivement.

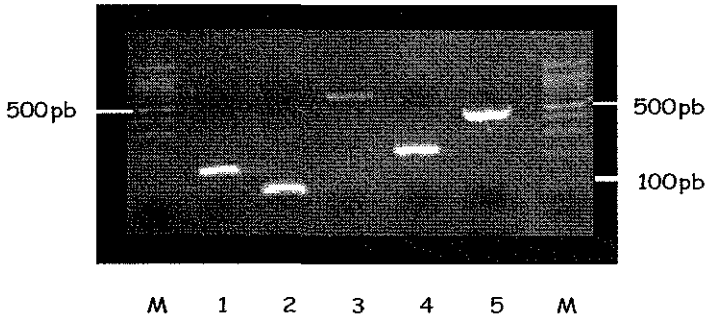


Figure 10 : Photographie de gel d'électrophorèse après PCR :

PCR laboratoire :

1 : 148 pb, génotype A

2 : 81 pb, génotype B

PCR Amar *et al.* (2002) :

3 : 577 pb, génotype A

4 : 209 pb, génotype B

PCR Read *et al.* (2004) :

5 : 432 pb, génotype A ou B

M : marqueur de taille

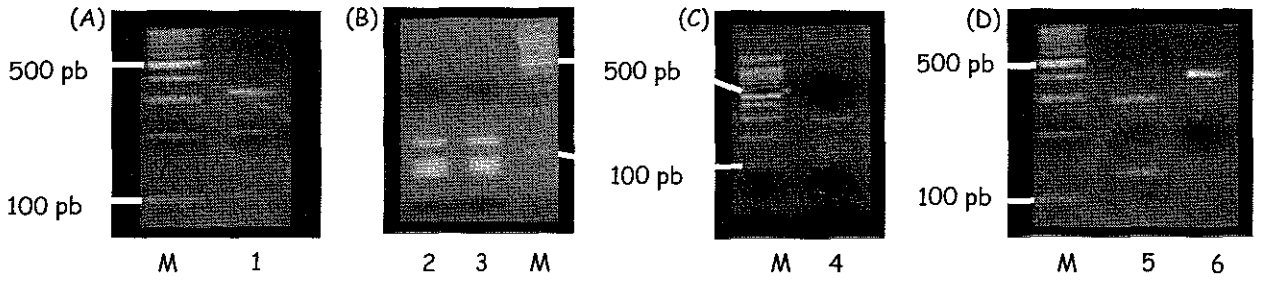


Figure 11 : Photographies de gels d'électrophorèse après PCR-RFLP

(A) : Digestion par Rsa I après PCR génotype A de Amar *et al.* (2002). 1 : 202 et 336 pb, génotype A-II.

(B) : Digestion par Nla IV après PCR de Read *et al.* (2004). 2 et 3 : 72, 77, 87 et 123 pb, génotype A-II.

(C) : Digestion par Nla IV après PCR de Read *et al.* (2004). 4 : 123 et 291 pb, génotype B

(D) : Digestion par RsaI après PCR de Read *et al.* (2004). 5 : 133 et 297 pb, génotype B-III ; 6 : 432 pb, génotype B IV.

M : marqueur de taille

1.2- Génotypage des cas sporadiques.

1.2.1- Détection des génotypes A et B.

Lors de ces travaux, 26 selles humaines correspondant à des cas sporadiques de giardiose sont analysées par les trois méthodes de PCR et PCR-RFLP. Parmi ces 26 échantillons, 8 proviennent de l'hôpital militaire Legouest à Metz et 18 correspondent à des cas de giardiose de patients d'hôpitaux civils dont 11 du CHU de Nancy-Brabois. Pour ces cas sporadiques, les données concernant l'âge et le sexe des patients ont été obtenues majoritairement pour les patients des hôpitaux civils. La répartition des patients en fonction des ces deux données est représentée sur la figure 12. Ces 18 cas sporadiques diagnostiqués dans les hôpitaux publics concernent essentiellement des adultes (61 % des cas) de sexe masculin (77,8 % des cas).

Figure 12 : Graphiques en secteurs représentant la répartition des patients en fonction de leur âge et de leur sexe

Ces prélèvements ont été diagnostiqués positifs à *Giardia* par les différents laboratoires hospitaliers et une observation par immunofluorescence est également réalisée au laboratoire préalablement à l'analyse par PCR. Le protocole développé au laboratoire et la méthode proposée par Amar *et al.* (2002) permettent de différencier les génotypes A et B par PCR simple alors que la méthode publiée par Read *et al.* (2004) comporte une PCR suivie par une restriction enzymatique. En effet, la restriction avec l'enzyme NlaIV permet de distinguer les génotypes A-I, A-II et B.

Parmi les 26 échantillons de selles correspondant à des cas sporadiques, 21 (80,7 %) sont positifs avec les trois méthodes et 25 (96,1 %) sont positifs avec une des méthodes. La PCR élaborée au laboratoire permet d'obtenir 96,1 % de résultats positifs alors que la méthode publiée par Read *et al.* (2004) aboutit à seulement 80,7 % d'échantillons positifs. Les résultats obtenus avec chacune de ces méthodes sont présentés sur les graphiques en secteurs de la figure **13**.

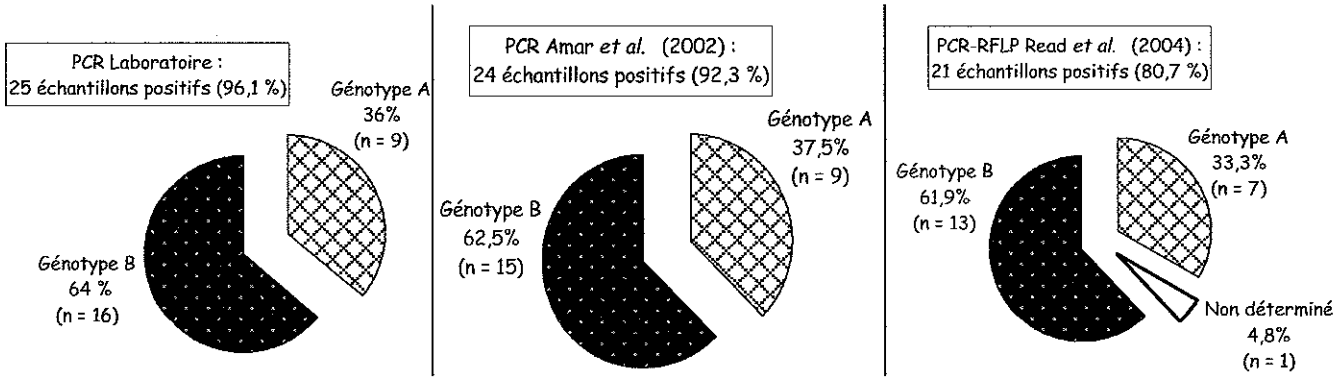


Figure 13 : Graphiques en secteurs représentant les proportions des génotypes A et B détectés par les trois méthodes parmi les cas de giardiose sporadiques

La PCR développée au laboratoire permet d'obtenir 25 échantillons positifs avec 9 génotypes A et 16 génotypes B. La PCR publiée par Amar *et al.* (2002) aboutit à 24 échantillons positifs dont 9 génotypes A et 15 génotypes B. Concernant la PCR proposée par Read *et al.* (2004), certains échantillons sont analysés par double PCR afin d'obtenir une amplification du fragment recherché et seulement 21 échantillons s'avèrent positifs avec ces amorces. Ces échantillons positifs contiennent 13 génotypes B, 7 génotypes A et 1 échantillon pour lequel le génotype n'a pas pu être déterminé. Les résultats au niveau des génotypes A et B sont concordants entre les différentes méthodes et le génotype B prédomine puisqu'il représente 64 % des échantillons positifs.

Les résultats détaillés obtenus avec chacune des trois méthodes lors de la détermination des génotypes A et B pour les 26 cas sporadiques sont présentés dans le tableau **15** (page 193) pour les hôpitaux civils et dans le tableau **16** (page 194) pour l'hôpital militaire.

1.2.2- Mise en évidence des sous-génotypes A-I, A-II, B-III et B-IV.

Un génotypage plus précis des isolats est ensuite réalisé par restriction enzymatique avec les méthodes de Amar *et al.* (2002) et de Read *et al.* (2004). En effet, après détection du génotype A avec les amorces proposées par Amar *et al.* (2002), la digestion enzymatique par RsaI permet de déterminer si les kystes appartiennent aux sous-génotypes A-I ou A-II. Le protocole publié par Read *et al.* (2004) différencie les sous-

génotypes A-I, A-II et B grâce à la digestion enzymatique avec NlaIV et l'utilisation de l'enzyme RsaI permet ensuite de distinguer les sous-génotypes B-III et B-IV. Les résultats obtenus avec ces deux méthodes sont présentés sur les graphiques en secteur de la figure **14**.

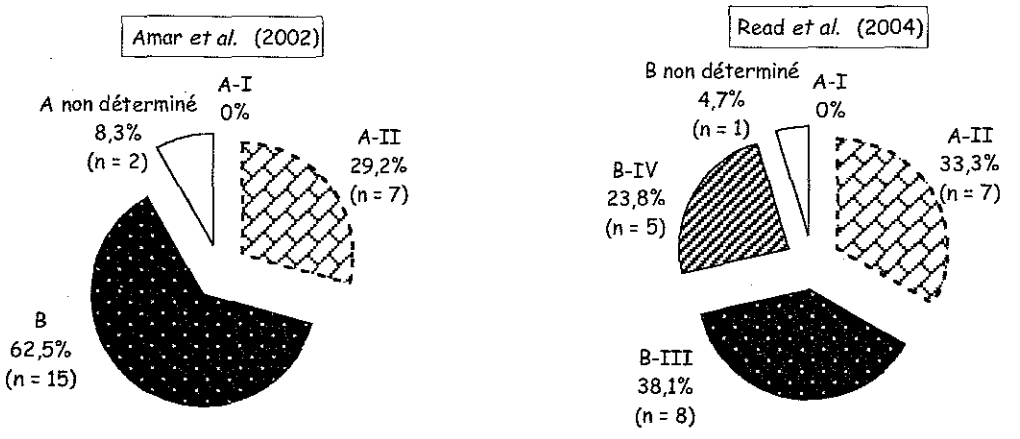


Figure 14 : Graphiques en secteur représentant la répartition des génotypes A-I, A-II, B-III et B-IV parmi les cas de giardiose sporadiques d'après les méthodes de Amar *et al.* (2002) et de Read *et al.* (2004)

Pour les neuf isolats appartenant au génotype A d'après la PCR développée au laboratoire, six sont classés dans le sous-génotype A-II par les deux méthodes et deux isolats sont identifiés par une seule méthode. Au total, huit isolats appartiennent au sous-génotype A-II. Le sous-génotype A-I n'est détecté dans aucun isolat et un de ces échantillons ne peut être classé de façon plus précise avec les deux protocoles proposés par Amar *et al.* (2002) et Read *et al.* (2004). Les 16 isolats appartenant au génotype B d'après la PCR développée au laboratoire sont identifiés de façon plus précise en faisant appel à la procédure de Read *et al.* (2004). Huit isolats appartiennent au sous-génotype B-III, cinq sont classés dans le sous-génotype B-IV et trois ne peuvent être classés plus précisément. Les résultats sont concordants entre les deux méthodes au niveau de la mise en évidence du sous-génotype A-II.

Le résumé des résultats obtenus pour les 26 cas sporadiques, avec chacune de ces trois méthodes, sont présentés dans le tableau **17**.

Tableau 17 : Résumé des résultats obtenus avec les trois méthodes de génotypage pour les 26 cas sporadiques

Méthode	Laboratoire	Amar *et al.* (2002)		Read *et al.* (2004)	
Nombre d'échantillons positifs (Pourcentage)	25 (96,1 %)	24 (92,3 %)		21 (80,7 %)	
Génotypes	A : 9 (36 %)	A : 9 (37,5%)	A-I : 0 A-II : 7 2 non définis	1 non défini A : 7 (33,3 %)	A-I : 0 A-II : 7
	B : 16 (64 %)	B : 15 (62,5 %)		B : 13 (61,9 %)	B-III : 8 B-IV : 5

Parmi les neuf isolats appartenant au génotype A, huit sont classés dans le sous-génotype A-II et un seul ne peut pas être analysé de façon plus précise. Les 16 isolats classés dans le génotype B par notre PCR, sont répartis dans les sous-génotypes B-III et B-IV pour huit et cinq d'entre eux respectivement. Trois isolats classés dans le génotype B avec notre protocole n'ont pas pu être classés de façon plus précise. Les pourcentages de chaque génotype observés lors de l'analyse des 25 cas sporadiques de giardiose, positifs suite à l'amplification par PCR, sont représentés sur la figure **15**.

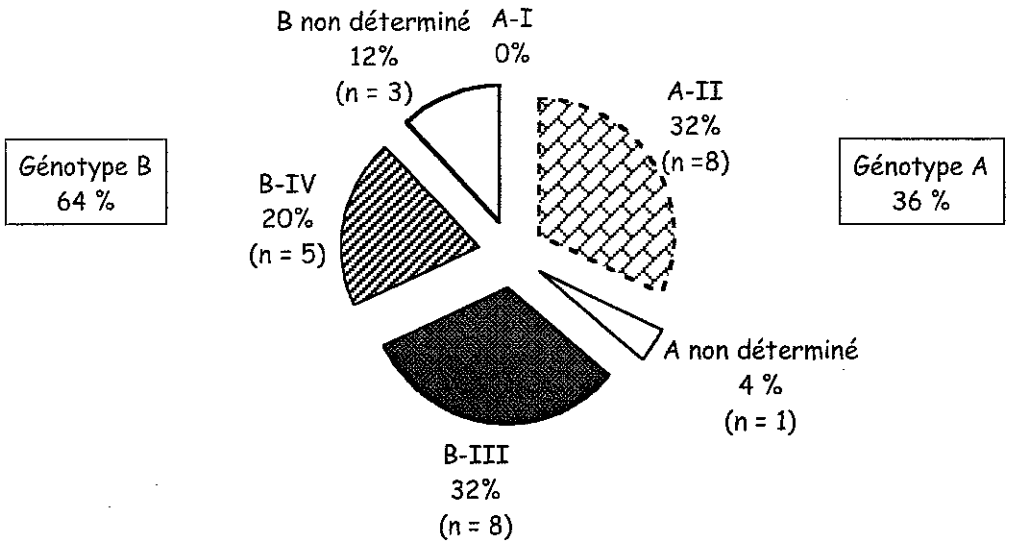


Figure 15 : Graphique en secteurs représentant la proportion de chaque génotype et sous-génotype après analyse avec les trois méthodes pour les 25 échantillons positifs par PCR

Ainsi, trois génotypes différents sont mis en évidence dans ces prélèvements de selles. Globalement, le génotype B prédomine pour cette analyse, en revanche lorsque l'analyse est plus précise aucune prédominance n'est observée entre les sous-génotypes A-II, B-III et B-IV lors de notre étude.

Tableau 15 : Résultats du génotypage des kystes de *Giardia lamblia* provenant de cas sporadiques diagnostiqués dans des hôpitaux civils de Nancy et Paris (n = 18)

Date	Patient		Résultats des différents génotypages												Résultat final
	Sexe	Age (années)	Laboratoire PCR (n = 2)		Amar *et al.* (2002) PCR		Amar *et al.* (2002) RFLP Rsa I		Read *et al.* (2004) PCR	Read *et al.* (2004) RFLP Nla IV			Read *et al.* (2004) RFLP Rsa I		
			A	B	A	B	A-I	A-II		A-I	A-II	B	B-III	B-IV	
CHU NANCY-BRABOIS (n = 11)															
10/2000	M	54	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	-	+	B-IV
01/2001	F	1	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	-	+	B-IV
12/06/2001	M	34	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	-	+	B-IV
05/2002	M	1	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
06/2002	M	39	+ / +	- / -	+*	-*	-	+	-*						A-II
09/2002	M	21	+ / +	- / -	+*	-*	-	+	+	-	+	-			A-II
09/2003	M	50	+ / +	- / -	+*	-*	-	+	+	-	+	-			A-II
10/2003	F	37	- / -	+ / +	-*	+*			+*	-	-	+	+	-	B-III
12/2003	M	1	+ / +	- / -	+*	-*	-	+	+	-	+	-			A-II
30/04/2004	M	33	+ / +	- / -	+	-	-	-	+	-	+	-			A-II
24/08/2004	M	29	+ / +	- / -	+	-	-	+	+	-	+	-			A-II
Hôpital de la PITIE-SALPETRIERE, PARIS (n = 6)															
01/2004	M	38	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
13/04/2004	NR	NR	- / -	- / -	-*	-*			-*						Négatif
06/05/2004	M	61	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
28/06/2004	F	9 mois	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	-	+	B-IV
28/06/2004	M	9 mois	- / -	- / (+)	-*	-*			-*						B
09/07/2004	M	2	+ / +	- / -	+	-	-	+	+	-	+	-			A-II
Hopital BICHAT, PARIS (n = 1)															
12/07/2004	M	37	- / -	+ / +	-	+			(+)						B

Case hâchurée : expérimentation non effectuée / NR : Non Renseigné / (+) : bande très faiblement marquée / * : double amplification

Tableau 16 : Résultats du génotypage des kystes de *Giardia lamblia* provenant de cas sporadiques diagnostiqués à l'hôpital militaire Legouest de Metz

Date	Patient		Résultats des différents génotypages												Résultat final
	Sexe	Age (années)	Laboratoire PCR (n = 2)		Amar *et al.* (2002) PCR		Amar *et al.* (2002) RFLP Rsa I		Read *et al.* (2004) PCR	Read *et al.* (2004) RFLP Nla IV			Read *et al.* (2004) RFLP Rsa I		
			A	B	A	B	A-I	A-II		A-I	A-II	B	B-III	B-IV	
Hôpital Militaire LEGOUEST, METZ (n = 8)															
18/06/2001	NR	NR	+ / +	- / -	+*	-*	-	-	-						A
03/2002	NR	NR	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
18/05/2004	NR	NR	- / -	+ / +	-	+			-*						B
1/06/2004	NR	NR	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
1/06/2004	NR	NR	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	-	+	B-IV
1/06/2004	NR	NR	+ / +	- / -	+	-	-	+	+*	-	+	-			A-II
1/09/2004	F	22	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
1/09/2004	M	24	- / -	+ / +	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III

Case hâchurée : expérimentation non effectuée / NR : Non Renseigné / * : double amplification

1.3- Génotypage de cas regroupés de giardiose.

Lors de notre étude, 16 échantillons de selles provenant de l'hôpital militaire Legouest sont analysés. Les patients sont des gendarmes de la même unité revenant d'une mission en Côte d'Ivoire. Parmi ces échantillons, 15 ont pu être analysés par PCR et PCR-RFLP.

Un échantillon est négatif avec les trois méthodes, les 14 autres prélèvements sont classés dans le génotype B d'après la méthode développée au laboratoire et celle de Amar *et al.* (2002). L'utilisation de la PCR-RFLP développée par Read *et al.* (2004) montre que tous ces échantillons appartiennent au sous-génotype B-III. Les résultats détaillés obtenus au cours des différentes PCR et digestions enzymatiques sont présentés dans le tableau **18** (page 196).

En résumé,

Contrairement à ce qui est observé pour les prélèvements environnementaux, le génotype B et plus fréquemment isolé que le génotype A dans les échantillons de selles humaines. En effet, le génotype B constitue 64 % des 25 échantillons positifs (n = 26) pour les cas sporadiques ainsi que la totalité des 14 cas regroupés de giardiose positifs par PCR. De plus, nous pouvons noter que le génotype B-III est isolé dans 32 % des cas sporadiques ainsi que pour l'ensemble des cas regroupés.

Au niveau de la sensibilité des différents systèmes PCR utilisés au cours de ces expérimentations, des différences sont observées au niveau de l'analyse des cas sporadiques. Ainsi, les amorces sélectionnées lors de notre étude et les amorces publiées par Amar *et al.* (2002) ciblent le gène de la TPI et permettent d'obtenir 92 % à 96 % d'échantillons positifs. Par contre, les amorces proposées par Read *et al.* (2004) sont spécifiques du gène de la GDH et détectent seulement 80 % d'échantillons positifs.

Tableau 18 : Résultats du génotypage des kystes de *Giardia lamblia* provenant de cas regroupés, diagnostiqués à l'hôpital militaire Legouest de Metz

Date	Patient		Résultats des différents génotypages											Résultat final
	Sexe	Age (années)	Laboratoire PCR (n = 2)		Amar *et al.* (2002) PCR		RFLP Rsa I		Read *et al.* (2004) PCR	RFLP Nla IV			RFLP Rsa I		
			A	B	A	B	A-I	A-II		A-I	A-II	B	B-III	B-IV	
Hôpital Militaire LEGOUEST, METZ (n = 15)															
5/05/2004	M	29	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	35	- / -	- / -	-	-			-						Négatif
	M	38	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	23	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	31	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	27	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	29	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	24	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	31	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	29	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	50	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	25	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	28	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	31	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III
	M	36	-	+	-	+			+	-	-	+	+	-	B-III

Case hâchurée : expérimentation non effectuée

Discussion

Actuellement, la détection des kystes de *Giardia* dans les échantillons biologiques ou environnementaux est classiquement réalisée par observation microscopique. L'immunofluorescence est considérée comme la technique de référence pour la mise en évidence de ce protozoaire parasite, notamment dans les eaux environnementales. Parmi les six espèces appartenant au genre *Giardia*, *G. lamblia* est isolée chez l'Homme et de nombreux mammifères et *G. muris* est spécifique des rongeurs. De plus, seuls les génotypes A et B de *Giardia lamblia* sont considérés comme pathogènes pour l'Homme et l'immunofluorescence est une technique longue, fastidieuse qui présente également l'inconvénient majeur de ne pas permettre la distinction au niveau de espèces et des génotypes.

Notre objectif était alors de développer une technique capable de détecter et de quantifier les kystes de ce protozoaire de façon rapide, sensible, mais aussi de pouvoir distinguer de façon spécifique d'une part les espèces *Giardia lamblia* et *Giardia muris* et d'autre part les génotypes composant l'espèce *Giardia lamblia*, dans des prélèvements biologiques et environnementaux. Lors de notre étude, nous avons choisi de mettre au point des systèmes d'analyse basés sur la détection spécifique du génome par PCR qualitative et PCR en temps réel, en effectuant en parallèle une détection par immunofluorescence. Contrairement à la PCR qualitative qui correspond à une détection en fin d'amplification, la technique en temps réel permet la quantification des acides nucléiques initialement présents dans un échantillon grâce au suivi de chaque cycle d'amplification. Lors de la mise en place de ces expérimentations, aucune étude n'était publiée sur la détection de *Giardia* par PCR en temps réel et seulement quelques travaux reportaient l'utilisation de cette technique pour la mise en évidence d'un autre protozoaire parasite, *Cryptosporidium*.

La mise en œuvre de ces expérimentations a nécessité, au préalable, la comparaison et la sélection des cibles envisageables pour la réalisation de notre étude à partir des données bibliographiques et des séquences référencées. Le développement et la validation de l'ensemble des systèmes de détection ont été réalisés à partir de kystes de *Giardia* en suspensions purifiées. L'adaptation de ces techniques de détection à l'analyse d'eaux usées naturellement contaminées par ce protozoaire a été réalisée par l'évaluation de techniques de concentration et de purification des kystes de *Giardia*, mais aussi de protocoles d'extraction de l'ADN.

Le protocole résultant de ces différentes étapes a alors permis d'évaluer la concentration en kystes de *Giardia lamblia* par PCR en temps réel dans des eaux usées caractérisées notamment par l'origine de leur contamination fécale, en parallèle de l'analyse par immunofluorescence. Une analyse plus précise de ces prélèvements a également pu être effectuée grâce aux systèmes permettant la détection spécifique de quatre génotypes de *Giardia lamblia*, dont deux sont pathogènes pour l'Homme. En parallèle de l'analyse de ces prélèvements environnementaux, les systèmes PCR spécifiques des génotypes A et B pathogènes pour l'Homme nous ont permis de génotyper 26 cas de giardiase sporadiques, mais aussi 15 cas regroupés.

Sélection des gènes cibles

L'étape de sélection des gènes cibles constituait la base de notre étude puisque les amorces et les sondes devaient autoriser soit la détection spécifique de *Giardia lamblia* et *Giardia muris*, soit la distinction entre les génotypes de *G. lamblia*. Dans le premier cas, nous recherchions un gène cible dont les séquences présentaient

une fréquence de variations entre les espèces du genre *Giardia* suffisante pour permettre la sélection de systèmes d'amplification spécifiques, soit de *Giardia muris*, soit de l'ensemble des génotypes de *Giardia lamblia*. Dans le deuxième cas, le gène cible devait être caractérisé par un niveau d'hétérogénéité relativement élevé et autorisant alors la sélection de systèmes d'amplification qui soient spécifiques d'un seul génotype de l'espèce *G. lamblia*. Lors de la mise en place de notre étude, des séquences étaient disponibles dans la base de données Genbank pour plusieurs espèces et génotypes composant le genre *Giardia* pour quatre gènes : ARNr 18S, TPI, EF1A et GDH.

Seul l'ARNr 18S était séquencé pour cinq espèces dont *G. lamblia* et *G. muris*, et aurait pu constituer une cible idéale. Weiss *et al.* (1992) constatent que l'amplification de cette cible par PCR qualitative nécessite une modification des conditions d'amplification avec incorporation de glycérol et de DMSO dans le milieu réactionnel. Weiss *et al.* (1992) justifient ces modifications des conditions d'amplification par le pourcentage élevé de bases G et C (GC %) contenu dans cette séquence et par la présence possible de structures secondaires stables. En utilisant des conditions d'amplification identiques, Rochelle *et al.* (1997) ne parviennent pas à détecter des kystes de *Giardia* dans des eaux usées après dopage. Johnson *et al.* (2003) constatent également que l'addition de DMSO (6 %) dans le milieu réactionnel est indispensable pour la détection de trophozoïtes appartenant aux génotypes A et B en suspensions purifiées. Une des conditions pour la sélection d'amorces et de sondes est d'éviter les répétitions de bases identiques afin de limiter la formation de dimères d'amorces et de diminuer le risque de quenching de la fluorescence notamment pour la guanine. Les essais réalisés sur cette cible avec le logiciel Primer Express n'ont pas permis de sélectionner un système d'amplification respectant ces contraintes. Les données de la littérature ainsi que nos observations lors de l'étape de sélection d'amorces et de sondes pour l'amplification de l'ARNr 18S ont alors conduit à l'abandon de cette cible.

Le gène de la GDH n'était séquencé que pour deux espèces : *G. lamblia*, et *G. ardeae* ; les gènes de l'EF1A et de la TPI étaient séquencés pour une espèce supplémentaire : *G. muris*. Les alignements de séquences et les arbres phylogénétiques réalisés pour les gènes de l'EF1A et de la TPI ont permis de montrer que l'EF1A pouvait être utilisé comme cible pour distinguer les espèces *Giardia lamblia* et *Giardia muris*, alors que la plus grande hétérogénéité des séquences de la TPI permettait de réaliser une détection au niveau des génotypes de *Giardia lamblia*. Lors de l'analyse d'isolats humains appartenant aux génotypes A et B, Lu *et al.* (2002) observent 23 % de divergence de séquence pour le gène de la TPI alors que Weiss *et al.* (1992) relèvent seulement 0,5 % de variation de séquence pour le gène de l'ARNr 18S. Monis *et al.* (1999) comparent le niveau d'évolution des gènes de la TPI, de l'EF1A et de la GDH et constatent que le gène de la TPI est le moins conservé des trois et présente ainsi le plus haut niveau d'hétérogénéité de séquence entre les différents génotypes de l'espèce *G. lamblia*. Amar *et al.* (2002) utilisent la TPI pour génotyper des kystes de *Giardia* isolés de selles humaines. Sulaiman *et al.* (2003) utilisent également cette séquence pour comparer, par séquençage, des kystes provenant de selles humaines et animales. En utilisant l'ARNr 18S, l'EF1A et la TPI pour comparer des isolats d'origine humaine et animale, Traub *et al.* (2004) concluent que la TPI constitue un gène plus approprié pour distinguer les différents génotypes de *Giardia lamblia*.

Des études publiées récemment par Caccio *et al.* (2002 et 2003) et Guy *et al.* (2003 et 2004) sont basées sur la détection du gène de la β-giardine qui est une protéine spécifique de *Giardia*. Au vu du faible

nombre de séquences disponibles pour cette cible, ces équipes ont été amenées à effectuer une étape de séquençage soit pour mettre en évidence des sites de restriction pour une détection par PCR-RFLP, soit pour sélectionner des systèmes d'amplification permettant une quantification spécifique des génotypes A et B de *Giardia lamblia*. La réalisation d'une étape de séquençage pour le développement de PCR nécessite toutefois de disposer d'un nombre suffisant d'isolats provenant de différentes espèces du genre *Giardia*, mais aussi de différents génotypes de *G. lamblia*. Suite au séquençage d'un fragment de la β-giardine pour 83 isolats humains et animaux, Lalle *et al.* (2005) montrent que cette cible permet de distinguer les sept génotypes de *G. lamblia*.

Evaluation des systèmes d'amplification sur des kystes en suspensions purifiées

Suite au choix des deux cibles et des systèmes PCR destinés soit à la quantification des kystes de *G. lamblia* ou de *G. muris* pour le gène de l'EF1A, soit à la détection spécifique de quatre génotypes de *G. lamblia* pour le gène de la TPI, les étapes d'extraction de l'ADN et d'amplification par PCR sont optimisées et évaluées à partir de suspensions purifiées de kystes.

L'évaluation de la spécificité des amorces et des sondes constituait une étape majeure de notre étude puisque ces systèmes étaient destinés à la détection des espèces *Giardia lamblia* et *Giardia muris* mais aussi des génotypes de *G. lamblia* dans des eaux usées et des selles. La spécificité des différents systèmes a été évaluée d'une part en faisant appel à la recherche BLAST qui est basée sur les séquences référencées dans la base de données Genbank et d'autre part en utilisant la PCR. Ces deux étapes ont permis de conclure que les systèmes permettant la détection des génotypes A et B de *Giardia lamblia* et de l'espèce *Giardia muris* étaient spécifiques de leur cible. Par contre, la PCRq-*lamblia* ne détecte pas uniquement les kystes de *G. lamblia* et peut également amplifier l'ADN de *G. ardeae*. Lors de cette étude, il n'a pas été possible d'obtenir des kystes appartenant aux espèces *G. microti*, *G. psittaci* et *G. agilis* pour lesquelles aucun fragment n'est actuellement séquencé pour le gène de l'EF1A. Ainsi, les amorces et les sondes n'ont pas été testées par PCR sur ces espèces isolées chez des rongeurs sauvages (rats musqués, campagnols), des oiseaux et des amphibiens. Si la possibilité d'une contamination par des fèces provenant de ces animaux ne doit pas être totalement écartée, elle peut certainement être considérée comme mineure pour des eaux usées domestiques ou provenant d'un abattoir. Etant donné que les PCRq-*lamblia* et PCRq-*muris* utilisent les mêmes amorces sens et antisens, nous avons également évalué l'impact de la présence de kystes de *G. muris* sur les étapes d'extraction de l'ADN et d'amplification des kystes de *G. lamblia*. Nous avons alors remarqué une influence de la présence de *G. muris* pour un ratio *G. muris/G. lamblia* supérieur à 100. L'utilisation de la PCRq-*lamblia* permettra d'augmenter la spécificité de détection par rapport à l'immunofluorescence et de réaliser une première évaluation de la PCR en temps réel pour la détection de ce protozoaire dans des prélèvements environnementaux.

Johnson *et al.* (2003) valident la spécificité de leurs systèmes PCR destinés à la quantification des génotypes A et B de *G. lamblia* en les testant sur les génotypes B et A respectivement. Par contre, en utilisant le test BLAST, nous constatons que ces deux PCR quantitatives qui utilisent l'ARNr 18S comme cible, peuvent détecter d'autres génotypes de *G. lamblia* et la PCR destinée au génotype B amplifie également l'ADN de *G. microti*. Verweij *et al.* (2003) utilisent également l'ARNr 18S comme cible pour la quantification des kystes de

G. lamblia dans des selles humaines, toutefois le test BLAST conclut que le système proposé dans cette étude amplifie également l'ADN de *G. microti*. De plus, l'amorce sens ne présente pas une homologie complète avec l'ensemble des séquences appartenant à *G. lamblia*. Enfin, Guy *et al.* (2003 et 2004) utilisent deux PCR en temps réel basées sur le gène de la β-giardine pour quantifier les génotypes A et B dans des eaux usées et des selles. Ils constatent alors que la PCR destinée à la détection du génotype B peut également amplifier l'ADN de *G. muris* ou du génotype A de *G. lamblia* mais avec des valeurs de Ct (cycle seuil) nettement plus élevées. Ils concluent alors que la présence d'ADN appartenant à ce génotype ou à cette espèce ne devrait pas modifier la sensibilité de détection du génotype B. Par conséquent, le développement de systèmes de détection spécifiques nécessitent de disposer d'un nombre de séquences suffisant mais aussi d'outils de contrôles appropriés. Ainsi, Baruch *et al.* (1996) effectuent le séquençage du gène de la TPI à partir d'isolats appartenant aux génotypes A et B pour développer une PCR-RFLP permettant la distinction de ces deux génotypes lors de l'étape de restriction enzymatique, ils proposent alors cette technique pour étudier notamment la transmission zoonotique de *G. lamblia*. Le séquençage de ce gène pour d'autres génotypes de *G. lamblia* ou d'autres espèces du genre *Giardia* ont ensuite montré le manque de spécificité de cette technique (Monis et Andrews, 1998).

La deuxième partie des expérimentation réalisées à partir de suspensions purifiées a porté sur l'évaluation de la sensibilité de détection. Nous avons alors observé des différences importantes au niveau de la sensibilité des différents systèmes d'amplification par PCR en temps réel. Ainsi, la PCRq-*lamblia* et la PCRq-*muris* présentent respectivement une sensibilité de 0,45 et 45 kystes par réaction d'amplification. Les valeurs de sensibilité des PCRq-A et PCRq-B sont plus proches et correspondent respectivement à 3 et 4,5 kystes par réaction. Par PCR en temps réel, Verweij *et al.* (2003) observent une sensibilité équivalente à 0,5 kyste par réaction et Guy *et al.* (2003) détectent jusqu'à 0,1 kyste par réaction. Johnson *et al.* (2003) obtiennent une sensibilité de détection de 87 et 63 trophozoïtes par réaction pour les génotypes A et B respectivement. Ainsi, hormis pour le système PCRq-*muris*, les systèmes de PCR en temps réel développés lors de notre étude présentent une sensibilité satisfaisante par rapport aux données de la littérature. Concernant les PCR qualitatives, seule la sensibilité des PCR destinées à la détection des génotypes A et B de *G. lamblia* est testée puisque nous n'avons pas pu obtenir des suspensions purifiées de kystes appartenant aux génotypes C et E. La sensibilité de ces PCR est alors de 6 et 4,5 kystes par réaction pour les génotypes A et B respectivement. Mahbubani *et al.* (1991, 1992) font appel à la PCR couplée à une détection par Southern-blot et obtiennent une sensibilité équivalente à un kyste par réaction pour des suspensions purifiées. Rochelle *et al.* (1997) utilisent la même technique associant la PCR à une révélation par hybridation avec une sonde moléculaire radio-marquée pour des kystes en suspension purifiée et observent une sensibilité comprise entre 1 et 10 kystes par réaction suivant le couple d'amorces utilisé.

En fonction du protocole de concentration-purification des kystes de *Giardia* utilisé pour les prélèvements d'eaux usées et d'après les valeurs de sensibilité observées avec des suspensions purifiées, une sensibilité de 180 kystes de *Giardia lamblia*.L^{-1} d'eau usée pourra être atteinte. Par contre, pour la PCRq-*muris*, la sensibilité sera de $1,8.10^4$ kystes.L^{-1}. La faible sensibilité de détection des kystes de *G. muris* malgré l'optimisation des conditions d'extraction de l'ADN et d'amplification, ainsi que l'absence de variations de

séquence par rapport à la séquence référencée ont conduit à l'abandon de cette PCR pour la suite de nos expérimentations. Les PCR en temps réel destinées à la quantification des génotypes A et B de *G. lamblia* permettront de détecter respectivement $1,25.10^3$ et $1,8.10^3$ kystes.L^{-1} d'eau usée. Mahbubani *et al.* (1998) font appel à un protocole associant une séparation immunomagnétique des kystes à une étape de lyse de leur paroi par des cycles de congélation / décongélation en présence de Chelex-100 et obtiennent une sensibilité comprise entre 3 et 3.10^2 kystes.mL^{-1} à partir de concentrats d'eau de rivière dopés en kystes. En utilisant des conditions expérimentales similaires, Rimhanen-Finne *et al.* (2002) obtiennent un seuil de détection de 50 kystes pour 2 L d'eau de surface après dopage. D'après les données de la littérature, les concentrations en kystes de *Giardia* relevées pour les eaux usées brutes, en France, sont globalement comprises 10^2 et 10^4 kystes.L^{-1}. Une étude réalisée en 1991 par Gassman et Schwartzbrod sur des échantillons d'eaux usées à l'entrée de la station d'épuration de Nancy, a abouti à des concentrations comprises entre 8.10^2 et $1,4.10^4$ kystes.L^{-1}. Ainsi, nos systèmes d'amplification au niveau des espèces et des génotypes devraient permettre de détecter les kystes appartenant à l'espèce *G. lamblia* et aux génotypes A et B dans les eaux usées.

La pente de la droite standard de la PCRq-*lamblia* est - 3,34, ce qui correspond à un rendement de 99 %. Pour les PCRq-A et PCRq-B, les pentes des droites standard ont pour valeur - 4,00 et - 3,50 respectivement, ce qui correspond à des rendements de 78 % et 93 %. Pour les droites standard des PCR en temps réel spécifiques de génotypes A et B développées lors de leur étude, Johnson *et al.* (2003) observent des valeurs de pente de - 3,61 et - 3,80 correspondant à des rendements d'amplification de 89 % et 83 % respectivement. Lors de leurs expérimentations, Guy *et al.* (2003) développent une PCR en temps réel pour la détection de *Giardia lamblia* qui est évaluée seule (PCR simplex) puis associée à une PCR permettant la quantification de *Cryptosporidium parvum* (PCR multiplex). L'utilisation de cette PCR en détection multiplex entraîne alors un passage du rendement de l'amplification de 99 à 80 %.

Concernant les trois PCR en temps réel, les coefficients de variation sont compris entre 0,8 et 2,1 % pour la variation intra-essai de l'étape d'amplification et ils s'échelonnent entre 0,5 et 2,4 % pour la variation inter-essai. Pour l'étape d'extraction de l'ADN, la variation inter-essai a été évaluée avec la PCRq-*lamblia*, les valeurs des coefficients de variation varient de 1,43 à 2,86 %. Fontaine et Guillot (2003) observent des coefficients de variation compris entre 0,14 et 2,6 % pour la variation intra-essai et qui varient de 0,7 à 2 % pour la variation inter-essai de l'amplification pour une PCR en temps réel spécifique de *Cryptosporidium parvum*.

Cette étape réalisée à partir de kystes en suspensions purifiées a permis de valider les PCR en temps réel destinées à la détection de *G. lamblia* et des génotypes A et B. Nous disposons également de couples d'amorces permettant la mise en évidence des génotypes C et E.

Adaptation des techniques de détection à l'analyse d'eaux usées

La deuxième phase de nos expérimentations a porté sur la comparaison de techniques de concentration et de purification des kystes de *Giardia* à partir d'eaux usées, mais aussi sur l'optimisation du protocole d'extraction de l'ADN. En effet, les eaux usées sont caractérisées par une turbidité élevée et de fortes concentrations en débris mais aussi en inhibiteurs de PCR. Lors de la détection par immunofluorescence, les

débris présents dans ces prélèvements peuvent masquer les kystes de *Giardia* ou entraîner un bruit de fond élevé dû à un défaut de spécificité des anticorps. Un niveau de purification insuffisant peut également s'avérer préjudiciable au niveau de l'extraction des acides nucléiques et de leur détection par PCR. La présence de débris peut ainsi diminuer le rendement de l'extraction des acides nucléiques au niveau de l'étape de lyse de la paroi des kystes. De plus, l'étape d'amplification par PCR est sensible à de nombreux inhibiteurs qui peuvent être encore présents suite à l'étape d'extraction.

La centrifugation est la méthode couramment appliquée pour la concentration des kystes à partir de prélèvements d'eaux usées. Par contre, la floculation n'est décrite que dans quelques publications (Grimason *et al.* 1996 ; Ho *et al.*, 1995 ; Wiandt *et al.*, 1995 et 1998). Wiandt *et al.* (1995) comparent ces deux méthodes à une concentration par simple sédimentation sur des prélèvements d'eaux usées brutes et observent des concentrations significativement plus élevées en kystes de *Giardia* par centrifugation ou floculation. Lors de notre étude, nous constatons que les concentrations observées par immunofluorescence pour la totalité des kystes et ceux contenant leurs noyaux sont plus élevées par centrifugation en comparaison avec la floculation au carbonate de calcium pour deux prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy (n=3). Suite à ces expérimentations, la concentration des kystes de *Giardia* est réalisée par centrifugation (2000 g, 15 min) pour l'analyse des eaux usées par immunofluorescence et par PCR.

Les techniques de purification des kystes à partir d'eaux usées ont également constitué une étape importante de nos expérimentations. Parmi les techniques basées sur la densité des micro-organismes à purifier, la flottation sur solution de Percoll™-saccharose (densité : 1,10) est considérée comme étant la méthode de référence pour la purification des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium* à partir de prélèvements environnementaux. LeChevallier *et al.* (1995) observent un rendement de 100 % à partir de concentrats d'eau de rivière dopés en kystes de *Giardia*, pour une solution de Percoll™-saccharose de densité 1,10. Lors de notre étude, nous avons comparé cette technique avec un protocole basé sur un gradient de saccharose afin d'établir un protocole permettant la détection des kystes de *Giardia* par immunofluorescence dans des eaux usées. Ces deux techniques, précédées par une séparation diphasique au FEA (Formaldéhyde-Acétate d'éthyle), ont été comparées sur des prélèvements d'eaux usées de la station d'épuration de Nancy. La purification par flottation permet globalement d'obtenir des concentrations totales et des concentrations en kystes contenant leurs noyaux qui sont plus élevées que le gradient de densité. La technique basée sur le gradient de densité s'avère plus performante au niveau de la diminution de la turbidité, mais semble difficilement applicable à des échantillons très turbides comme les eaux usées d'abattoir qui nécessiteraient la répartition d'un même échantillon sur plusieurs gradients. Cette première comparaison nous a conduit à sélectionner un protocole composé d'une séparation au FEA suivi par une flottation sur solution de Percoll™-saccharose pour l'analyse des échantillons par immunofluorescence.

Au niveau de la détection par PCR, nous avons tout d'abord évalué l'impact de différentes variantes de notre protocole d'extraction des acides nucléiques testé initialement sur des suspensions purifiées. Au cours d'expérimentations réalisées par Maux *et al.* (2002), le protocole non modifié a permis d'obtenir une sensibilité

équivalente à un kyste par réaction à partir de selles humaines naturellement contaminées. Parmi les modifications apportées au protocole initial, la répétition des étapes de digestion des protéines et de purification des acides nucléiques sur colonne de silice s'est avérée être la plus performante. Le protocole d'extraction optimisé au niveau de l'ensemble des étapes de lyse des kystes, d'adsorption des inhibiteurs et surtout de digestion des protéines et de purification sur colonne a alors été retenu pour la suite de nos expérimentations.

Afin de pouvoir transférer la détection par PCR en temps réel à l'analyse de prélèvements d'eaux usées, nous avons évalué d'une part des techniques de purification des kystes de *Giardia* et d'autre part des procédés dont l'objectif est d'optimiser la détection des acides nucléiques en présence de débris ou d'inhibiteurs de PCR.

Concernant les techniques de purification basées sur la taille et la densité des kystes de *Giardia*, nous avons comparé la filtration, la flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10) et trois méthodes utilisant un gradient de densité de saccharose, de bromure de potassium ou de Nycodenz. Parmi ces quatre techniques de purification testées par PCR en temps réel sur des prélèvements d'eaux usées de la station de Nancy, la flottation sur solution de Percoll™-saccharose a permis d'obtenir les concentrations en kystes les plus élevées. Lors de la comparaison de techniques de purification d'oocystes de *Cryptosporidium* à partir de matrices environnementales de turbidité élevée (floculats d'eau de rivière et d'eau usée, boues résiduaires), Chesnot et Schwartzbrod (2004) constatent que la flottation sur solution de Percoll™-saccharose est une méthode intéressante par rapport au critère de rendement de récupération. Par contre, en prenant également en compte le niveau de purification de l'échantillon par mesure de la turbidité, les gradients de Nycodenz ou de bromure de potassium devraient être privilégiés. Lors de nos expérimentations, des concentrations trop faibles en kystes de *Giardia* dans ces échantillons non dopés pourraient expliquer l'absence d'amplification par PCR en utilisant ces techniques basées sur les gradients de densité.

Nous avons également évalué l'intérêt de procédés visant soit à limiter l'effet de composés inhibiteurs de la PCR, soit à optimiser la lyse de la paroi des kystes en présence de fortes concentrations en débris. Les réactifs visant à limiter l'effet des composés inhibiteurs de la PCR peuvent être utilisés lors de l'extraction des acides nucléiques ou pendant leur amplification. Lors de notre étude, la BSA, le glycérol et le DMSO incorporés dans le milieu réactionnel de la PCR, n'ont pas permis d'augmenter la sensibilité de détection. Concernant les techniques visant à faciliter l'action des réactifs lors de la lyse des micro-organismes, nous avons évalué l'impact des ultrasons et de cycles de congélation-décongélation lors de l'analyse d'eaux usées au niveau de deux stations d'épuration et d'un abattoir. Ces procédés ont également été associés à des traitements par le Chelex-100 et la PVP-360. Le Chelex-100 est une résine échangeuse d'ions pouvant chélater les ions plurivalents, alors que la PVP-360 serait capable de piéger les molécules comportant un groupement phénolique présent notamment dans les acides humiques. Les ions divalents et les acides humiques sont parmi les principaux composés inhibiteurs de la PCR décrits lors de l'analyse de prélèvements environnementaux. L'utilisation de cycles de congélation-décongélation en présence de Chelex-100 est une technique couramment utilisée lors de l'analyse de prélèvements environnementaux par PCR (Mahbubani *et al.*, 1998 ; Rimhanen-Finne *et al.*, 2001 ; Quintero-Betancourt *et al.*, 2003). L'hétérogénéité des résultats en fonction du type d'eau usée, rend délicate la sélection d'un protocole. Toutefois, nous avons constaté que les cycles de congélation-décongélation ne permettaient pas

d'augmenter la sensibilité de la PCR en temps réel. Par contre, le traitement par les ultrasons permettait d'augmenter la quantité d'ADN détectée pour l'ensemble des prélèvements. Pour les eaux usées provenant de la station d'épuration de Metz et correspondant à une contamination domestique et industrielle, le Chelex-100 permettait d'augmenter les concentrations obtenues par PCR lors de son utilisation seule ou en association avec le PVP-360 durant l'étape d'extraction de l'ADN. Guy *et al.* (2003) constatent que l'utilisation des ultrasons permet une forte augmentation du rendement de l'extraction. Ainsi, le pourcentage d'ADN récupéré est estimé à 20 % pour le protocole non modifié alors qu'il est de 80 % suite à l'utilisation des ultrasons. Lors de cette étude, le rendement de l'extraction est évalué par quantification avant l'étape d'amplification pour des suspensions purifiées contenant $1{,}5.10^5$ kystes par analyse. Lors de l'analyse d'eaux prélevées dans des lacs et d'eaux usées, ces auteurs observent que l'utilisation d'une étape supplémentaire faisant appel au Chelex-100 et à la PVP-360 est indispensable à l'analyse par PCR en temps réel. Toutefois, Guy *et al.* (2003) n'utilisent aucune technique de purification des kystes, l'extraction de l'ADN est effectuée directement après l'étape de concentration par centrifugation. Le traitement par PVP a également été utilisé pour le génotypage d'oocystes de *Cryptosporidium* à partir de selles non purifiées (McLauchlin *et al.*, 1999). Lors de notre étude, les ultrasons, les cycles de congélation-décongélation ou les traitements par Chelex-100 et PVP-360 ont été évalués suite à une étape de purification des kystes par flottation sur solution de Percoll™-saccharose.

Au vu de la faible amélioration obtenue avec ces traitements, nous avons évalué l'intérêt d'une séparation à l'acétate d'éthyle en amont d'une purification par flottation. En effet, lors de la purification des kystes par flottation sur une solution de Percoll™-saccharose, nous avons observé une accumulation de débris à l'interface entre l'échantillon à purifier et la solution de densité 1,10 plus importante en l'absence de la séparation au FEA qui est utilisée pour l'analyse par immunofluorescence. Cette accumulation de débris, très marquée pour les eaux usées provenant de l'abattoir, entraîne une diminution du rendement de purification de la flottation. Etant donné que le formaldéhyde est un composé inhibiteur de la PCR (Higgins *et al.*, 2001), nous avons utilisé un protocole de séparation à l'acétate d'éthyle basé sur la technique FEA. Cette séparation à l'acétate d'éthyle a permis de diminuer fortement le volume de culot avant extraction des acides nucléiques et surtout d'obtenir des concentrations nettement plus élevées par PCR en temps réel, pour l'ensemble des prélèvements d'eaux usées. Chesnot et Schwartzbrod (2004) observent une forte diminution du rendement de récupération des oocystes de *Cryptosporidium* lors de la séparation FEA. Toutefois, l'utilisation de cette technique de séparation diphasique pour l'immunofluorescence et la PCR nous a permis de détecter des kystes de *Giardia* dans l'ensemble des échantillons et surtout d'augmenter la sensibilité de la détection par PCR à partir de ces échantillons caractérisés notamment par une turbidité élevée.

La séparation immunomagnétique (IMS) est actuellement la technique de référence pour la purification des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium* à partir d'eau de surface, d'eau potable et d'eaux usées traitées (AFNOR, 2001 ; US-EPA, 2001). Cette technique est également utilisée pour la détection de ces protozoaires par PCR à partir d'eaux de rivière (Fontaine et Guillot, 2003 ; Mahbubani *et al.*, 1998). Toutefois, l'IMS est sensible à des concentrations trop élevées en débris, mais aussi en fer dissous (Yakub et Stadterman-Knauer, 2000). Rimhanen-Finne *et al.* (2001) utilisent cette technique pour la purification de kystes à partir de boues résiduaires à 10 % dans de l'eau désionisée, la sensibilité de l'ensemble du protocole est alors équivalente à

125 kystes.mL^{-1} et 20 % des échantillons sont positifs. Toutefois, ces échantillons ne sont pas analysés par immunofluorescence et aucun contrôle d'inhibition de la PCR n'est effectué. Fontaine et Guillot (2003) utilisent également l'IMS pour la détection d'oocystes de *Cryptosporidium* et observent une diminution du rendement de récupération lors de l'analyse d'eau de rivière. Durant nos expérimentations, l'IMS a été évaluée pour des eaux usées issues des deux stations d'épuration. La turbidité trop élevée de l'eau usée de l'abattoir ne permettait pas d'envisager son analyse par cette technique. Lors de la détection par PCR en temps réel, les concentrations en kystes de *G. lamblia* obtenues suite à l'IMS se sont avérées inférieures à celles résultant du protocole combinant la séparation à l'acétate d'éthyle et la flottation. La modification du protocole de l'IMS par une lyse directe des kystes à partir des complexes entre les billes et les kystes pourrait augmenter la sensibilité de détection (Fontaine *et al.*, 2003 ; Quintero-Bétancourt *et al.*, 2003 ; Rimhanen-Finne *et al.*, 2002). Toutefois, lors de notre étude les concentrations en kystes dont les noyaux sont visibles par marquage au PI étaient plus faibles après l'IMS en comparaison avec le protocole associant la séparation diphasique et la purification sur solution de Percoll™-saccharose.

Détection spécifique de Giardia lamblia et de ses génotypes par PCR

Suite au développement de protocoles adaptés à la détection des kystes de *Giardia* dans les eaux usées par immunofluorescence et PCR, nous avons analysé 12 séries de prélèvements provenant de trois sites caractérisés notamment par l'origine de leur contamination fécale. La PCR en temps réel a permis de détecter d'une part l'ensemble des kystes appartenant à l'espèce *Giardia lamblia* et d'autre part les génotypes A et B. La détection des génotypes C et E de *G. lamblia* a été réalisée par PCR qualitative. Ces prélèvements ont également été analysés par immunofluorescence en parallèle de la détection par PCR.

Au niveau de la détection par immunofluorescence, aucune différence significative n'est observée pour les concentrations totales en kystes pour les trois sites. Concernant les concentrations en kystes dont les noyaux sont visibles, les valeurs semblent plus élevées pour la station d'épuration de Metz, mais cette différence n'est pas significative. Les concentrations en kystes dont les noyaux sont visibles par marquage au PI sont significativement plus faibles que les concentrations totales uniquement pour les prélèvements effectués à l'abattoir de Metz.

Lors de l'analyse de ces prélèvements avec la PCRq-*lamblia*, les concentrations en kystes de *G. lamblia* observées pour la station d'épuration de Metz sont significativement plus élevées que celles obtenues pour la station d'épuration de Nancy et l'abattoir de Metz. Les concentrations observées par PCR en temps réel sont significativement inférieures aux concentrations totales et aux concentrations en kystes contenant leurs noyaux uniquement pour les eaux usées de la station d'épuration de Nancy.

Ces 12 séries de prélèvements ont ensuite été analysées de façon plus précise en effectuant la détection des génotypes A, B, C et E. Les génotypes A et B sont pathogènes pour l'Homme mais ils sont également isolés chez de nombreux mammifères, par contre les génotypes C et E sont considérés comme étant respectivement spécifiques des chiens et des animaux d'élevage.

La détection des génotypes A et B a été réalisée par PCR en temps réel pour l'ensemble des prélèvements. Le génoype A est alors mis en évidence dans 11 prélèvements de la station d'épuration de Nancy et dans la totalité des prélèvements de la station d'épuration de Metz. Par contre, seulement sept prélèvements issus de l'abattoir contiendraient le génotype A. Le génotype B semble moins fréquent que le génotype A et les valeurs observées sont proches de la limite de détection. Ainsi, nous avons observé respectivement cinq et onze prélèvements positifs pour les stations d'épuration de Nancy et de Metz, mais aucun prélèvement positif pour les eaux usées de l'abattoir. Les concentrations totales en kystes appartenant aux génotypes A et B de *G. lamblia* sont équivalentes aux concentrations totales en kystes de *Giardia lamblia* observées par immunofluorescence pour les deux stations d'épuration. Ainsi, la détection au niveau des génotypes n'entraînent pas de sous-estimation des concentrations en kystes lors de l'analyse des eaux usées. Lors de leur étude, Guy *et al.* (2003) comparent les concentrations totales observées par immunofluorescence et par PCR en temps réel pour les génotypes A et B dans des prélèvements d'eaux usées et concluent que les concentrations sont équivalentes pour les deux techniques. Ces auteurs observent également des concentrations plus élevées pour le génotype B dans les six prélèvements effectués sur deux sites. Caccio *et al.* (2003) détectent également les génotypes A et B dans des eaux usées mais utilisent la PCR-RFLP. Le génotype A est alors détecté dans les 16 échantillons provenant de quatre stations d'épuration et le génotype B n'est détecté que dans la moitié d'entre eux. Lors d'une étude réalisée par séquençage du gène de la TPI sur 131 échantillons d'eaux usées, Sulaiman *et al.* (2004) mettent en évidence une prédominance du génotype A qui est présent dans 85 % des cas alors que le génotype B est détecté dans 15 % des prélèvements, aucun de ces échantillons ne contient ces deux génotypes.

Concernant le génotype C, aucune amplification n'a été observée pour l'ensemble des prélèvements. La contamination des eaux usées par ce génotype ne peut être exclue, mais peut certainement être considérée comme mineure par rapport aux génotypes A et B. Par contre, les amorces spécifiques du génotype E ont permis d'obtenir un signal pour 11 prélèvements provenant de l'abattoir de Metz dont la contamination est essentiellement due à des selles de bovins. Le prélèvement négatif pour le génotype E est celui pour lequel la PCRq-*lamblia* aboutit à la plus faible concentration en kystes de *G. lamblia*. Aucune amplification n'a été observée pour ce génotype E à partir des prélèvements issus des stations d'épuration. Le volume d'eau usée provenant de l'abattoir est 400 m^3 par jour alors que la station d'épuration de Metz reçoit un volume global de 60 000 m^3 d'eau usée par jour. Ainsi, les eaux usées de l'abattoir constituent moins de 1 % des effluents traités au niveau de la station d'épuration de Metz. La dilution des effluents de l'abattoir par les eaux résiduaires d'origine domestique et industrielle explique certainement l'absence de détection du génotype E dans les prélèvements effectués au niveau de la station d'épuration de Metz. Lors de l'analyse d'eaux usées contaminées exclusivement par des selles d'animaux d'élevage, nous avons mis en évidence la présence du génotype E spécifique de ces animaux mais aussi du génotype A pathogène pour l'Homme. Ainsi, les animaux d'élevage pourrait constituer un réservoir en kystes de *Giardia lamblia* potentiellement pathogènes pour l'Homme. D'après notre étude bibliographique, 75 % des isolats prélevés chez des bovins correspondent au génotype E et le génotype A constitue le génotype le plus fréquent pour les autres échantillons. Peu d'études réalisent la détection des génotypes A et B dans des prélèvements environnementaux et aucune ne détecte d'autres génotypes de *G. lamblia*.

Lors de cette étude, nous avons pu effectuer le génotypage de kystes de *Giardia lamblia* isolés à partir de selles humaines. Actuellement, aucune étude ne reporte ce type d'analyse pour des cas de giardiose diagnostiqués en France. Parmi les 41 prélèvements analysés, 26 sont des cas sporadiques de giardiose provenant de quatre hôpitaux et 15 sont des cas regroupés, diagnostiqués à l'hôpital militaire de Metz pour lesquels la contamination n'a pas eu lieu en France. En effet, les patients qui correspondent à ces cas regroupés sont des gendarmes de la même unité revenant d'une mission en Côte d'Ivoire.

Les amorces sélectionnées au cours de notre étude pour le génotypage des kystes de *Giardia* isolés à partir de ces différents échantillons, ont également été utilisées pour la détection par PCR en temps réel dans les prélèvements d'eaux usées. Les résultats de ces deux PCR qualitatives ont été comparés avec ceux obtenus en faisant appel aux protocoles publiés par Amar *et al.* (2002) et Read *et al.* (2004). Nos amorces et celles proposées par Amar *et al.* (2002) détectent le gène de la TPI, alors que les amorces de Read *et al.* (2004) sont basées sur le gène de la GDH. Les deux systèmes d'amplification développés au laboratoire, nous ont globalement permis d'obtenir 96 % d'échantillons positifs par rapport au diagnostic par microscopie. Les deux PCR qualitatives proposées par Amar *et al.* (2002) ont abouti à 92 % d'échantillons positifs, mais elles ont nécessité une amplification par double PCR pour huit échantillons. Lors de leurs travaux, Amar *et al.* (2002) observent 91,5 % d'échantillons positifs pour un nombre total de 59 échantillons en effectuant la détection par semi-nested PCR. Read *et al.* (2004) détectent l'ensemble des génotypes par semi-nested PCR, la distinction des génotypes est ensuite réalisée par une étape de restriction enzymatique. Ces amorces nous ont permis d'obtenir seulement 85 % de prélèvements positifs et la réalisation d'une double amplification a été nécessaire pour obtenir une amplification pour six échantillons. Lors de l'analyse de 104 selles positives par microscopie, Verweij *et al.* (2004) obtiennent 98 % d'échantillons positifs à *Giardia lamblia* par PCR en temps réel. Guy *et al.* (2004) utilisent deux PCR quantitatives utilisées dans une étude précédente pour l'analyse d'eaux usées (Guy *et al.*, 2003) et observent une amplification dans la totalité des cas mais cette analyse est réalisée sur seulement 15 échantillons de selles. Globalement, les couples d'amorces sélectionnés au laboratoire ainsi que ceux publiés par Amar *et al.* (2002), permettent d'obtenir une sensibilité satisfaisante alors que la PCR ciblant le gène de la GDH (Read *et al.*, 2004) semble moins performante.

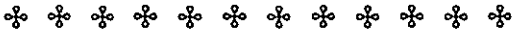
Au niveau de la répartition des génotypes A et B, les résultats obtenus avec les différents systèmes d'amplification sont concordants. Pour les cas sporadiques, nous avons observés 36 % de kystes pour le génotype A et 64 % de kystes pour le génotype B. D'après l'ensemble des données regroupées au cours de l'étude bibliographique, le génotype B apparaît également comme plus fréquent avec 59 % des cas sporadiques pour 12 publications. Au niveau des 15 cas regroupés, seul le génotype B est détecté. Lors de l'analyse de 24 échantillons provenant d'une épidémie dans une crèche britannique, Amar *et al.* (2002) identifient également le génotype B. De même, une autre étude reporte la présence de ce génotype B dans deux cas issus d'une épidémie d'origine alimentaire aux Etats-Unis (Sulaiman *et al.*, 2003). En se basant sur les travaux de Amar *et al.* (2002) et de Read *et al.* (2004), nous avons également pu réaliser une analyse plus précise en détectant les sous-génotypes A-I, A-II, B-III et B-IV par restriction enzymatique. Concernant les cas sporadiques, cette analyse n'a pas abouti pour 8 % des kystes appartenant au génotype A et pour 12 % des isolats correspondant au génotype B. Les sous-génotypes A-II et B-III représentent chacun 32 % des cas et le sous-génotype B-IV constitue 20 % des cas. En

revanche, le sous-génotype A-I n'est pas détecté. Pour les cas de giardiose regroupés, seul le sous-génotype B-III est mis en évidence et semble confirmer une contamination de ces 15 personnes par à une source commune. Actuellement, peu d'études réalisent une analyse aussi précise au niveau des génotypes. Ainsi, le protocole proposé par Amar *et al.* (2002) permet de détecter les génotypes A-I, A-II et B au cours de leurs travaux, mais il ne distingue pas les sous-génotypes B-III et B-IV.

Une étude récente a montré une prévalence de 85 % pour le génotype A pour des cas de giardiose symptomatiques (n=20), alors que pour des cas asymptomatiques le génotype B est prédominant avec une prévalence de 92 % (n=24) (Aydin *et al.*, 2004). Actuellement, les études prenant en compte le génotype et l'intensité des signes cliniques sont peu nombreuses et contradictoires (Homan et Mank, 2001; Read *et al.*, 2002). Guy *et al.* (2004) expliquent les différences de prévalence des génotypes A et B par des localisations géographiques variables suivant les populations étudiées. Dans le cadre de leurs expérimentations, ils constatent une prédominance du génotype B dans les eaux usées et les selles humaines. Par contre, lors de notre étude, le génotype B est plus fréquent pour les cas de giardiose sporadiques alors que l'analyse des eaux usées prélevées au niveau des stations d'épuration de Nancy et de Metz semble montrer une fréquence et des concentrations plus élevées pour le génotype A.

Les protocoles de concentration et de purification des kystes de *Giardia* ont permis d'appliquer la PCR en temps réel à l'analyse d'eaux usées caractérisées par une turbidité élevée et de fortes concentrations en composés inhibiteurs pour cette technique de détection. La réalisation de prélèvements sur différents sites sélectionnés notamment en fonction de l'origine de leur contamination fécale tend à montrer que la détection du génotype E signe une contamination due aux animaux d'élevage. La mise en évidence du génotype A dans les eaux usées d'abattoir montre que les animaux d'élevage peuvent également être considérés comme un réservoir en kystes de *Giardia* pathogènes pour l'Homme. Ainsi, la mise en évidence des génotypes A et B ne suffit pas à caractériser une contamination d'origine humaine. Ces techniques de génotypage au niveau des kystes de *Giardia* pourraient être associées à d'autres paramètres notamment la détection des bactériophages ARN-F spécifique du génotype II , mais aussi à la mesure du coprostanol et du ratio du coprostanol (coprostanol et épicoprostanol) afin d'évaluer l'origine humaine ou non-humaine de la contamination fécale (Blanch *et al.*, 2004). En se basant sur la norme AFNOR (2001) au niveau des étapes de concentration et de purification des kystes par filtration sur cartouche et séparation immunomagnétique, l'évaluation du niveau de contamination d'eaux environnementales faiblement turbides pourrait également être envisagée.

Conclusion



Dans les pays industrialisés, les épidémies d'origine hydrique à *Giardia*, *Cryptosporidium* et plus récemment à *Toxoplasma gondii* ont mis en évidence l'importance de ces protozoaires longtemps sous-estimés par rapport aux contaminations virales ou bactériennes. Ainsi, *Giardia* est responsable de plus de 100 épidémies d'origine hydrique aux Etats-Unis entre 1960 et 1994. Actuellement, il existe des méthodes de référence destinées à la détection des kystes de *Giardia* à partir d'eaux potables, d'eaux de surface ou d'eaux souterraines. Ces méthodes font appel à l'immunofluorescence au niveau de l'étape de détection des kystes, mais cette technique indique seulement le genre et ne permet de distinguer ni les six espèces qui constituent ce genre *Giardia*, ni les sept génotypes de *Giardia lamblia*. Par ailleurs, aucun de ces protocoles ne permet l'analyse de matrices complexes et notamment des eaux usées, or celles-ci constituent sans doute une des voies majeures de contamination des ressources hydriques environnementales par ce parasite intestinal.

Les objectifs de notre étude visent à apporter d'une part des informations qualitatives avec tout d'abord la détermination de l'espèce *G. lamblia* ou *G. muris*, puis une identification plus précise avec la recherche des génotypes et sous-génotypes ; d'autre part, des informations quantitatives concernant le niveau de contamination de différentes matrices environnementales. Cette étude est réalisée à partir de prélèvements environnementaux et biologiques, à savoir des eaux usées prélevées sur trois sites choisis en fonction de l'origine de leur contamination fécale et des selles humaines positives à *Giardia* par microscopie provenant de plusieurs hôpitaux français.

La première partie de notre étude, réalisée uniquement sur des suspensions purifiées de kystes, porte sur le développement de PCR en temps réel et de PCR qualitatives destinées à la détection spécifique de *G. lamblia*, *G. muris* et des principaux génotypes de *G. lamblia*. Parmi les suspensions purifiées utilisées dans le cadre de notre étude, les kystes de *G. muris* et du génotype B de *G. lamblia* correspondent à des souches référencées. Concernant le génotype A de *G. lamblia*, les kystes ont été purifiés au laboratoire. Par ailleurs, il ne nous a pas été possible d'obtenir des souches référencées pour les génotypes C et E, auprès d'autres équipes de recherche. Cette première étape a permis de définir les conditions d'amplification mais aussi de valider des systèmes PCR notamment au niveau de la sensibilité et de la spécificité qui constituent des points clés lors de l'analyse de prélèvements environnementaux. La PCRq-*lamblia* n'est pas entièrement spécifique de *G. lamblia* puisqu'elle permettrait également la détection de *G. ardeae*. Toutefois, la PCR en temps réel constitue une technique de détection plus rapide et plus spécifique de *G. lamblia* en comparaison avec l'immunofluorescence. Le niveau de sensibilité insuffisant de la PCRq-*muris* a conduit à son abandon pour la suite de nos expérimentations. Au final, ces expérimentations effectuées sur des kystes en suspensions purifiées ont abouti à la mise en place de trois systèmes de PCR en temps réel permettant d'une part de détecter de façon globale les kystes de *G. lamblia* et d'autre part les génotypes A et B pathogènes pour l'Homme, mais aussi pour de nombreux mammifères. L'originalité de notre étude repose également sur le développement de PCR analytiques spécifiques des génotypes C et E, isolés respectivement chez des animaux domestiques et d'élevage.

La deuxième partie de notre étude réalisée uniquement sur des prélèvements d'eaux usées visait à développer des protocoles de concentration-purification des kystes adaptés à l'analyse par immunofluorescence

et surtout par PCR. Les techniques de biologie moléculaire présentent les avantages majeurs d'augmenter de façon considérable la rapidité, la sensibilité et la spécificité de détection des micro-organismes, mais sont en contre partie sensibles à un grand nombre de composés inhibiteurs pouvant alors entraîner une sous-estimation des concentrations en kystes dans ces échantillons. Concernant la détection par immunofluorescence, le protocole sélectionné associe la centrifugation, la séparation FEA (Acétate d'éthyle - Formaldéhyde) et la flottation sur solution de Percoll™-saccharose. Le protocole de purification sélectionné pour la détection des kystes par PCR se distingue du précédent au niveau de la séparation diphasique qui utilise uniquement l'acétate d'éthyle. Le protocole d'extraction de l'ADN est également optimisé, la répétition de l'étape de digestion des protéines et de purification des acides nucléiques sur colonne de silice constituant la modification la plus performante lors de l'analyse d'eaux usées. Les gradients de densité sur solutions de saccharose, de bromure de potassium ou de Nycodenz comparés à la flottation sur solution de Percoll™-saccharose, ne permettent pas d'augmenter les concentrations obtenues par PCR en temps réel. Les procédés testés pour une détection optimale en présence de débris et d'inhibiteurs en combinaison avec la flottation sont les cycles de congélation-décongélation, les ultrasons, ainsi que des composés destinés à piéger les inhibiteurs ou à limiter leur effet lors de l'étape d'amplification. La séparation immunomagnétique (IMS) est également évaluée au cours de cette étape. Parmi les techniques destinées à limiter la sous-estimation de la quantification par les inhibiteurs et les débris, les ultrasons s'avèrent efficaces pour l'ensemble des prélèvements, mais aboutissent toutefois à des concentrations plus faibles que la séparation diphasique à l'acétate d'éthyle. L'IMS, technique recommandée pour la purification des kystes à partir de prélèvements de faible turbidité, permet d'obtenir des concentrations totales en kystes satisfaisantes lors de l'analyse par immunofluorescence. En revanche, lors de la détection par PCR en temps réel, elle aboutit à des concentrations plus faibles que celles obtenues suite à la flottation.

La troisième partie de notre étude, destinée à valider sur des échantillons environnementaux et biologiques les conclusions des étapes précédentes, concerne tout d'abord la détection de l'espèce *Giardia lamblia*, puis celle des génotypes A et B par PCR en temps réel et enfin celle des génotypes C et E par PCR qualitative.

Sur des échantillons d'eaux usées prélevés au niveau des stations d'épuration de Nancy et de Metz, et de l'abattoir de Metz, les concentrations en kystes de *Giardia lamblia* observées par PCR en temps réel sont globalement concordantes avec les concentrations observées par immunofluorescence. En revanche, au niveau des génotypes, des différences sont mises en évidence entre ces trois sites où sont détectés les génotypes A, B et E de *Giardia lamblia*. Concernant les génotypes A et B des différences sont observées suivant les sites. Le génotype A est isolé au niveau des trois sites, à des concentrations légèrement plus élevées que le génotype B. Le génotype B est moins fréquemment détecté que le génotype A au niveau de la station d'épuration de Nancy et il n'est mis en évidence dans aucun prélèvement d'eau usée effectué à l'abattoir. Ainsi, le génotype B semble posséder un potentiel de transmission zoonotique plus limité que le génotype A. Quant au génotype E considéré comme spécifique d'animaux d'élevage, il est détecté uniquement dans les prélèvements effectués à l'abattoir. A l'heure actuelle, aucune étude ne reporte la détection de ce génotype dans des prélèvements environnementaux. La

présence de ce génotype E semble donc signer une contamination fécale d'origine animale et pourrait alors être envisagée comme marqueur de contamination non-humaine.

Les systèmes PCR spécifiques des génotypes A et B ont également permis de génotyper des kystes de *Giardia lamblia* isolés de selles humaines. Au niveau de ces échantillons, le génotype B apparaît comme nettement majoritaire pour l'ensemble des prélèvements quelque soit leur origine. Pour ces cas sporadiques provenant d'hôpitaux français, le génotype B représente 64 % des cas alors que le génotype A ne constitue que 36 % de ces échantillons. Concernant les cas sporadiques, les sous-génotypes A-II, B-III et B-IV ont été détectés par contre le sous-génotype A-I n'est mis en évidence dans aucun échantillon. Au niveau des cas regroupés, seul le sous-génotype B-III est isolé ce qui conforte l'hypothèse d'une source commune de contamination.

Ces expérimentations démontrent l'intérêt des techniques de biologie moléculaire et plus particulièrement de la PCR qualitative et en temps réel lors de l'analyse de prélèvements environnementaux ou biologiques. Ces techniques permettent en effet d'obtenir une réponse rapide, sensible et surtout spécifique, tout en étant capable d'effectuer la distinction au niveau des espèces, des génotypes et des sous-génotypes. Les outils développés et validés au cours de cette étude sur un nombre limité d'échantillons environnementaux pourront être utilisés à plus grande échelle afin d'établir une cartographie plus large et plus précise de la répartition des génotypes et des sous-génotypes de *Giardia lamblia* dans l'environnement, mais aussi d'étudier le rôle des différents hôtes de ce protozoaire au niveau de la contamination des ressources hydriques.

Pour la thèse de Isabelle BERTRAND

IL N’Y A PAS DE PAGE 212

Références bibliographiques

✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣ ✣

Abbaszadegan, M., Gerba, C.P., Rose, J.B., 1991. Detection of *Giardia* cysts with a cDNA probe and applications to water samples. Appl. Environ. Microbiol. 57(4), 927-931.

Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 1993. Detection of *Enterovirus* in grounwater with the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59(5), 1318-1324.

Abbaszadegan, M., Huber, M.S., Gerba, C.P., Pepper, I.L., 1997. Detection of viable *Giardia* cysts by amplification of heat shock-induced mRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63(1), 324-328.

Abe, N., Kimata, I., Iseki, M., 2003. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J. Vet. Med. Sci. 65(1), 29-33.

Abel, E.S., Davids, B.J., Robles, L.D., Loflin, C.E., Gillin, F.D., Chakrabarti, R., 2001. Possible roles of protein kinase A in cell motility and excystation of the early diverging eukaryote *Giardia lamblia*. J. Biol. Chem. 276(13), 10320-10329.

Abu Al-Soud, W. et Radström, P., 1998. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. Appl. Environ. Microbiol. 64(10), 3748-3753.

Abu Al-Soud, W. et Radström, P., 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. J. Clin. Microbiol. 38(12), 4463-4470.

Adam, R.D., 2000. The *Giardia lamblia* genome. Int. J. Parasitol. 30, 475-484.

Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14(3), 447-475.

Adams, P.J., Monis, P.T., Elliot, A.D., Thompson, R.C., 2004. Cyst morphology and sequence analysis of the small subunit rDNA and ef1 alpha identifies a novel *Giardia* genotype in a quenda (*Isoodon obesulus*) from western Australia. Infect. Genet. Evol. 4(4), 365-370.

AFNOR, 2001. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement d'oocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* - Méthode de concentration et de dénombrement NF T90-455 Juillet 2001, Saint-Denis La Plaine : Association Française de Normalisation, 25 p.

Ahmad, R.A., Lee, E., Tan, I.T.L., Mohamad-Kamel, A.G., 1997. Occurrence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in raw and treated water from two water treatment plants in Selangor, Malaysia. Water Res. 31(12), 3132-3136.

Alame, J., Pepin, D., Mougeot, G., Cambon, M., Entradas, M., 1998. Comparaison des indicateurs bactériologiques et parasitologiques dans l'évaluation du risque sanitaire lors de l'utilisation par aspersion d'eaux résiduaires traitées ou d'eaux superficielles. J. Eur. Hydrol. 28(3), 297-306.

Aldeen, W.E., Carroll, K., Robison, A., Morrison, M., Hale, D., 1998. Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 36(5), 1338-1340.

Ali, S.A. et Hill D.R., 2003. *Giardia intestinalis*. Curr. Opin. Infect. Dis. 16(5), 453-460.

Al-Tukhi, M.H., Al-Ahdal, M.N., Ackers, J.P., Peters, W., 1996. Prevalence of *Giardia lamblia* infection in the city of Riyadh, Saudi Arabia. Saudi Med. J. 17(4), 482-486.

Amahmid, O., Asmama, S., Bouhoum, K., 1999. The effect of waste reuse in irrigation on the contamination level of food crops by *Giardia* cysts and *Ascaris* eggs. Int. J. Food Microbiol. 49, 19-26.

Amar, C.F.L., Dear, P.H., Pedraza-Diaz, S., Looker, N., Linnane, E., McLauclin, J., 2002. Sensitive PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and genotyping of *Giardia duodenalis* in human feces. J. Clin. Microbiol. 40(2), 446-452.

Amar, C.F.L., Dear, P.H., McLauchlin, J., 2003. Detection and genotyping by real-time PCR/RFLP analyses of *Giardia duodenalis* from human faeces. J. Med. Microbiol. 52, 681-683.

Amar, C.F.L., East, C., Maclure, E., McLauchlin, J., Jenkins, C., Duncanson, P., Wareing, D.R.A., 2004. Blinded application of microscopy, bacteriological culture, immunoassays and PCR to detect gastrointestinal pathogens from faecal samples of patients with community-acquired diarrhoea. Eur. J. Clin. Infect. Dis. 23, 529-534.

Andersson, Y. et de Jong B., 1989. An outbreak of giardiasis and amoebiasis at a ski resort in sweden. Wat. Sci. Tech. 21(3), 143-146.

Andrews, R.H., Adams, M., Boreham, P.F.L., Mayrhofer, G., Meloni, B.P., 1989. *Giardia intestinalis* : eletrophoretic evidence for a species complex. Int. J. Parasitol. 19(2), 183-190.

Andrews, R.H., Chilton, N.B., Mayrhofer, G., 1992. Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth in vitro and in vivo. Parasitology 105, 375-386.

Andrews, R.H., Monis, P.T., Ey, P.L., Mayrhofer, G., 1998 Comparison of the levels of intra-specific genetic variation within *Giardia muris* and *Giardia intestinalis*. Int. J. Parasitol. 28(8), 1179-1185.

Appelbee, A.J., Frederick, L.M., Heitman, T.L., Olson, M.E., 2003. Prevalence and genotyping of *Giardia duodenalis* from beef calves in Alberta, Canada. Vet. Parasitol. 112, 289-294.

Ashbolt, N.J., 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. Toxicology 198, 229-238.

Aydin, A.F., Besirbellioglu, B.A., Avci, I.Y., Tanyuksel, M., Araz, E., Pahsa, A., 2004. Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 50(2), 147-151.

Aziz, H., Beck, C.E., Lux, M.F., Hudson, M.J., 2001. A comparison study of different methods used in the detection of *Giardia lamblia*. Clin. Lab. Sci. 14(3), 150-154.

Bach, H.J., Tomanova, J., Scholter, M., Munch, J.C., 2002. Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. J. Microbiol. Methods 49, 235-245.

Baldauf, S.L. et Palmer, J.D., 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives : congruent evidence from multiple proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(24), 11558-11562.

Baruch, A.C., Isaac-Renton, J., Adam, R.D., 1996. The molecular epidemiology of *Giardia lamblia* : a sequence-based approach. J. Infect. Dis. 174(1), 233-236.

Barutzki, D. et Schaper, R., 2003. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. Parasitol. Res. 90, S148-S150.

Barwick, R.S., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., Calderon, R.L., 2000. Surveillance for waterborne-disease outbreaks---United States, 1997-1998. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 49(SS04), 1-35.

Bean, H., Goulding, J.S., Lao, C., Angulo, F.J., 1996. Surveillance for foodborne-disease outbreaks---United States, 1988-1992. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 45(SS-5), 1-55.

Becher, K.A., Roberston, I.D., Fraser, D.M., Palmer, D.G., Thompson, R.C.A., 2004. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in western Australia. Vet. Parasitol. 123, 1-9.

Benchimol, M., 2004. Mitosis in *Giardia lamblia* : multiple modes of cytokinesis. Protist 155, 33-44.

Benchimol, M., Piva, B., Campanati, L., de Souza, W., 2004. Visualization of the funis of *Giardia lamblia* by high-resolution field emission scanning electron microscopy-new insights. J. Struct. Biol. 147(2), 102-115.

Berilli, F., Di Cave, D., De Liberato, C., Franco, A., Scaramozzino, P., Orecchia, P., 2004. Genotype charcaterisation of *Giardia duodenalis* isolates from domestic and farm animals by SSU-rRNA gene sequencing. Vet. Parasitol. 122, 193-199.

Bernal, R.M., Tovar, R., Santos, J.I., Munoz, M.L., 1998. Possible role of calmodulin in excystation of *Giardia lamblia*. Parasitol. Res. 84(9), 687-93.

Bernander, R., Palm, J.E.D., Svärd, S.G., 2001. Genome ploidy in different stages of the *Giardia lamblia* life cycle. Cellular Microbiology 3(1), 55-62.

Bertolucci, G.C., Gilli, G., Carraro, E., Giacosa, D., Puppo, M., 1998. Influence of raw water storage on *Giardia*, *Cryptosporidium* and Nematodes. Wat. Sci. Tech. 37(2), 261-267.

Bertrand, I., Gantzer, C., Chesnot, T., Schwartzbrod, J., 2004. Improved specificity for *Giardia lamblia* cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method. J. Microbiol. Methods 57, 41-53.

Bingham A.K. and Meyer E.A., 1979. *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions. Nature 277(5694), 301-302.

Bingham, A.K., Jarroll, E.L., Meyer, E.A., 1979. *Giardia* sp. : physical factors of excystation in vitro, and excystation vs eosin as determinants of viability. Exp. Parasitol. 47, 284-291.

Björkman, C., Svensson, C., Christensson, B., de Verdier, K., 2003. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. Acta Vet. Scand. 44, 145-152.

Blackburn, B.G., Craun, G.F., Yoder, J.S., Hill, V., Calderon, R.L., Chen, N., Lee, S.H., Levy, D.A., Beach, M.J., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water---United States, 2001-2002. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 53(SS08), 23-45.

Blanch, A.R., Belanche-Munoz, L., Bonjoch, X., Ebdon, J., Gantzer, C., Lucena, F., Ottoson, J., Kourtis, C., Iversen, A., Kuhn, I., Moce, L., Muniesa, M., Schwartzbrod, J., Skraber, S., Papageorgiou, G., Taylor, H.D., Wallis, J., Jofre, J., 2004. Tracking the origin of faecal pollution in surface water: an ongoing project within the European Union research programme. J. Water Health 2(4), 249-260.

Bonadonna, L., Briancesco, R., Cataldo, C., Divizia, M., Donia, D., Pana, A., 2002. Fate of bacterial indicators, viruses and protozoan parasites in a wastewater multi-component treatment system. New Microbiol. 25(4), 413-420.

Boucher, S.-E.M. et Gillin, F.D., 1990. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. Infect. Immun. 58(11), 3516-3522.

Bugg, R.J., Robertson, I.D., Elliot, A.D., Thompson, R.C.A., 1999. Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, western Australia. Vet. Journal 157, 295-301.

Bukhari, Z., Smith, H.V., Sykes, N., Humphreys, S.W., Paton, C.A., Girdwood, R.W.A., Fricker, C.R., 1997. Occurrence of *Cryptosporidium* spp oocysts and *Giardia* cysts in sewage influents and effluents from treatments plants in England. Wat. Sci. Tech. 35(11-12), 385-390.

Buret, A., denHollander, N., Wallis, P.M., Befus, D., Olson, M.E., 1990. Zoonotic potential of giardiasis in domestic ruminants. J. Infect. Dis. 162, 231-237.

Butcher, P.D. et Farthing, M.J.G., 1988. DNA probes for the faecal diagnosis of *Giardia lamblia* infections in man. Bioch. Soc. Trans. 17, 363-364.

Butcher, P.D., Cevallos, A.M., Carnaby, S., Alstead, E.M., Swarbrick, E.T., Farthing, M.J.K., 1994. Phenotypic and genotypic variation in *Giardia lamblia* isolates during chronic infection. Gut. 35, 51-54.

Caccio, S.M., De Giacomo, M., Pozio, E., 2002. Sequence analysis of the *β-giardin* gene and development of a polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int. J. Parasitol. 32, 1023-1030.

Caccio, S.M., De Giacomo, M., Aulicino, F.A., Pozio, E., 2003. *Giardia* cysts in wastewater treatments plants in Italy. Appl. Environ. Microbiol. 69(6), 3393-3398.

Campanati, L. et Monteiro-Leal L.H., 2002. The effects of the antiprotozoal drugs metronidazole and furazolidone on trophozoïtes of *Giardia lamblia* (P1 strain). Parasitol. Res. 88,80-85.

Campbell, A.T., Robertson, L.J., Smith, H.V., Girdwood, R.W.A., 1994. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts concentrated by calcium carbonate flocculation. J. Appl. Microbiol. 76, 638-639.

Campbell, A.T. et Wallis, P., 2002. The effect of UV irradiation on human-derived *Giardia lamblia*. Water Res. 36, 963-969.

Capelli, G., Paoletti, B., Iorio, R., Frangipane Di Regalbono, A., Pietrobelli, M., Bianciardi, P., Giangaspero, A., 2003. Prevalence of *Giardia* spp. in dogs and human in northern and central Italy. Parasitol. Res. 90, S154-S155.

Casson, L.W., Sorber, C.A., Sykora, J.L., Gavaghan, P.D., Shapiro, M.A., Jakubowski, W., 1990. *Giardia* in wastewater - effect of treatment. Res. J. Water Poll. Control. Fed. 62(5), 670-675.

Cavallier-Smith, T. et Chao, E.E., 1996. Molecular phylogeny of the free-living archezoan *Trepomonas agilis* and the nature of the first eukaryote. J. Mol. Evol. 43, 551-562.

Cedillo-Rivera, R., Darby, J.M., Enciso-Moreno, J.A., Ortega-Pierres, G., Ey, P.L., 2003. Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. Parasitol. Res. 90(2), 119-23.

Chandler, D.P., Wagnon, C.A., Bolton, H., 1998. Reverse transcription (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 64(2), 669-677.

Chauret, C., Armstrong, N., Fisher, J., Sharna, R., Springthorpe, S., Sattar, S. 1995. Correlating *Cryptosporidium* and *Giardia* with microbial indicators. J. Am. Water Works Assoc. 76-84.

Chauret, C., Springthorpe, S., Sattar, S., 1999. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts, and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. Can. J. Microbiol. 45, 257-262.

Chesnot, T. et Schwartzbrod, J., 2004. Quantitative and qualitative comparison of density-based purification methods for detection of *Cryptosporidium* oocysts in turbid environmental matrices. J. Microbiol. Methods 58, 375-386.

Chomczynski, P. et Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.

Clark, R.M., 1990. Modeling inactivation of *Giardia lamblia*. J. Environ. Eng. 116(5), 837-853.

Cody, M.M., Sottnek, H.M., O'Leary, V.S., 1994. Recovery of *Giardia lamblia* cysts from chairs and tables in child day-care centers. Pediatrics 94(6, supplement), 106-108.

Corrêa, G., Morgado-Diaz, J.A., Benchimol, M., 2004. Centrin in *Giardia lamblia* - ultrastructural localization. FEMS Microbiol. Lett. 233(1), 91-96.

Cotte, L., Rabodonirina, M., Piens, M.A., Perreard, M., Mojon, M., Trepo, C., 1993. Prevalence of intestinal protozoans in french patients infected with HIV. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 6, 1024-1029.

Craik, S.A., Finch, G.R., Bolton, J.R., Belosevic, M., 2000. Inactivation of *Giardia muris* cysts using medium-pressure ultraviolet radiation in filtered drinking water. Water Res. 34(18), 4325-4332.

Dalton, C., Goater, A., Pethig, R., Smith, H.V., 2001a. Viability of *Giardia intestinalis* cysts and viability and sporulation state of *Cyclospora cayetanensis* oocysts determined by electrorotation. Appl. Environ. Microbiol. 67(2), 586-590.

Dalton, C., Goater, A.D., Drysdale, J., Pethig, R., 2001b. Parasite viability by electrorotation. Colloids and Surfaces A : Physiochem. Eng. Aspects 195, 263-268.

Deng, M.Y. et Cliver, D.O., 1992. Degradation of *Giardia lamblia* cysts in mixed human and swine wastes. Appl. Environ. Microbiol. 58(8), 2368-2374.

DeRegnier, D.P., Cole, L., Schupp, D.G., Erlandsen, S.L., 1989. Viability of *Giardia* cysts suspended in lake, river, and tap water. Appl. Environ. Microbiol. 55(5), 1223-1229.

De Roubin, M.-R., Pharamond, J.-S., Zanelli, F., Poty, F., Houdart, S., Laurent, F., Crocourt, J.-L., Van Poucke, S., 2002. Application of laser scanning cytometry followed by epifluorescent and differential interfernce contrast microscopy for the detection and enumeration of *Cryptosporidium* and *Giardia* in raw and potable waters. J. Appl. Microbiol. 93, 599-607.

de Wit, M.A.S., Koopmans, M.P.G., Kortbeek, L.M., van Leeuwen, N.J., Bartelds, A.I.M., van Duynhoven, Y.T.H.P., 2001. Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands. Emerg. Infect. Dis. 7(1), 82-91.

Diaz, V., Campos, M., Lozano, J., Manas, I., Gonzalez, J., 1996. Aspects of animal giardiosis in Granada province (southern Spain). Vet. Parasitol. 64, 171-176.

DiGiorgio, C.L., Gonzalez, D.A., Huitt, C.C., 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* recoveries in natural waters by using environmental protection agency method 1623. Appl. Environ. Microbiol. 68(12), 5952-5955.

Dixon, B.R., Parenteau, M., Martineau, C., Fournier, J., 1997. A comparison of conventional microscopy, immunofluorescence microscopy and flow cytometry in the detection of *Giardia lamblia* cysts in beaver fecal samples. J. Immunol. Methods 202, 27-33.

Doby, J.-M., Guiguen, C., Duval, J.-M., Deunff, J., 1983. Les parasitoses intestinales chez les égoutiers. Arch. Mal. Prof. 44(1), 21-25.

Donaldson, K.A., Griffin, D.W., Paul, J.H., 2002. Detection, quantitation and identification of Enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR. Water Res. 36, 2505-2514.

Dorsch, M.R. et Veal, D.A., 2001. Oligonucleotide probes for specific detection of *Giardia lamblia* cysts by fluorescent *in situ* hybridization. J. Appl. Microbiol. 90, 836-842.

Dupouy-Camet, J., Ancelle, T., Vicens, I., Bougnoux, M.E., Mougin, F., Tourte-Schaefer, C., 1990. Transmission de la giardiase dans une crèche : analyse des facteurs de risque et contrôle. Méd. Mal. Inf. 20(4), 197-202.

Eckmann, L., 2003. Mucosal defences against *Giardia*. Parasite Immunol. 25, 259-270.

Elmendorf, H.G., Dawson, S.C., McCaffery, J.M., 2003. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. Int. J. Parasitol. 33, 3-28.

Erlandsen, S.L. et Bemrick, W.J., 1987. SEM evidence for a new species, *Giardia psittaci*. J. Parasitol. 73(3), 623-629.

Erlandsen, S.L., Bemrick, W.J., Pawley, J., 1989. High-resolution electron microscopic evidence for the filamentous structure of the cyst wall in *Giardia muris* and *Giardia duodenalis*. J. Parasitol. 75(5), 787-797.

Erlandsen, S.L., Sherlock, L.A., Bemrick, W.J., Ghobrial, H., Jakubowski, W., 1990. Prevalence of *Giardia* spp. in beaver and muskrat populations in northeastern states and Minnesota : detection of intestinal trophozoites at necropsy provides greater sensitivity than detection of cysts in fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 56(1), 31-36.

Erlandsen, S.L., Macechko, P.T., van Keulen, H., Jarroll, E.L., 1996. Formation of the *Giardia* cyst wall : studies on extracellular assembly using immunogold labeling and high resolution field emission SEM. J. Euk. Microbiol. 43(5), 416-429.

Erlandsen, S.L., Russo, A.P., Turner, J.N., 2004. Evidence for adhesive activity of the ventrolateral flange in *Giardia lamblia*. J. Eukaryot. Microbiol. 51(1), 73-80.

Ey, P.L., Bruderer, T., Wehrli, C., Köhler, P., 1996. Comparison of genetic groups determined by molecular and immunological analyses of *Giardia* isolated from animals and humans in Switzerland and Australia. Parasitol. Res. 82, 52-60.

Ey, P.L., Mansouri, M., Kulda, J., Nohynkova, E., Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., 1997. Genetic analysis of *Giardia* from hoofed farm animals reveals artiodactyl-specific and potentially zoonotic genotypes. J. Euk. Microbiol. 44(6), 626-635.

Falk, C.C., Karanis, P., Schoenen, D., Seitz, H.M., 1998. Bench scale experiments for the evaluation of a membrane filtration method for the recovery efficiency of *Giardia* and *Cryptosporidium* from water. Water Res. 32(3), 565-568.

Farthing, M.J., 1996. Giardiasis. Gastroenterol. Clin. North Am. 25(3), 493-515.

Faubert, G.M., Leziy, S.S., Bourassa, A., MacLean, J.D., 1986. Effects of environmental conditions and standard chlorination practices on the infectivity of *Giardia* cysts. Dis. Aquat. Org. 2, 1-5.

Faubert, G., 2000. Immune response to *Giardia duodenalis*. Clin. Microbiol. Rev. 13(1), 35-54.

Faye, O., N'Dir, O., Gaye, O., Dieng, T., Bah, I.B., Bllon, C., Diallo, S., 1997. La giardiase chez l'enfant, facteurs de rique de la morbidité en milieu urbain dakarois. Med. Afr. Noire 44(10), 531-535.

Fayer, R., Trout, J.M., Graczyk, T.K., Lewis, E.J., 2000. Prevalence of *Cryptosporidium, Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on three Maryland farms. Vet. Parasitol. 93, 103-112.

Feely, D.E., 1988. Morphology of the cyst of *Giardia microti* by light and electron microscopy. J. Protozool. 35(1), 52-54.

Ferrari, B. et Veal, D., 2003. Analysis-only detection of *Giardia* by combining immunomagnetic separation and two-color flow cytometry. Cytometry 51A(2), 79-86.

Filice, F.P., 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. University of California, Publications in Zoology, 57, 53-146.

Finch, G.R., Black, E.K., Labatiuk, C.W., Gyurek, L., Belosevic, M., 1993. Comparison of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. Appl. Environ. Microbiol. 59(11), 3674-3680.

Fontaine, J.-P., Delage, A., Lauraire, M.-C., 1984. Sur l'épidémiologie de la giardiase. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 59(6), 541-554.

Fontaine, M. et Guillot, E., 2003. An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples. J. Microbiol. Methods 54, 29-36.

Fournier, S., Dubrou, S., Liguory, O., Gaussin, F., Santillana-Hayat, M., Sarfati, C., Molina, J.M., Derouin, F., 2002. Detection of Microsporidia, Cryptosporidia and *Giardia* in swimming pools : a one-year prospective study. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 33, 209-213.

Fraser, D., Dagan, R., Naggan, L., Greene, V., El-On, J., Abu-Rbiah, Y., Deckelbaum, R.J., 1997. Natural history of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* infections in cohort of israeli bedouin infants : a study of a population in transition. Am. J. Trop. Med. Hyg. 57(5), 544-549.

Garcia, L.S. et Shimizu, R.Y., 1997. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 35(6), 1526-1529.

Garcia, A., Yanko, W., Batzer, G., Widmer, G., 2002. *Giardia* cysts in tertiary-treated wastewater effluents : are they infective ? Water Environ. Res. 74(6), 541-544.

Gassmann, L. et Schwartzbrod, J., 1991. Wastewater and *Giardia* cysts. Wat. Sci. Tech. 24(2), 183-186.

Gardner, T.B. et Hill, D.R., 2001. Treatment of giardiasis. Clin. Microbiol. Rev. 14(1), 114-128.

Gendrel, D., Treluyer, J.M., Richard-Lenoble, D., 2003. Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. Fundam. Clin. Pharmacol. 17, 189-197.

Gerwig, G.J., van Kuik, J.A., Leeflang, B.R., Kamerling, J.P., Vliegenthart, J.F.G., Karr, C.D., Jarroll, E.L., 2002. The *Giardia intestinalis* filamentous cyst wall countains a novel ß-(1-3)-N-acetyl-D-galactosamine polymer : a structural and conformational study. Glycobiology 12(8), 499-505.

Gibson, C.J., Stadterman, K.L., States, S., Sykora, J., 1998. Combined sewer overflows : a source of *Cryptosporidium* and *Giardia* ? Wat. Sci. Tech. 38(12), 67-72.

Gilles, H.M. et Hoffman, P.S., 2002. Treatment of intestinal parasitic infections : a review of nitazoxanide. Trends Parasitol. 18(3), 95-97.

Gillin, F.D., Reiner, D.S., Gault, M.J., Douglas, H., Das, S., Wunderlich, A., Sauch, J.F., 1987. Encystation and expression of cyst antigens by *Giardia lamblia* in vitro. Science 235(4792), 1040-1043.

Gillin, F.D., Reiner, D.S., McCaffery, J.M., 1996. Cell biology of the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. Ann. Rev. Microbiol. 50, 679-705.

Gilmour, R.A., Smith, H.V., Smith, P.G., Morris, G.P., Girwood, R.W.A., 1991. The occurrence and viability of *Giardia* spp. cysts in UK waters. Wat. Sci. Tech. 24(2), 179-182.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C., 2001. An overview of real-time quantitative PCR : applications to quantify cytokine gene expression. Methods 25(4), 386-401.

Goatcher, L.J., Poon, P., Davis, E., 1995. Use of a continuous-flow centrifuge system for the determination of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. In 95th ASM General Meeting, Washington, DC : American Society for Microbiology, 437 p.

Gordon, G. et Bubnis, B., 2000. Environmentally friendly methods of water disinfection : the chemistry of alternative disinfectants. Prog. Nucl. Energ. 37(1-4), 37-40.

Graczyk, T.K., Fayer, R., Trout, J.M., Lewis, E.J., Farley, C.A., Sulaiman, I., Lal, A.A., 1998. *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branda canadensis*). Appl. Environ. Microbiol. 64(7), 2736-2738.

Graczyk, T.K., Bosco-Nizeyi, J., Ssebide, B., Thompson, R.C., Read, C., Cranfield, M.R., 2002. Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) A infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. J. Parasitol. 88(5), 905-909.

Grimason, A.M., Smith, H.V., Parker, J.F.W., Jackson, M.H., Smith, P.G., Girdwood, R.W.A., 1993. Occurrence of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium* sp. oocysts in faeces from public parks in the west of Scotland. Epidemiol. Infect. 110, 641-645.

Grimason, A.M., Wiandt, S., Baleux, B., Thitai, W.N., Bontoux, J., Smith, H.V., 1996. Occurrence and removal of *Giardia* sp. cysts by kenyan and french waste stabilisation pond systems. Wat. Sci. Tech. 33(7), 83-89.

Guignard, S., Arienti, H., Freyre, L., Lujan, H., Rubinstein, H., 2000. Prevalence of enteroparasites in a residence for children in the Cordoba province, Argentina. Eur. J. Epidemiol. 16, 287-293.

Guimaraes, S. et Sogayar, M.I.L., 2002. Detection of anti-*Giardia lamblia* serum antibody among children of day care centers. Rev. Saude publica 36(1), 63-68.

Guy, R.A., Payment, P., Krull, U.J., Horgen, P.A., 2003. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. Appl. Environ. Microbiol. 69(9), 5178-5185.

Guy, R.A., Xiao, C., Horgen, P.A., 2004. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of *Giardia lamblia* in stool specimens. J. Clin. Microbiol. 42(7), 3317-3320.

Hachich, E.M., Sato, M., Galvani, A.T., Menegon, J.R.N., Mucci, J.L.N., 2004. *Giardia* and *Cryptosporidium* in source waters of Sao Paulo State - Brazil. Wat. Sci. Tech. 50(1), 239-245.

Hackett, T. et Lappin, M.R., 2003. Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-central Colorado. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 39, 52-56.

Hall, A. et Nahar, Q., 1993. Albendazole as a treatment for infections with *Giardia duodenalis* in children in Bangladesh. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 87(1), 84-86.

Harter, L., Frost, F., Jakubowski, W., 1982. *Giardia* prevalence among 1-to-3-year-old children in two Washington State counties. Am. J. Public Health 72(4), 386-388.

Hashimoto, T., Nakamura, Y., Nakamura, F., Shirakura, T., Adachi, J., Goto, N., Okamoto, K. Hasegawa, M., 1994. Protein phylogeny gives a robust estimation for early divergences of eukaryotes : phylogenetic place of a mitochondria-lacking protozoan, *Giardia lamblia*. Mol. Biol. Evol. 11(1), 65-71.

Hashimoto, A., Kunikane, S., Hirata, T., 2002. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the drinking water supply in Japan. Water Res. 36(3), 519-526. Erratum in : 36(13), 3420.

Hautus, M.A., Kortbeek, L.M., Vetter, C.M., Laarman, J.J., 1988. *In vitro* excystation and subsquent axenic growth of *Giardia lamblia*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82, 858-861.

Hayes, S.L., Rice, E.W., Ware, M.W., Schaefer, F.W. III, 2003. Low pressure ultraviolet studies for inactivation of *Giardia muris* cysts. J. Appl. Microbiol. 94, 54-59.

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6, 986-994.

Heitman, T.L., Frederick, L.M., Viste, J.R., Guselle, N.J., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., Olson, M.E., 2002. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the north Saskatchewan river bassin in Alberta, Canada. Can. J. Microbiol. 48, 530-541.

Hernandez, E., Cavallo, J.D., Debuysere, H., Fiorina, J.C., Garrabé, E., 1997. Prévalence des parasitoses digestives asymptomatiques : mise en évidence lors des examens d'aptitude aux emplois de l'alimentation. BEH 14.

Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Stokes, S.L., Juranek, D.D., 1992. Outbreaks of waterborne disease in United States : 1989-19990. J. Am. Water Works Assoc. 84(4), 129-135.

Hetsko, M.L., McCaffery, J.M., Svärd, S.G., Meng, T.-C., Que, X., Gillin, F.D., 1998. Cellular and transcriptional changes during excystation of *Giardia lamblia* in vitro. Exp. Parasitol. 88, 172-183.

Higgins, J.A., Fayer R, Trout, J.M., Xiao, L., Lal, A.A., Kerby, S., Jenkins, M.C., 2001. Real-time PCR for the detection of *Cryptosporidium parvum*. J. Microbiol. Methods. 47(3), 323-337.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis : real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y) 11(9), 1026-30.

Ho, B.S.W., Tam, T.-Y., Hutton, P., Yam, W.C., 1995. Detection and enumeration of *Giardia* cysts in river waters of Hong-Kong by flocculation-Percoll/sucrose gradient-immuofluorescence method. Wat. Sci. Tech. 31(5-6), 431-434.

Ho, B.S.W. et Tam, T.-Y., 1998a. *Giardia* and *Cryptosporidium* in sewage contaminated river waters. Water Res. 32(9), 2860-2864.

Ho, B.S.W. et Tam, T.-Y., 1998b. Occurrences of *Giardia* cysts in beach water. Wat. Sci. Tech. 38(12), 73-76.

Hoar, B.R., Atwill, E.R., Elmi, C., Farver, T.B., 2001. An examination of risk factors associated with beef cattle shedding pathogens of potential zoonotic concern. Epidemiol. Infect. 127, 147-155.

Hoet, A.E., Nielsen, P.R., Hasoksuz, M., Thomas, C., Wittum, T.E., Saif, L.J., 2003. Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 15(3), 205-212.

Homan, W.L., van Enckevort, F.H.J., Limper, L., van Eys, G.J.J.M., Schoone, G.J., Kasprzak, W., Majewska, A.C., van Knapen, F., 1992. Comparison of *Giardia* isolates from different laboratories by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. Parasitol. Res. 78, 316-323.

Homan, W.L., Gilsing, M., Bentala, H., Limper, L., van Knapen, F., 1998. Characterization of *Giardia duodenalis* by polymerase-chain-reaction fingerprinting. Parasitol. Res. 84, 707-714.

Homan, W.L. et Mank, T.G., 2001. Human giardiasis : genotype linked differences in clinical symptomatology. Int. J. Parasitol. 31, 822-826.

Hopkins, R.M., Meloni, B.P., Groth, D.M., Wetherall, J.D., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C.A., 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. J. Parasitol. 83(1), 44-51.

Hoque, M.E., Hope, V.T., Kjellstrom, T., Scragg, R., Lay-Yee, R., 2002. Risk of giardiasis in Aucklanders : a case-control study. Int. J. Infect. Dis. 6(3), 191-197.

Hörman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff, C.H., Torvela, N., Heikinheimo, A., Hanninen, M.L., 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. Appl. Environ. Microbiol. 70(1), 87-95.

Hsu, B.M., Huang, C., Jiang, G.Y., Hsu, C.L., 1999. The prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Taiwan water supplies. J. Toxicol. Environ. Health A 57(3), 149-160.

Hsu, B.-M., Huang, C., Hsu, Y.-F., Jiang, G.-Y., Hsu, C.-L. L., 2001a. Evaluation of two concentration methods for detecting *Giardia* and *Cryptosporidium* in water. Water Res. 35(2), 419-424.

Hsu, B.M., Huang, C., Pan, J.R., 2001b. Filtration behaviors of *Giardia* and *Cryptosporidium*--ionic strength and pH effects. Water Res. 35(16), 3777-3782.

Hsu, B.-M., Huang, C., Lai, Y.-C., Tai, H.-S., Chung, Y.-C., 2001c. Evaluation of immunomagnetic separation method for detection of *Giardia* for different reaction times and reaction volumes. Parasitol. Res. 87, 472-474.

Hsu, B.M et Yeh H.H., 2003. Removal of *Giardia* and *Cryptosporidium* in drinking water treatment: a pilot-scale study. Water Res. 37(5), 1111-1117.

Hu, C.J., Gibbs, R.A., Ho, G.E., Phillips, P., Unkovich, I., 1995. Pathogen densities in wastewater sludge treated by anaerobic digestion and dewatering. Preprint 3rd Int. Conf. Appropriate Waste Management Technologies for Developping Countries, NEERI, Nagpur, February 25-26, 23-31.

Hu, J., Feng, Y., Ong, S.L., Ng, W.J., Song, L., Tan, X., Chu, X., 2004. Improvement of recoveries for the determination of protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water using method 1623. J. Microbiol. Methods 58, 321-325.

Huetink, R.E., van der Giessen, J.W., Noordhuizen, J.P., Ploeger, H.W., 2001. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. Vet. Parasitol. 102(1-2), 53-67.

Hunt, C.L., Ionas, G., Brown, T.J., 2000. Prevalence and strain differentiation of *Giardia intestinalis* in calves in the Manawatu and Waikato regions of north island, New Zealand. Vet. Parasitol. 91, 7-13.

Ibekwe, A.M et Grieve, C.M., 2003. Detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. J. Appl. Microbiol. 94(3), 421-431.

Isaac-Renton, J.L., Shahriari, H., Bowie, W.R., 1992. Comparison of an *in vitro* method and an *in vivo* method of *Giardia* excystation. Appl. Environ. Microbiol. 58(5), 1530-1533.

Isaac-Renton, J., Moorehead, W., Ross, A., 1996. Longitudinal studies of *Giardia* contamination in two community drinking water supplies : cyst levels, parasite viability, and health impact. Appl. Environ. Microbiol. 62(1), 47-54.

ISO 9308/1, 1990. Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des organismes coliformes, des organismes coliformes thermotolérants et des *Escherichia coli* présumés - Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane, 11 p.

Jacangelo, J.G., Lainé, J.-M., Carns, K.E., Cummings, E.W., Mallevialle, J., 1991. Low-pressure membrane filtration for removing *Giardia* and microbial indicators. J. Am. Water Works Assoc., 97-106.

Jalili, N.A. et Cerven, D., 1993. The parasitic infections of soldiers of a division in the province of Baghlan (Afghanistan) recorded during 1988. Biologia 48(6), 615-618.

Jakubowski, W., Sykora, J.L., Sorber, C.A., Casson, L.W., Gavaghan, P.D., 1991. Determining giardiasis prevalence by examination of sewage. Wat. Sci. Tech. 24(2), 173-178.

Jarmey-Swan, C., Gibbs, R.A., Ho, G.E., Bailey, I.W., Howgrave-Graham, A.R., 2000. A novel method for detection of viable *Giardia* cysts in water samples. Water Res. 34(6), 1948-1951.

Jarroll, E.L., Bingham, A.K., Meyer, E.A., 1981. Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability. Appl. Environ. Microbiol. 41(2), 483-487.

Jarroll, E.L., Macechko, P.T., Steimle, P.A., Bulik, D., Karr, C.D., van Keulen, H., Paget, T.A., Gerwig, G., Kamerling, J., Vliegenthart, J., Erlandsen, S., 2001. Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystement. J. Eukaryot. Microbiol. 48(1), 22-26.

Jarroll, E.L. et Sener, K., 2003. Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. Drug Resist. Updat. 6, 239-246.

Johnson, D.W., Pieniazek, N.J., Griffin, D.W., Misener, L., Rose, J.B., 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. Appl. Environ. Microbiol. 61(11), 3849-3855.

Johnson, D.C., Enriquez, C.E., Pepper, I.L., Davis, T.L., Gerba, C.P., Rose, J.B., 1997a. Survival of *Giardia*, *Cryptosporidium*, poliovirus and *Salmonella* in marine waters. Wat. Sci. Tech. 35(11-12), 261-268.

Johnson, E., Atwill, E.R., Filkins, M.E., Kalush, J., 1997b. The prevalence of shedding of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. based on a single fecal sample collection from each 91 horses used for backcountry recreation. J. Vet. Diagn. Invest. 9, 56-60.

Johnson, M.L., Berryman, D.I., Reynoldson, J.A., Thompson, R.C., 2003. A fluorescent based PCR assay for the detection and quantitation of *Giardia duodenalis* genotypes in mixed populations. Infect. Genet. Evol. 3(2), 97-102.

Johnston, S.P., Ballard, M.M., Beach, M.J., Causer, L., Wilkins, P.P., 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 41(2), 623-626.

Kang, G., Mathew, M.S., Rajan, D.P., Daniel, J.D., Mathan, M.M., Mathan, V.I., Muliyil, J.P., 1998. Prevalence of intestinal parasites in rural southern indians. Trop. Med. Health 3(1), 70-75.

Karanis, P., Opiela, K., Renoth, S., Seitz, H.M., 1996. Possible contamination of surface waters with *Giardia* spp. through muskrats. Zbl. Bakt. 284, 302-306.

Karanis, P. et Ey, P.L., 1998. Characterization of axenic isolates of *Giardia intestinalis* established from humans and animals in Germany. Parasitol. Res. 84, 442-449.

Kaucner, C. et Stinear, T., 1998. Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 64(5), 1743-1749.

Keister, D.B., 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77(4), 487-488.

Kfir, R., Hilner, C., du Preez, M., Bateman, B., 1995. Studies on the prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in south african water. Wat. Sci. Tech. 31(5-6), 435-438.

Kramer, M.H., Herwaldt, B.L., Calderon, R.L., Juranek, D.D., 1996. Surveillance for waterborne-disease outbreaks---United States, 1993-1994. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 45(SS-1), 1-33.

Kreader, C.A., 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 protein. Appl. Environ. Microbiol. 62(3), 1102-1106.

Kuhn, R.C., Rock, C.M., Oshima, K.H., 2002. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande river valley in southern New Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 68(1), 161-165.

Kutyavin, I.V., Lukhtanov, E.U., Gamper, H.B., Meyer, R.B., 1997. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrrolidone tripeptides : base composition and backbone effects on hybridization. Nucleic Acids Res. 25, 3718-3723.

Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B., Hedgpeth, J., 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucleic Acids Res. 28(2), 655-661.

Labatiuk, C.W., Schaefer, F.W. 3rd, Finch, G.R., Belosevic, M., 1991 Comparison of animal infectivity, excystation, and fluorogenic dye as measures of *Giardia muris* cyst inactivation by ozone. Appl. Environ. Microbiol. 57(11), 3187-3192.

Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., Caccio, S.M., 2005. Genetic heterogeneity at the β-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. Int. J. Parasitol. In press.

Lawson, A.J., Linton, D., Stanley, J., Owen, R.J., 1997. Polymerase chain reaction detection and speciation of *Campylobacter upsaliensis* and *C. helveticus* in human faeces and comparison with culture techniques. J. Appl. Microbiol. 83, 375-380.

Learmonth, J.J., Ionas, G., Pita, A.B., Cowie, R.S., 2003. Identification and genetic characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* strains in humans and dairy cattle in the Waikato region of New Zealand. Wat. Sci. Tech. 47(3), 21-26.

Le Blancq, S.M. et Adam, R.D., 1998. Structural basis of karyotype heterogeneity in *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 97, 199-208.

LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Lee, R.G., 1991a. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in surface water supplies. Appl. Environ. Microbiol. 57(9), 2610-2616.

LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Lee, R.G., 1991b. *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in filtered drinking water supplies. Appl. Environ. Microbiol. 57(9), 2617-2621.

LeChevallier, M.W. et Norton, W.D., 1993. Treatments to address source water concerns : protozoa. In Safety of Water Disinfection : Balancing Chemical and Microbial Risks, ILSI press Washington D.C., 145-164.

LeChevallier, M.W., Norton, W.D., Siegel, J.E., Abbaszadegan, M., 1995. Evaluation of the immunofluorescence procedure for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. Appl. Environ. Microbiol. 61(2), 690-697.

Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., Calderon, R.L., 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreaks---United States, 1999-2000. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 51(SS08), 1-28.

Lejeune, B., Simitzis-Le Flohic, A.M., Chastel, C., 1982. Coprologie parasitaire et bactérienne des égoutiers de la communauté urbaine de Brest. Arch. Mal. Prof. 43(2), 105-107.

Levine, W.C., Stephenson, W.T., Craun, G.F., 1990. Waterborne disease outbreaks, 1986-1988. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 39(SS-1), 1-9.

Levy, D.A., Bens, M.S., Craun, G.F., Calderon, R.L., Herwaldt, B.L., 1998. Surveillance for waterborne-disease outbreaks---United States, 1995-1996. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 47(SS-5), 1-34.

Liberti, L., Notarnicola, M., Petruzzelli, D., 2002. Advanced treatment for municipal wastewater reuse in agriculture. UV disinfection : parasite removal and by-product formation. Desalination 152, 315-324.

Linden, K.G., Shin, G-A., Faubert, G., Cairns, W., Sobsey, M.D., 2002. UV disinfection of *Giardia lamblia* cysts in water. Environ. Sci. Technol. 36, 2519-2522.

Lindo, J.F., Levy, V.A., Baum, M.K., Palmer, C.J., 1998. Epidemiology of giardiasis and cryptosporidiosis in Jamaica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59(5), 717-721.

Linnane, E., Roberts, R., Looker, N., 2001. Nappies and transmission of *Giardia lamblia* between children. Lancet. 358(9280), 507.

Lloyd, D. et Harris, J.C., 2002. *Giardia* : highly evolved parasite or early branching eukaryote ? Trends Microbiol. 10(3), 122-127.

Lloyd, D., Harris, J.C., Biagini, G.A., Maroulis, S., Edwards, M.R., Turner, M.P., Ralphs, J., Hann, A.C., Wadley, R., Ellis, J., Paget, T., 2002. Oxygen homeodynamics in *Giardia*. In *Giardia*, The Cosmopolitan Parasite, Eds Olson, B.E., Olson, M.E., Wallis, P.M., CABI publishing, USA and Wallingford, UK, ISBN 0-85199-62-4, 29-43.

Lowery, C.J., Moore, J.E., Millar, B.C., Burke, D.P., McCorry, K.A.J., Crothers, E., Dooley, J.S.G., 2000. Detection and speciation of *Cryptosporidium* spp. in environmental water samples by immunomagnetic separation, PCR and endonuclease restriction. J. Med. Microbiol. 49, 779-785.

Lu, S.Q., Baruch, A.C., Adam, R.D., 1998. Molecular comparison *of Giardia lamblia* isolates. Int. J. Parasitol. 28, 1341-1345.

Lu, S., Li, J., Zhang, Y., Wen, J., Wang, F., 2002. The intraspecific difference of the triose phosphate isomerase (tim) gene from *Giardia lamblia*. Chin. Med. J. 115(5), 759-762.

Lujan, H.D., Mowatt, M.R., Nash, T.E., 1998. The molecular mechanisms of *Giardia* encystation. Parasitol. Today 14(11), 446-450.

Magne, D., Favennec, L., Chochillon, C., Gorenflot, A., Meillet, D., Kapel, N., Raichvarg, D., Savel, J., Gobert, J.G., 1991. Role of cytoskeleton and surface lectins in *Giardia duodenalis* attachment to Caco2 cells. Parasitol. Res. 77(8), 659-662.

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Perlin, M.H., Schaefer, F.W. 3rd, Jakubowski, W., Atlas, R.M., 1991. Detection of *Giardia* cysts by using the polymerase chain reaction and distinguishing live from dead cysts. Appl. Environ. Microbiol. 57(12), 3456-3461.

Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Perlin, M.H., Schaefer, F.W. 3rd, Jakubowski, W., Atlas, R.M., 1992. Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. J. Clin. Microbiol. 30(1), 74-78.

Mahbubani, M.H., Schaefer, F.W.III, Jones, D., Bej, A.K., 1998. Detection of *Giardia* in environmental waters by immuno-PCR amplification methods. Curr. Microbiol. 36, 107-113.

Massanet-Nicolau, J., 2003. New method using sedimentation and immunomagnetic separation for isolation and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. Appl. Environ. Microbiol. 69(11), 6758-6761.

Matheson, Z., Hargy, T.M., McCuin, R.M., Clancy, J.L., Fricker, C.R., 1998. An evaluation of the Gelman Envirochek capsule for the simultaneous concentration of *Cryptosporidium* and *Giardia* from water. J. Appl. Microbiol. 85, 755-761.

Maux, M., Bertrand, I., Gantzer, C., Schwartzbrod, J., 2002. Estimating *Giardia* cyst viability using RT-PCR. Wat. Sci. Tech. 2(3), 107-115.

Maux, M., 2003. Détection et estimation de la viabilité des kystes de *Giardia* par biologie moléculaire en vue d'une application à l'analyse de prélèvements de l'environnement. Doctorat de l'Université Henri Poincaré - Nancy I, 208 p.

Mayer, C.L. et Palmer, C.J., 1996. Evaluation of PCR, nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. Appl. Environ. Microbiol. 62(6), 2081-2085.

Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Ey, P.L., Albert, M.J., Grimmond, T.R., Merry, D.J., 1992. The use of suckling mice to isolate and grow *Giardia* from mammalian faecal specimens for genetic analysis. Parasitology 105, 255-263.

Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Ey, P.L., Chilton, N.B., 1995. Division of *Giardia* isolates from human into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with *Giardia muris*. Parasitology 111, 11-17.

McArthur, A.G., Morrison, H.G., Nixon, J.E.J., Passamaneck, N.Q.E., Kim, U., Hinkle, G., Crocker, M.K., Holder, M.E., Farr, R., Reich, C.I., Olsen, G.E., Aley, S.B., Adam, R.D., Gillin, F.D., Sogin, M.L., 2000. The *Giardia* genome project database. FEMS Microbiol. Lett. 189, 271-273.

McCuin, R.M., Bukhari, Z., Clancy, J.L., 2000. Recovery and viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia intestinalis* cysts using the membrane dissolution procedure. Can. J. Microbiol. 46, 700-707.

McCuin, R.M., Bukhari, Z., Sobrinho, J., Clancy, J.L., 2001. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from source water concentrates using immunomagnetic separation. J. Microbiol. Methods 45, 69-76.

McCuin, R.M. et Clancy, J.L., 2003. Modifications to United States environmental protection agency methods 1622 and 1623 for detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. Appl. Environ. Microbiol. 69(1), 267-274.

McGlade, T.R., Robertson, I.D., Elliot, A.D., Thompson, R.C.A., 2002. High prevalence of *Giardia* in cats by PCR. Vet. Parasitol. 2457, 1-9.

McLauchlin, J., Pedraza-Diaz, S., Amar-Hoetzeneder, C., Nichols, G.L., 1999. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. J. Clin. Microbiol. 37(10), 3153-3158.

McRoberts, K.M., Meloni, B.P., Morgan, U.M., Marano, R., Binz, N., Erlandsen, S.L., Halse, S.A., Thompson, R.C., 1996. Morphological and molecular characterization of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in western Australia. J. Parasitol. 82(5), 711-718.

Medema, G.J., Schets, F.M., Teunis, P.F., Havelaar, A.H., 1998. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water. Appl. Environ. Microbiol. 64(11), 4460-4466.

Meloni, B.P., Lymbery, A.J., Thompson, R.C.A., 1989. Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40(6), 629-637.

Meloni, B.P., Thompson, R.C., Hopkins, R.M., Reynoldson, J.A., Gracey M., 1993 The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cats from aboriginal communities in the Kimberley. Med. J. Aust. 158(3), 157-159.

Menon, B.S., Abdullah, S., Mahamud F., Singh, B., 1999. Intestinal parasites in malaysian children with cancer. J. Trop. Pediatr. 45, 241-242.

Mineno, T. et Avery, M.A., 2003. Giardiasis : recent progress in chemotherapy and drug development. Curr. Pharm. Des. 9(11), 841-855.

Mintz, E.D., Hudson-Wragg, M., Mshar, P., Cartter, M.L., Hadler, J.L., 1993. Foodborne giardiasis in a corporate office setting. J. Infect. Dis. 167(1), 250-253.

Mofidi, A.A., Meyer, E.A., Wallis, P.M., Chou, C.I., Meyer, B.P., Ramalingam, S., Coffey, B.M., 2002. The effect of UV light on the inactivation of *Giardia lamblia* and *Giardia muris* cysts as determined by animal infectivity assay (P-2951-01). Water Res. 36, 2098-2108.

Monis, P.T., Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Homan, W.L., Limper, L., Ey, P.L., 1996. Molecular genetic analysis of *Giardia intestinalis* isolates at the glutamate dehydrogenase locus. Parasitology. 112, 1-12.

Monis, P.T. et Andrews, R.H., 1998. Molecular epidemiology : assumptions and limitations of commonly applied methods. Int. J. Parasitol. 28, 981-987.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Mackrill, J., Kulda, J., Isaac-Renton, J.L., Ey, P.L., 1998. Novel lineages of *Giardia intestinalis* identified by genetic analysis of organisms isolated from dogs in Australia. Parasitology 116, 7-19.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L., 1999. Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. Mol. Biol. Evol. 16, 1135-1144.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Saint, C.P., 2002. Molecular biology techniques in parasite ecology. Int. J. Parasitol. 32, 551-562.

Monis, P.T., Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Ey, P.L., 2003. Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. Infect. Genet. Evol. 3, 29-38.

Monis, P.T. et Thompson, R.C.A., 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses : fact or fiction ? Infect. Genet. Evol. 3, 233-244.

Monpoeho, S., Dehée, A., Mignotte, B., Schwartzbrod, L., Marechal, V., Nicolas, J.-C., Billaudel, S., Férré, V., 2000. Quantification of *Enterovirus* RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. BioTechniques 29(1), 88-93.

Moore, A.C., Herwaldt, B.L., Craun, G.F., Calderon, R.L., Highsmith, A.K., Juranek, D.D., 1993. Surveillance for waterborne disease outbreaks---United States, 1991-1992. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 42(SS-05), 1-22.

Morales-Espinoza, E.M., Sanchez-Pérez, H.J., del Mar Garcia-Gil, M., Vargas-Morales, G., Méndez-Sanchez, J.D., Pérez-Ramirez, M., 2003. Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico. Salud Publica de Mexico 45 (5), 379-388.

Mowatt, M.R., Weinbach, E.C., Howard, T.C., Nash, T.E., 1994. Complementation of an *Escherichia coli* glycolysis mutant by *Giardia lamblia* triosephosphate isomerase. Exp. Parasitol. 78 (1), 85-92.

Mygind, T., Birkelund, S., Birkebaek, N.H., Ostergaard, L., Jensen, J.S., Christiansen, G., 2002. Determination of PCR efficiency in chelex-100 purified clinical samples and comparison of real-time quantitative PCR and conventional PCR for detection of *Chlamydia pneumoniae*. BMC Microbiol. 2(17), 1-8.

Nash, T.E., McCutchan, T., Keister, D., Dame, J.B., Conrad, J.D., Gillin, F.D., 1985. Restriction-endonuclease analysis of DNA from 15 *Giardia* isolates obtained from humans and animals. J. Infect. Dis. 152(1), 64-73.

Nash, T. et Keister, D.B., 1985. Differences in excretory-secretory products and surface antigens among 19 isolates of *Giardia*. J. Infect. Dis. 152 (6), 1186-1171.

Nash, T.E. et Mowatt, M.R., 1992. Identification and characterization of a *Giardia lamblia* group-specific gene. Exp. Parasitol. 75, 369-378.

Newman, R.D., Moore, S.R., Lima, A.A.M., Nataro, J.P., Guerrant, R.L., Sears, C.L., 2001. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east brazilian children. Trop. Med. Int. Health 6(8), 624-634.

Nieminski, E.C., Schaefer, F.W. 3rd, Ongerth, J.E., 1995. Comparison of two methods for detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water. Appl. Environ. Microbiol. 61(5), 1714-1719.

Nieminski, E.C., 1997. Removal of *Cryptosporidium* and *Giardia* through conventional water treatment and direct filtration. Project Summary, USEPA/600/SR-97/025, Center for Environmental Research Information, National Risk Management Research Laboratory Cincinnati, OH 45268, 9 p.

Nizeyi, J.B., Cranfield, M.R., Graczyk, T.K., 2002. Cattle near the Bwindi impenetrable national park, Uganda, a reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* for local community and free-ranging gorillas. Parasitol. Res. 88, 380-385.

Nunez, F.A., Hernandez, M., Finlay, C.M., 1999. Longitudinal study of giardiasis in three day care centres of Havana city. Acta Tropica 73, 237-242.

Oda, T., Sakagami, M., Ito, H., Yano, H.Y., Rai, S.K., Kawabata, M., Uga, S., 2000. Size selective continuous flow filtration method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*. Water Res. 34(18), 4477-4481.

O'Handley, R.M., Olson, M.E., Fraser, D., Adams, P., Thompson, R.C.A., 2000. Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from western Australia and western Canada. Vet. Parasitol. 90, 193-200.

Olsen, S.J., McKinon, L.C., Goulding, J.S., Bean, N.H., Slutsker, L., 2000. Surveillance for foodborne disease outbreaks---United States, 1993-1997. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 49(SS-01), 1-51.

Olson, M.E., Thorlakson, C.L., Deselliers, L., Morck, D.W., McAllister, T.A., 1997a. *Giardia* and *Cryptosporidium* in canadian farm animals. Vet. Parasitol. 68, 375-381.

Olson, M.E., Guselle, N.J., O'Handley, R.M., Swift, M.L., McAllister, T.A., Jelinski, M.D., Morck, D.W., 1997b. *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in British Columbia. Can. Vet. J. 38, 703-706.

Olson, M.E., Goh, J., Phillips, M., Guselle, N., McAllister, T.A., 1999. *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil, and cattle feces. J. Environ. Qual. 28, 1991-1996.

Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., 2000. *Giardia* vaccination. Parasitol. Today 16(5), 213-217.

Olson, M.E., O'Handley, R.M., Ralston, B.J., McAllister, T.A., Thompson, R.C., 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. Trends Parasitol. 20(4), 185-191.

O.M.S., 2004 : Organisation Mondiale de la Santé. Adresse ressource : http://www.who.int/water_sanitation_health/hygiene/en/, page consultée en juin 2004.

Pardue, M.-L., DeBaryshe, P.G., Lowenhaupt, K., 2001. Another protozoan contributes to understanding telomeres and transposable elements. Proc. Natl. Acad. Sci. 98(25), 14195-14197.

Payment, P., Berte, A., Fleury, C., 1997. Sources of variation in isolation rate of *Giardia lamblia* cysts and their homogeneous distribution in river water entering a water treatment plant. Can. J. Microbiol. 43(7), 687-689.

Payment, P., Berte, A., Prevost, M., Menard, B., Barbeau, B., 2000. Occurrence of pathogenic microorganisms in the Saint Lawrence river (Canada) and comparison of health risks for populations using it as their source of drinking water. Can. J. Microbiol. 46(6), 565-576.

Payment, P., Plante, R., Cejka, P., 2001. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. Can. J. Microbiol. 47, 188-193.

Pickering, L.K. et Engelkirk, P.G., 1988. *Giardia lamblia*. New Topics in Pediatric Infectious Disease 35(3), 565-577.

Ponce-Macotela, M., Martinez-Gordillo, M.N., Bermudez-Cruz, R.M., Salazar-Schettino, P.M., Ortega-Pierres, G., Ey, P.L., 2002. Unusual prevalence of the *Giardia intestinalis* A-II subtype amongst isolates from humans and domestic animals in Mexico. Int. J. Parasitol. 32, 1201-1202.

Porter, J.D., Ragazzoni, H.P., Buchanon, J.D., Waskin, H.A., Juranek, D.D., Parkin, W.E., 1988. *Giardia* transmission in a swimming pool. Am. J. Public Health 78(6), 659-662.

Quintero-Betancourt, W., Gennaccaro, A.L., Scott, T.M., Rose, J.B., 2003. Assessment of methods for detection of infectious *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in reclaimed effluents. Appl. Environ. Microbiol. 69(9), 5380-5388.

Ralston, B.J., McAllister, T.A., Olson, M.E., 2003. Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams. Vet. Parasitol. 114, 113-122.

Read, C., Walters, J., Robertson, I.D., Thompson, R.C.A., 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. Int. J. Parasitol. 32, 229-231.

Read, C.M., Monis, P.T., Thompson, R.C.A., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect. Genet. Evol. 4, 125-130.

Rendtorff, R.C., 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. II. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. Am. J. Hyg. 59(2), 209-220.

Rice, E.W., Hoff, J.C., Schaefer, F.W. III, 1982. Inactivation of *Giardia* cysts by chlorine. Appl. Environ. Microbiol. 43(1), 250-251.

Rimhanen-Finne, R., Ronkainen, P., Hänninen, M.-L., 2001. Simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia* in sewage sludge by IC-PCR. J. Appl. Microbiol. 91, 1030-1035.

Rimhanen-Finne, R., Hörman, A., Ronkainen, P., Hänninen, M.-L., 2002. An IC-PCR method for detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in natural surface waters in Finland. J. Microbiol. Methods 50, 299-303.

Rimhanen-Finne, R., Vuorinen, A., Marmo, S., Malmberg, S., Hänninen, M.-L., 2004. Comparative analysis of *Cryptosporidium*, *Giardia* and indicator bacteria during sewage sludge hygienization in various composting processes. Lett. Appl. Microbiol. 38, 301-305.

Roach, P.D., Olson, M.E., Whitley, G., Wallis, P.M., 1993. Waterborne *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada. Appl. Environ. Microbiol. 59(1), 67-73.

Roberts-Thompson, I.C., Stevens, D.P., Mahmoud, A.A., Warren, K.S., 1976. Giardiasis in the mouse : an animal model, Gastroenterol. 71, 57-61.

Robertson, L.J., Paton, C.A., Campbell, A.T., Smith, P.G., Jackson, M.H., Gilmour, R.A., Black, S.E., Stevenson, D.A., Smith, H.V., 2000. *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts at sewage treatment works in Scotland, UK. Water Res. 34(8), 2310-2322.

Robertson, L.J. et Gjerde, B., 2000. Isolation and enumeration of *Giardia* cysts, *Cryptosporidium* oocysts, and *Ascaris* eggs from fruits and vegetables. J. Food Prot. 63(6), 775-778.

Robertson, L.J. et Gjerde, B., 2001a. Occurrence of parasites on fruits and vegetables in Norway. J. Food Prot. 64(11), 1793-1798.

Robertson, L.J. et Gjerde, B., 2001b. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. Scand. J. Public Health 29, 200-207.

Roberston, L.J. et Gjerde, B.K., 2004. Effects of the norwegian winter environment on *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. Microb. Ecol. 47(4), 359-365.

Rocha, M.O., de Mello, R.T., Guimaraes, T.M., Toledo, V.P., Moreira, M., da Costa, C.A., 1999. Detection of a *Giardia lamblia* coproantigen by using a commercially available immunoenzymatic assay on Belo Horizonte, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 41(3), 151-154.

Rochelle, P.A., De Leon, R., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., 1997. Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water. Appl. Environ. Microbiol. 63(1), 106-114.

Rodgers, M.R., Bernardino, C.M., Jakubowski, W., 1993. A comparison of methods for extracting amplifiable *Giardia* DNA from various environmental samples. Wat. Sci. Tech. 27(3-4), 85-88.

Rodriguez-Hernandez, J., Canut-Blasco, A., Martin-Sanchez, A.M., 1996. Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centres in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. Eur. J. Epidemiol. 12, 291-295.

Rose, J.B., Kayed, D., Madore, M.S., Gerba, C.P., Arrowood, M.J., Sterling, C.R., Riggs, J.L., 1988. Methods for the recovery of *Giardia* and *Cryptosporidium* from environmental waters and their comparative occurrence. Advances in *Giardia* Research, ED. P.M. Wallis & B.R. Hammond, University of Calgary Press, Calgary, 205-209.

Rose, J.B., Gerba, C.P., Jakubowski, W., 1991. Survey of potable water supplies for *Cryptosporidium* and *Giardia*. Environ. Sci. Tech. 25, 1393-1400.

Rose, J.B., Dickson, L.J., Farrah, S.R., Carnahan, R.P., 1996. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. Water Res. 30(11), 2785-2797.

Rose, J.B. et Slifko, T.R., 1999. *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Cyclospora* and their impact on foods : a review. J. Food Protect. 62(9), 1059-1070.

Rousset, J.J., Allouche, S., Panserrieu, S., Brisson, G., Reel, N., 1993. Hygiène parasitologique et personnel d'alimentation en France. Microb. Hyg. Ali. 5, 15-18.

Sambrook, J. et Russell, D.W., 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, third edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold spring harbor, New York.

Sauch, J.F., 1984. Purification of *Giardia muris* cysts by velocity sedimentation. Appl. Environ. Microbiol. 48(2), 454-455.

Sauch, J.F., 1985. Use of immunofluorescence and phase-contrast microscopy for detection and identification of *Giardia* cysts in water samples. Appl. Environ. Microbiol. 50(6), 1434-1438.

Sauch, J.F., Flanigan, D., Galvin, M.L., Berman, D., Jakubowski, W., 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. Appl. Environ. Microbiol. 57(11), 3243-3247.

Schaefer, F.W. III, Rice, E.W., Hoff, J.C., 1984. Factors promoting *in vitro* excystation of *Giardia muris* cysts. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78(6), 795-800.

Schlosser, O., Grall, D., Laurenceau, M.-N., 1999. Intestinal parasite carriage in workers exposed to sewage. Eur. J. Epidemiol. 15, 261-265.

Schoenen, D., 2001. Requirements for the catchment, treatment, and surveillance of drinking water to avoid the transmittance of pathogenic bacterial, viral, and parasitic organisms. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 29(4), 187-196.

Schunk, M., Jelinek, T., Wetzel, K., Nothdurft, H.D., 2001. Detection of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* in stool samples by two enzyme immunoassays. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20, 389-391.

Schupp, D.G. et Erlandsen, S.L., 1987a. A new method to determine *Giardia* cyst viability : correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. Appl. Environ. Microbiol. 53(4), 704-707.

Schupp, D.G. et Erlandsen, S.L., 1987b. Determination of *Giardia muris* cyst viability by differential interference contrast, phase, or brightfield microscopy. J. Parasitol. 73(4), 723-729.

Schwartzbrod, J., Maux, M., Chesnot, T., 2002. Encyclopedia of Environmental Microbiology, Ed. Wiley, Parasitic protozoa : Fate in wastewater treatment plants, 2327-2337.

Schwieger, F. et Tebbe, C.C., 1997. Efficient and accurate PCR amplification and detection of a recombinant gene in DNA directly extracted from soil using the expand™ high fidelity PCR system and T4 Gene 32 protein. Biochemica 2, 21-23.

Shepherd, K.M. et Wyn-Jones, A.P., 1996. An evaluation of methods for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. Appl. Environ. Microbiol. 62(4), 1317-1322.

Shlim, D.R., Hoge, C.W., Rajah, R., Scott, R.M., Pandy, P., Echeverria, P., 1999. Persistent high risk of diarrhea among foreigners in Nepal during the first years of residence. Clin. Infect. Dis. 29, 613-616.

Sivaganesan, M. et Rice, E.W., 2003. Estimation of *Giardia* Ct values at high pH for the surface water treatment rule. J. Environ. Sci. Health Part. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng. A38(9), 1959-1970.

Slavin, I., Saura, A., Carranza, P.G., Touz, M.C., Nores, M.J., Lujan, H.D., 2002. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Giardia lamblia*. Mol. Biochem. Parasitol. 122, 95-98.

Slifko, T.R., Smith, H.V., Rose, J.B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. Int. J. Parasitol. 30, 1379-1393.

Small, E.A., Tice, A.D., Zheng, X., 2003. Intestinal parasites of the pacific. Hawaii Medical Journal 62, 216-219.

Smith, A.L. et Smith, H.V., 1989. A comparison of fluorescein diacetate and propidium iodide staining and *in vitro* excystation for determining *Giardia intestinalis* cyst viability. Parasitology 99, 329-331.

Smith, H.V., Robertson, L.J., Gilmour, R.A., Morris, G.P., Girdwood, R.W.A., Smith, P.G., 1993. The occurrence and viabillity of *Giardia* cysts in scottish raw and final waters. J. IWEM 7, 632-635.

Soares, A.C., Straub, T.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 1994. Effect of anaerobic digestion on the occurrence of Enteroviruses and *Giardia* cysts in sewage sludge. J. Environ. Sci. Health A29(9), 1887-1897.

Souza, D.S.M., Barreiros, J.T., Papp, K.M., Steindel, M., Simoes, C.M..O., Barardi, C.R.M., 2003. Comparison between immunomagnetic separation, coupled with immunofluorescence, and the techniques of Faust *et al.* and of Lutz for the diagnosis of *Giardia lamblia* cysts in human feces. Rev. Inst. Med. Trop. S. paulo 45(6), 339-342.

Straub, T.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., 1995. Removal of PCR inhibiting substances in sewage sludge amended soil. Wat. Sci. Tech. 31(5-6), 311-315.

Sulaiman, I.M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R.H., Trout, J.M., Schantz, P.M., Das, P., Lal, A.A., Xiao, L., 2003. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. Emerg. Infect. Dis. 9(11), 1444-1452.

Sulaiman, I.M., Jiang, J., Singh, A., Xiao, L., 2004. Distribution of *Giardia duodenalis* and subgenotypes in raw urban wastewater in Milwaukee, Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 70(6), 3776-3780.

Svärd, S.G., Meng, T.C., Hetsko, M.L., McCaffery, J.M., Gillin, F.D., 1998. Differentiation-associated surface antigen variation in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. Mol. Microbiol. 30(5), 979-989.

Svärd, S.G., Hagblom, P., Palm, J.E.D., 2003. *Giardia lamblia* - a model organism for eukaryotic cell differentiation. FEMS Microbiol. Lett. 218, 3-7.

Sykora, J.L., Sorber, C.A., Jakubowski, W., Casson, L.W., Gavaghan, P.D., Shapiro, M.A., Schott, M.J., 1991. Distribution of *Giardia* cysts in wastewater. Wat. Sci. Tech. 24(2), 187-192.

Tebbe, C.C. et Vahjen, W., 1993. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. Appl. Environ. Microbiol. 59(8), 2657-2665.

Thiriat, L., Bigot, V., Schwartzbrod, J., 1997. Evaluation of a procedure for detection of viable *Giardia* cysts in wastewater sludge. Wat. Sci. Tech. 35(11-12), 377-380.

Thiriat, L., Sidaner, F., Schwartzbrod, J., 1998. Determination of *Giardia* cysts viability in environmental and faecal samples by immunofluorescence, fluorogenic dye staining and differential interference contrast microscopy. Lett. Appl. Microbiol. 26, 237-242.

Thompson, R.C.A., Hopkins, R.M., Homan, W.L., 2000. Nomenclature and genetics groupings of *Giardia* infecting mammals. Parasitol. Today 16(5), 210-213.

Thompson, R.C.A., 2000. *Giardia* as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Int. J. Parasitol. 30, 1259-1267.

Touz, M.C., Nores, M.J., Slavin, I., Carmona, C., Conrad, J.T., Mowatt, M.R., Nash, T.E., Coronel, C.E., Lujan, H.D., 2002a. The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. J. Biol. Chem. 277(10), 8474-8481.

Touz, M.C., Gottig, N., Nash, T.E., Lujan, H.D., 2002b. Identification and characterization of a novel secretory granule calcium-binding protein from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. J. Biol. Chem. 277(52), 50557-50563.

Tovar, J., Leon-Avila, G., Sanchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernandez, M., Muller, M., Lucocq, J.M., 2003. Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. Nature 426, 172-175.

Traub, R.J., Robertson, I.D., Irwin, P., Mencke, N., Monis, P., Thompson, R.C.A., 2003. Humans, dogs, and parasitic zoonoses-unravelling the relationships in a remote endemic community in northeast India using molecular tools. Parasitol. Res. 90, S156-S157.

Traub, R.J., Monis, P.T., Robertson, I., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C.A., 2004. Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. Parasitology 128, 253-262.

Trout, J.M., Santin, M., Fayer, R., 2003. Identification of assemblage A *Giardia* in white-tailed deer. J. Parasitol. 89(6), 1254-1255.

Trout, J.M., Santin, M., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves. Vet. Parasitol. 124, 179-186.

Tsai, Y.-L., Palmer, C.J., Sangermano, L.R., 1993. Detection of *Escherichia coli* in sewage and sludge by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 59(2), 353-357.

USEPA/814-B-95-003, 1995. ICR Protozoan method for detecting *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in water by a fluorescent antibody procedure. US Environmental Protection Agency, Office of Ground and Drinking Water, Cincinatti, OH 45268, 48 p.

USEPA-821-R-01-025, 2001. Method 16223 : *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. 20460, 50 p.

van Keulen, H., Gutell, R.R., Gates, M.A., Campbell, S.R., Erlandsen, S.L., Jarroll, E.L., Kulda, J., Meyer, E.A., 1993. Unique phylogenetic position of Diplomonadida based on the complete small subunit ribosomal RNA sequence of *G. ardeae*, *G. muris*, *G. duodenalis* and *Hexamita* sp. The FASEB Journal 7, 223-231.

van Keulen, H., Homan, W.L., Erlandsen, S.L., Jarroll, E.L., 1995. A three nucleotide signature sequence in small subunit rRNA divides human *Giardia* in two different genotypes. J. Euk. Microbiol. 42(4), 392-394.

van Keulen, H., Feely, D.E., Macechko, P.T., Jarroll, E.L., Erlandsen, S.L., 1998. The sequence of *Giardia* small subunit rRNA shows that voles and muskrats are parasitized by a unique species *Giardia microti*. J. Parasitol. 84(2), 294-300.

van Keulen, H., Macechko, P.,T., Wade, S., Schaaf, S., Wallis, P.M., Erlandsen, S.L., 2002. Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. Vet. Parasitol. 108, 97-107.

Verle, P., Kongs, A., De, N.V., Thieu, N.Q., Depraetere, K., Kim, H.T., Dorny, P., 2003. Prevalence of intestinal parasitic infections in northern Vietnam. Trop. Med. Int. Health 8(10), 961-964.

Verweij, J.J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M.A., van Lieshout, L., Polderman, A.M., 2003. Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. Mol. Cell. Probes 17(5), 223-225.

Verweij, J.J., Blange, R.A., Templeton, K., Schinkel, J., Brienen, E.A., van Rooyen, M.A., van Lieshout, L., Polderman, A.M., 2004. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 42(3), 1220-1223.

Vesey, G., Slade, J.S., Byrne, M., Sheperd, K., Fricker, C.R., 1993. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. J. Appl. Bacteriol. 75, 82-86.

Vesey, G., Hutton, P., Champion, A., Ashbolt, N., Williams, K.L., Warton, A., Veal, D., 1994a. Application of flow cytometric methods for the routine detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. Cytometry 16, 1-6.

Vesey, G., Narai, J., Ashbolt, N., Williams, K., Veal, D., 1994b. Detection of specific microorganisms in environmental samples using flow cytometry. Methods Cell Biol. 42(B), 489-521.

Vesey, G., Deere, D., Gauci, M.R., Griffiths, K.R., Williams, K.L., Veal, D.A., 1997. Evaluation of fluorochromes and excitation sources for immunofluorescence in water samples. Cytometry 29, 147-154.

Vesy, C.J. et Peterson, W.L., 1999. Review article : the management of giardiasis. Aliment Pharmacol. Ther. 13(7), 843-850.

Wade, S.E., Mohammed, H.O., Schaaf, S.L., 2000. Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* (*C. andersoni*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. Vet. Parasitol. 93, 1-11.

Wallis, P.M., Erlandsen, S.L., Issac-Renton, J.L., Olson, M.E., Robertson, W.J., van Keulen, H., 1996. Prevalence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and characterization of *Giardia* spp. isolated from drinking water in Canada. Appl. Environ. Microbiol. 62(8), 1789-2797.

Ware, M.W., Wymer, L., Lindquist, H.D., Schaefer, F.W. 3rd., 2003. Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with Method 1622 : detection of *Cryptosporidium* in water. J. Microbiol. Methods. 55(3), 575-83.

Weber, R., Bryan, R.T., Juranek, D.D., 1992. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. J. Clin. Microbiol. 30, 2869-2873.

Weiss, J.B., Van Keulen, H., Nash, T.E., 1992. Classification of subgroups of *Giardia lamblia* based upon ribosomal RNA gene sequence using the polymerase chain reaction. Mol. Biochem. Parasitol. 54, 73-86.

Wiandt, S., Baleux, B., Casellas, C., Bontoux, J., 1995. Occurrence of *Giardia* sp. cysts during a wastewater treatment by a stabilization pond in the south of France. Wat. Sci. Tech. 31(12), 257-265.

Wiandt, S., Baleux, B., Bontoux, J., 1998. Etude de l'efficacité de certaines stations d'épuration des eaux usées vis-à-vis de l'élimination de kystes de *Giardia* sp. J. Eur. Hydrol. 28(3), 283-290.

Widmer, G., Clancy, T., Ward, H.D.,Miller, D., Batzer, G.M., Pearon, C.B., Bukhari Z., 2002. Structural and biochemical alterations in *Giardia lamblia* cysts exposed to ozone. J. Parasitol. 88(6), 1100-1106.

Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. 63(10), 3741-3751.

Wohlsen, T., Bates, J., Gray, B., Katouli, M., 2004. Evaluation of five membrane filtration methods for recovery of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from water samples. Appl. Environ. Microbiol. 70(4), 2318-2322.

Xiao, L., Herd, R.P., Rings, D.M., 1993. Concurent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. Vet. Parasitol. 51, 41-48.

Xiao, L. et Herd, R.P., 1994. Epidemiology of equine *Cryptosporidium* and *Giardia* infections. Equine Vet. J. 26(1), 14-17.

Yakub, G.P. et Stadterman-Knauer, K.L., 2000. Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* from high-iron matrices. Appl. Environ. Microbiol. 66(8), 3628-3631.

Yeh, C.-J. G., Hsi, B.-L., Faulk, W.P., 1981. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. J. Immunol. Methods 43, 269-275.

Yoder, J.S., Blackburn, B.G., Craun, G.F., Hill, V., Levy, D.A., Chen, N., Lee, S.H., Calderon, R.L., Beach, M.J., 2004. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water--United States, 2001-2002. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 53(SS08), 1-22.

Yong, T.S., Park, S.J., Hwang, U.W., Yang, H.W., Lee, K.W., Min, D.Y., Rim, H.J., Wang, Y., Zheng, F., 2000. Genotyping of *Giardia lamblia* isolates from China and Korea using ribosomal DNA sequences. J. Parasitol. 86(4), 887-891.

Yu, L.Z., Birky, C.W., Adam, R.D., 2002. The two nuclei of *Giardia* each have complete copies of the genome and are partitioned aquationally at cytokinesis. Eukaryot. Cell. 1(2), 191-199.

Zajac, A.M., Leib, M.S., Burkholdert, W.J., 1992. *Giardia* infection in a group of experimental dogs. J. Small Anim. Pract. 33, 257-260.

Zimmerman, S.K. et Needham, C.A., 1995. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with merifluor *Cryptosporidium/Giardia* direct immunofluorescence assay and ProspecT *Giardia* EZ microplate assay for detection of *Giardia lamblia*. J. Clin. Microbiol. 33(7), 1942-1943.

Zuckerman, U., Gold, D., Shelef, G., Armon, R., 1997. The presence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in surface water and effluents in Israel. Wat. Sci. Tech. 35(11-12), 381-384.

Zuckerman, U., Armon, R., Tzipori, S., Gold, D., 1999. Evaluation of a portable differential continuous flow centrifuge for concentration of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. J. Appl. Microbiol. 86, 955-961.

Références des sites internet

Séquençage de la souche WB :
http://gmod.mbl.edu/perl/site/giardia ?page=intro (page consultée en octobre 2004)

Site NCBI :
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Site pour la recherche BLAST :
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

Photos de trophozoïtes :
http://www.tulane.edu//~wiser/protozoology/notes/images/disk.JPG (page consultée en juin 2004)
http://cal.nbc.upenn.edu/merial/Introduction/intro_2.htm (page consultée en août 2004)

Photos de kystes :
http://www.ksu.edu/parasitology/625tutorials/Protozoa04.html (page consultée en août 2004)

Annexes

❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖

ANNEXE 1

Etude bio-informatique : Alignements des séquences avec les amorces et les sondes permettant la détection de Giardia lamblia et Giardia muris

Amorce sens : GIAF-2

		******* **********
1	G.lamblia-F	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
2	G.lamblia-E	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
3	G.lamblia-D	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
4	G.lamblia-C	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
5	G.lamblia-A	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
6	G.ardeae	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
7	G.lamblia-B	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
8	G.lamblia/D143	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
9	G.lamblia/L239	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
10	G.muris	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG
11	G.lamblia-G	GAGATGATGAAGAAGCTTAAGAAG

Sonde : LAP-1

		***** ***** **
1	G.lamblia-F	TTGATTAGAT
2	G.lamblia-E	TTGATTAGAT
3	G.lamblia-D	TTGATTAGAT
4	G.lamblia-C	TTGATTAGAT
5	G.lamblia-A	TTGATTAGAT
6	G.ardeae	TTGATTAGAT
7	G.lamblia-B	TTGATTAGAT
8	G.lamblia/D143	TTGATTAGAT
9	G.lamblia/L239	TTGATTAGAT
10	G.muris	TTGATTAGATT
11	G.lamblia-G	TTGATTAGAT

Amorce antisens : GIAR-1

		********** *********
1	G.lamblia-F	GAAAAGATG TGGTAAGAG
2	G.lamblia-E	GAAAAGATG TGGTAAGAG
3	G.lamblia-D	GAAAAGATG GTGGTAAGAG
4	G.lamblia-C	GAAAAGATG GTGGTAAGAG
5	G.lamblia-A	GAAAAGATG TGGTAAGAG
6	G.ardeae	GAAAAGATG TGGTAAGAG
7	G.lamblia-B	GAAAAGATG TGGTAAGAG
8	G.lamblia/D143	GAAAAGATG TGGTAAGAG
9	G.lamblia/L239	GAAAAGATG TGGTAAGAG
10	G.muris	GAAAAGATG GTGGTAAGAG
11	G.lamblia-G	GAAAAGATG TGGTAAGAG

Sonde : MUP-1

		******* ***** **
1	G.lamblia-F	AGTTGATAGAT
2	G.lamblia-E	AGTTGATAGAT
3	G.lamblia-D	AGTTGATAGAT
4	G.lamblia-C	AGTTGATAGAT
5	G.lamblia-A	AGTTGATAGAT
6	G.ardeae	AGTTGATAGAT
7	G.lamblia-B	AGTTGATAGAT
8	G.lamblia/D143	AGTTGATAGAT
9	G.lamblia/L239	AGTTGATAGAT
10	G.muris	AGTTGATTAGATT
11	G.lamblia-G	AGTTGATAGAT

ANNEXE 2

Etude bio-informatique : Alignements des séquences avec les amorces et sondes permettant la détection des génotypes A et B de *Giardia lamblia*

Amorce sens : A-for

1	G.lamblia-A
2	G.lamblia-G
3	G.lamblia-B
4	G.lamblia-E
5	G.lamblia-C
6	G.lamblia-F
7	G.microti
8	G.muris
9	G.ardeae

Amorce sens : B-for

1	G.lamblia-A
2	G.lamblia-G
3	G.lamblia-B
4	G.lamblia-E
5	G.lamblia-C
6	G.lamblia-F
7	G.microti
8	G.muris
9	G.ardeae

Sonde : *Giardia*-A

1	G.lamblia-A
2	G.lamblia-G
3	G.lamblia-B
4	G.lamblia-E
5	G.lamblia-C
6	G.lamblia-F
7	G.microti
8	G.muris
9	G.ardeae

Sonde : *Giardia*-B

1	G.lamblia-A
2	G.lamblia-G
3	G.lamblia-B
4	G.lamblia-E
5	G.lamblia-C
6	G.lamblia-F
7	G.microti
8	G.muris
9	G.ardeae

Amorce antisens : A-rev

1	G.lamblia-A
2	G.lamblia-G
3	G.lamblia-B
4	G.lamblia-E
5	G.lamblia-C
6	G.lamblia-F
7	G.microti
8	G.muris
9	G.ardeae

Amorce antisens : B-rev

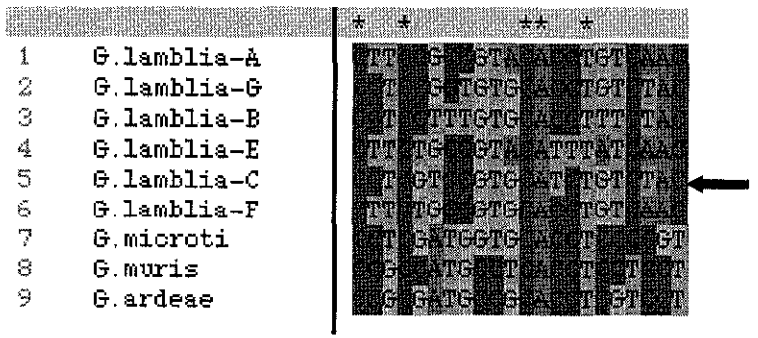
1	G.lamblia-A
2	G.lamblia-G
3	G.lamblia-B
4	G.lamblia-E
5	G.lamblia-C
6	G.lamblia-F
7	G.microti
8	G.muris
9	G.ardeae

ANNEXE 3

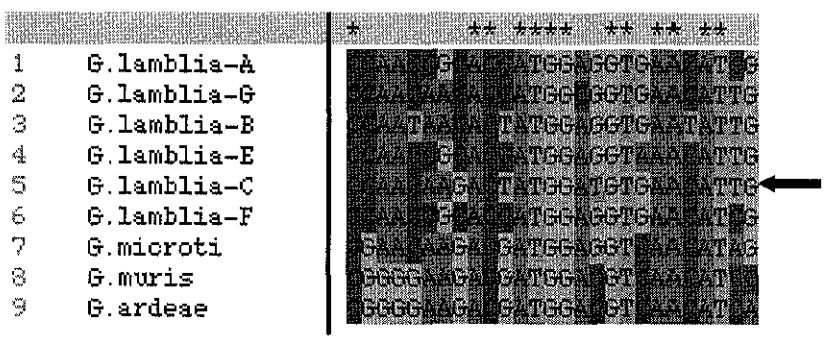
Etude bio-informatique : Alignements des séquences avec les amorces et sondes permettant la détection des génotypes C et E de *Giardia lamblia*

***Giardia lamblia*, Génotype C**

Amorce sens : C-for

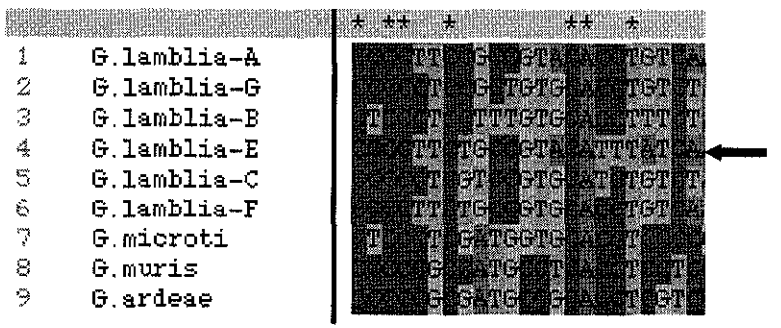


Amorce antisens : C-rev

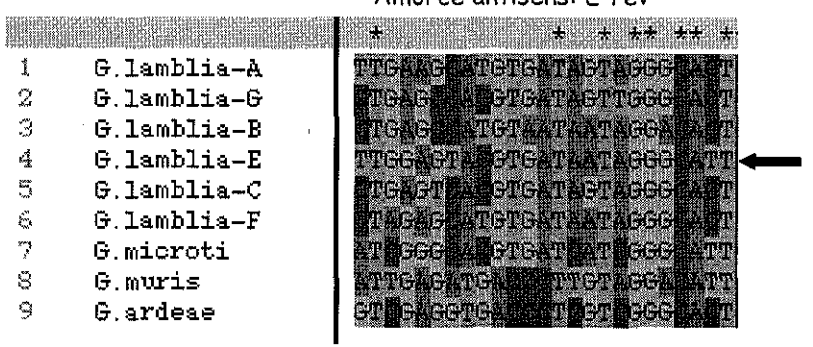


***Giardia lamblia*, Génotype E**

Amorce sens : E-for



Amorce antisens: E-rev



BIBLIOTHEQUE NANCY
PHARMACIE ODONTOLOGIE

Publications et communications

❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖ ❖

LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications internationales

BERTRAND, I., GANTZER, C., CHESNOT, T., SCHWARTZBROD, J.

Improved specificity for *Giardia* lamblia cyst quantification in wastewater by development of a real-time PCR method.

Journal of Microbiological Methods, 2004, 57, 41-53.

MAUX, M., BERTRAND, I., GANTZER, C., SCHWARTZBROD, J.

Estimating *Giardia* cysts viability using RT-PCR.

Water Science and Technology, 2002, 2(3), 107-115.

Communication internationale

BERTRAND, I. et SCHWARTZBROD, J.

Giardia cysts enumeration in wastewater characterized by faecal contamination origin : comparison of concentration and purification methods.

Poster et communication courte - IWA, World Water Congress and Exhibition, Marrakech, 19-24 Septembre 2004.

Communication nationale

BERTRAND, I. et SCHWARTZBROD, J.

Détection de *Giardia lamblia* par biologie moléculaire dans le milieu hydrique.

Le fil de l'eau, Nancy, 10-12 Mars 2003.

université HENRI POINCARÉ NANCY 1

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE ODONTOLOGIE NANCY

Prénom, Nom : **Isabelle BERTRAND**

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER N° 1047

Nancy, le 18 avril 2005

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY I PRÉSIDENT

Jean-Pierre FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1

24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex - Tél. 03 83 85 48 00 - Fax 03 83 85 48 48

Adresse électronique : _____ @uhp-nancy.fr

RESUME

Dans les pays industrialisés, les nombreuses épidémies d'origine hydrique dues aux protozoaires ont souligné l'importance de ces micro-organismes longtemps sous-estimés par rapport aux bactéries et aux virus. Parmi ces protozoaires, *Giardia lamblia* est une espèce complexe composée de sept génotypes dont seulement deux sont considérés comme pathogènes pour l'Homme, mais aussi pour de nombreux mammifères. Les méthodes de référence actuelles font appel à l'immunofluorescence qui autorise uniquement la détection de l'ensemble des kystes du genre *Giardia*. Dans ce contexte, notre étude a pour objectif de développer des outils permettant une détection spécifique des espèces et des génotypes, puis de les transférer à l'analyse d'échantillons environnementaux et biologiques.

La première partie de notre étude est réalisée uniquement à partir de kystes en suspensions purifiées. Dans un premier temps, nous avons sélectionné et validé un système de détection par PCR en temps réel permettant d'augmenter la spécificité de détection pour l'espèce *Giardia lamblia* par rapport à l'immunofluorescence. Au-delà de la mise en évidence de cette espèce, nous avons également mis en place deux PCR en temps réel assurant la détection spécifique des génotypes A et B pathogènes pour l'Homme, ainsi que deux PCR analytiques destinées à la mise en évidence des génotypes C et E spécifiques respectivement d'animaux domestiques et d'élevage. La sensibilité, la spécificité et la rapidité de détection constituent les avantages majeurs de ces différents outils.

La deuxième partie de nos travaux vise à transférer ces techniques de détection à l'analyse d'échantillons environnementaux suite à l'évaluation de protocoles de concentration et de purification des kystes. Les techniques basées sur la détection du génome sont en effet sensibles à de nombreux composés inhibiteurs présents à des concentrations élevées dans les échantillons biologiques et surtout environnementaux, et pouvant alors entraîner une sous-estimation de la contamination par ces micro-organismes. Différentes techniques de purification basées sur la densité des éléments à purifier (flottation et gradients de densité), la séparation immunomagnétique (IMS), mais aussi des procédés destinés à limiter l'effet des inhibiteurs de PCR lors de l'extraction des acides nucléiques ou de leur amplification sont évalués au cours de cette étape. Le protocole sélectionné suite à ces expérimentations comporte une concentration par centrifugation suivie par une purification des kystes par séparation diphasique à l'acétate d'éthyle et une flottation sur solution de Percoll™-saccharose (d : 1,10). L'étape d'extraction des acides nucléiques est également modifiée au niveau de la digestion de protéines et de la purification des acides nucléiques.

La troisième partie constitue l'étape majeure de notre étude puisqu'elle concerne tout d'abord la détection de l'espèce *Giardia lamblia* suivie par une analyse plus fine au niveau des génotypes. La détection de l'espèce *G. lamblia* s'avère alors positive pour l'ensemble des prélèvements. Des disparités sont ensuite mises en évidence pour les génotypes. Le génotype A est ainsi isolé au niveau des stations d'épuration et de l'abattoir, alors que le génotype B, plus rarement mis en évidence, n'est détecté dans aucun échantillon provenant de l'abattoir. La détection du génotype E confirme la différence observée entre ces sites puisqu'il est détecté uniquement dans les eaux usées de l'abattoir et apparaît comme un marqueur potentiel de contamination non-humaine. Les systèmes spécifiques des génotypes A et B ont également permis de génotyper des kystes de *Giardia lamblia* isolés de selles humaines. Le génotype B apparaît alors comme nettement majoritaire pour l'ensemble des prélèvements quelque soit leur origine. Cette première étude réalisée en France permet de détecter les génotypes B et A dans 64 % et 36 % des cas sporadiques respectivement. L'analyse de cas regroupés aboutit également à la mise en évidence du génotype B.

Ces expérimentations démontrent l'intérêt des techniques de biologie moléculaire pour une détection rapide, sensible et spécifique, mais aussi pour le génotypage de ce protozoaire au niveau environnemental et biologique.

Mots clés : *Giardia*, génotypage, PCR en temps réel, immunofluorescence, selles, environnement